

ВПЛИВ ГЛУТАТІОНУ І ЦИСТЕЇНУ, ДОДАНИХ ДО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ РОЗБАВЛЕННЯ І ЗБЕРІГАННЯ СПЕРМИ КНУРІВ, НА ЇЇ ЗБЕРЕЖЕННЯ

С. Б. Корнят

Інститут біології тварин НААН

Наведено дані про вплив цистеїну і глутатіону, введених у різних кількостях до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів на активність спермій протягом чотирьох днів зберігання, реакцію середовища та його осмотичний тиск. Показано, що введення в середовище для розбавлення і зберігання сперми вказаних органічних сірковмісних сполук протягом короткотривалого (до чотирьох днів) зберігання сперми кнурів на 4,96–15,17 % підвищує збереження спермій. Кращий результат отримано при використанні як добавки до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» цистеїну, що на 15,17 % покращує збереження спермій після трьохденного зберігання та на 6,7 % підвищує заплідненість свиноматок порівняно з контрольною групою.

Ключові слова: СПЕРМА, СПЕРМІЇ, КНУР, ЦИСТЕЇН, ГЛУТАТІОН, АКТИВНІСТЬ.

При штучному осіменінні свиноматок здебільшого використовується розбавлена сперма кнурів, отримана в цей же день або днем раніше. Проте всі маніпуляції, які проводяться для підготовки сперми кнурів до штучного осіменіння свиноматок (взяття сперми, розбавлення, транспортування і зберігання) є стресовими факторами для спермій, що знижують їх життєздатність, запліднюючу здатність а отже і ефективність штучного осіменіння [1–6].

Певне значення в набуванні сперміями стійкості до впливів зовнішнього середовища мають білки мембрани спермій – їхній склад, кількість та відношення вмісту білків до вмісту ліпідів у плазматичних мембранах спермій кнурів [7]. Зокрема, набування сперміями стійкості до умов зовнішнього середовища в процесі інкубації перед розбавленням пояснюється адсорбцією білків плазми сперми плазматичними мембранами спермій [8]. Сірковмісні амінокислоти, зокрема цистин, відіграють важливу роль у стабілізації просторової форми білкової молекули внаслідок зв'язування її дисульфідними зв'язками [9]. Тому важливе місце серед сполук білкової природи, які додаються в середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів з метою покращення їхньої спермозберігаючої дії займають сірковмісні амінокислоти чи амінокислоти, білки або пептиди, які містять сульфгідрильні групи [10]. Серед цих сполук важливу роль відіграють глутатіон та цистеїн.

Глутатіон є найбільш поширеним небілковим тіолом у клітинах ссавців, де його вміст становить 0,5–10 ммоль/л і він відіграє важливу роль у захисті клітин від окисних пошкоджень [11, 12], проте його вміст у спермі кнурів є нижчим порівняно з вмістом у спермі інших видів сільськогосподарських тварин і швидко знижується при зберіганні після еякуляції [13, 14].

Також рядом дослідників показано позитивний вплив додавання глутатіону або цистеїну, який є попередником внутрішньоклітинного біосинтезу глутатіону [15] до розбавленої сперми кнурів на виживання спермій протягом зберігання, збереження цілісності ДНК та проникнення спермій в яйцеклітину при заплідненні *in vitro* [16, 17].

Виходячи з вище сказаного, метою даної роботи було дослідження впливу глутатіону і цистеїну, доданих до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів на її збереження.

Матеріали і методи

Дослідження проводилися на базі ТзОВ ЛНВЦ «Західплемресурси» та в умовах лабораторії біології та патології відтворення тварин Інституту біології тварин УААН. Об'єктом досліджень була сперма 10 кнурів-плідників порід ландрас, велика біла і дюрк віком 1-2 роки. Кнури утримувалися безвигульно в клітках з глухими перегородками. Годівля відповідала прийнятим нормам. Сперма від кожного кнура відбиралася 7-9 разів на місяць.

Еякуляти в кнурів відбиралися до ранкової годівлі мануально після садки на дерев'яне чучело, розроблене в Інституті свинарства ім. О. В. Квасницького НААН. Після зважування та визначення концентрації проводилося їхнє розбавлення в лабораторії різними варіантами середовища «Екосперм», отриманими при додаванні до нього ряду біологічно активних сірковмісних речовин цистеїну і глутатіону в різних кількостях (по 100, 200 і 300 мг сполуки на 1 літру середовища). За контроль правила сперма, розбавлена у середовищі «Екосперм» без вказаних добавок.

Оцінювання впливу дослідних добавок проводилося щоденно по оцінці збереження активності сперміями, рН та осмотичного тиску розбавленої сперми протягом зберігання. Реакцію середовища вимірювали на рН-метрі 340, а осмотичний тиск вимірювали осмометром ОМКА ПЦ-01 за точкою замерзання зразка. Концентрація спермій в еякулятах оцінювалася на станції штучного осіменіння свиней на спектрофотометрі SDM-5, а активність розбавленої та нативної сперми на станції штучного

осіменіння свиней на мікроскопі MBL-2000 та в лабораторії на мікроскопі Биолам П-1 з використанням підігрівального столика СН-02. Розбавлена сперма зберігалася при температурі +17–18°C без доступу денного світла. Щоденно зразки при обстеженні вимішувалися для кращого контакту спермій з середовищем.

Результати й обговорення

З наведених у таблиці 1 даних видно, що при додаванні в середовище «Екосперм» цистеїну в кількості 100 мг на 1 літру середовища в першій дослідній групі активність спермій наступного дня після розбавлення була вищою на 3,2 %, на другий день – на 5,2 %, на третій – на 15,17 %, а на четвертий – на 9,5 % порівняно з контролем і на третій день ця різниця була статистично достовірною, осмотичний тиск дослідного середовища мало відрізнявся від даного показника у контрольній групі. Реакція середовища у першої дослідної групи мало відрізнялася порівняно з контролем, але на 3-й та 4-й день закислення дослідного середовища відбувалося повільніше, порівняно з контролем.

Таблиця 1

Вплив різних доз цистеїну, доданих до середовища «Екосперм» на збереження активності спермій при розбавленні сперми кнурів. (М±м, n=3)

День зберігання	Показник	Групи			
		К	1	2	3
0	Активність	77,14±4,06	77,14±4,20	79,28±3,69	78,17±4,04
	Осм. тиск	310,3±6,1	311,8±4,3	312,5±15,8	314,7±12,4
	pH	6,83±0,09	6,80±0,10	6,81±0,07	6,83±0,05
1	Активність	71,42±4,32	73,71±4,14	72,28±4,81	67,85±5,10
	Осм. тиск	318,3±3	316,10,5	313,33±10,27	316,5±2,5
	pH	7,05±0,07	6,96±0,08	6,99±0,05	6,90±0,05
2	Активність	67,86±2,86	71,42±4,04	68,33±4,59	60,71±4,14
	Осм. тиск	323,3±3,35	317,8±5,7	311,8±3,72	310,4±2,23*
	pH	7,17±0,04	7,05±0,05	6,96±0,09*	6,85±0,07*
3	Активність	60,71±2,28	69,92±1,51*	63,0±3,39	55,75±2,39
	Осм. тиск	323,14±1,32	322,86±0,96	324±1,13	323±1,07
	pH	6,95±0,09	6,97±0,19	6,95±0,09	6,77±0,14
4	Активність	53,33±3,33	58,42±14,59	55,0±10	46,67±3,33
	Осм. тиск	328,57±1,44	323,57±1,89	325,1±1,40	320,8±1,74
	pH	6,83±0,32	6,91±0,48	6,89±0,28	6,62±0,36

Примітка: в цій та наступних таблицях * – статистично достовірні різниці в досліджуваних показниках в дослідній групі порівняно до контрольної: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

У другій дослідній групі активність спермій при зберіганні була відповідно вищою, ніж у контролі: на 1–4-й день після взяття і розбавлення відповідно на 1,2, 0,7, 3,8 і 3,1 %, що вказує на певний позитивний вплив додавання цистеїну до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» в кількості 200 мг на 1 літру, проте різниці статистично недостовірні. Осмотичний тиск та реакція середовища в дослідному зразку майже не відрізнялися від даного показника у контрольній групі, проте на 2-й день зберігання реакція середовища була достовірно меншою порівняно з контрольною групою, що вказує на швидше закислення середовища.

В третій дослідній групі, тобто при додаванні 300 мг цистеїну на 1 літру середовища «Екосперм» активність спермій була меншою від контрольної групи на 5, 10,6, 8,2 і 12,5% відповідно на 1-, 2-, 3- та 4-й день зберігання. Осмотичний тиск мало відрізнявся, проте на другий день зберігання він був достовірно меншим ніж у контрольній групі. Реакція середовища в третьому дослідному середовищі була дещо більш кислою, ніж у контрольному зразку, проте достовірна відмінність була тільки на 2-й день зберігання.

Отже, при додаванні в середовище «Екосперм» цистеїну, перший дослідний варіант показав себе найкраще, внаслідок кращої активності спермій протягом зберігання, і різниця була найбільшою на третій день зберігання.

З наведених у таблиці 2 даних видно, що при додаванні глутатіону в середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів вищою активність збереженої сперми спостерігалася лише у першому дослідному варіанті протягом 2-, 3- та 4-го дня зберігання. Вона була вищою на 1,54, 4,96 і 4,48% від активності контрольної сперми протягом 2-4 дня зберігання, проте ці різниці статистично недостовірні.

Таблиця 2

Вплив різних доз глутатіону, доданих до середовища «Екосперм» на збереження активності спермій при розбавленні сперми кнурів.($M \pm m$, $n=3$)

День зберігання	Показник	Групи			
		К	1	2	3
0	Активність	75 $\pm$ 2,88	75 $\pm$ 2,37	74 $\pm$ 2,91	73 $\pm$ 3,39
	Осм. тиск	306,75 $\pm$ 3,95	320,0 $\pm$ 2*	315,4 $\pm$ 1,63	313 $\pm$ 1,92
	pH	7,05 $\pm$ 0,05	6,71 $\pm$ 0,07*	6,74 $\pm$ 0,04*	6,5 $\pm$ 0,10**
1	Активність	70,0 $\pm$ 5,77	70,0 $\pm$ 4,18	68 $\pm$ 4,89	62,0 $\pm$ 7,34
	Осм. тиск	311 $\pm$ 18,32	321 $\pm$ 14,32	317 $\pm$ 2,18	319 $\pm$ 21,75
	pH	7,01 $\pm$ 0,11	6,89 $\pm$ 0,09	6,97 $\pm$ 0,06	7,01 $\pm$ 0,13
2	Активність	65,0 $\pm$ 4,4	66,0 $\pm$ 2,24	60,0 $\pm$ 5,21	57,0 $\pm$ 4,3
	Осм. тиск	330,25 $\pm$ 2,49	323 $\pm$ 1,7	322 $\pm$ 2,02	321 $\pm$ 2,65
	pH	7,01 $\pm$ 0,05	7,09 $\pm$ 0,06	6,93 $\pm$ 0,10	6,94 $\pm$ 0,11
3	Активність	56,04 $\pm$ 3,85	58,82 $\pm$ 4,46	54,15 $\pm$ 3,12	41,35 $\pm$ 4,18*
	Осм. тиск	339,33 $\pm$ 3,38	325,2 $\pm$ 0,66	325,25 $\pm$ 1,44	327,5 $\pm$ 0,5
	pH	6,75 $\pm$ 0,10	6,81 $\pm$ 0,03	6,91 $\pm$ 0,11	6,36 $\pm$ 0,12*
4	Активність	48,61 $\pm$ 2,75	50,79 $\pm$ 4,15	49,28 $\pm$ 3,85	24,09 $\pm$ 3,27*
	Осм. тиск	348,33 $\pm$ 2,33	330 $\pm$ 1,61**	327,75 $\pm$ 2,17**	337,5 $\pm$ 4,5
	pH	5,93 $\pm$ 0,07	6,43 $\pm$ 0,14*	6,35 $\pm$ 0,21	6,28 $\pm$ 0,15

При додаванні найбільшої кількості вказаної сполуки (300 мг/л) середовище мало значно кислішу реакцію і на 2-й і 4-й день ці різниці були статистично достовірними. Активність спермій також знижувалася в цьому варіанті і на 3-й та 4-й день ці різниці були статистично достовірними.

Отже, з'ясовано позитивний вплив додавання цистеїну і глутатіону, до середовища для зберігання сперми «Екосперм». Так, активність спермій у кращих дослідних варіантах середовища була на третій день зберігання на 4,96-15,17% вищою порівняно з контролем. Реакція середовища протягом зберігання і його осмотичний тиск мало відрізнялися між дослідними зразками і контролем. При цьому слід відмітити, що статистично достовірні різниці в активності між дослідним та контрольним зразками було отримано при додаванні в середовище лише 100 мг на літру середовища цистеїну. Більша кількість додаваних сірковмісних сполук напевне мають токсичний вплив на спермії, що узгоджується з літературними даними [18].

Таблиця 3

Результати осіменіння свиноматок варіантами дослідних середовищ з найкращою дією на спермії

Амінокислота, яка додавалася в розбавник	Групи тварин	Осіменених тварин, голів	Запліднилось тварин	
			голів	%
Цистеїн	К	20	15	75
	Д	20	16	80
Глутатіон	К	30	24	80
	Д	30	25	83

Після цього було проведено порівняльне осіменіння свиноматок середовищем «Екосперм» і дослідними варіантами середовища з додаванням вказаних сірковмісних сполук в кількостях, які показали найкращі результати при зберіганні сперми кнурів в умовах лабораторії, тобто при додаванні в середовища цистеїну та глутатіону в кількостях 100 мг на 1 літру в середовище. Після проведення осіменіння по не приходу свиноматок в охоту було визначено кількість запліднених і отримано результати, наведені в таблиці 3. З отриманих результатів видно, що у всіх дослідних зразках середовищ було отримано кращий результат по заплідненні свиноматок після їхнього осіменіння, проте різниці не є достовірними, що можна пояснити недостатньо великим поголів'ям свиноматок.

Таблиця 4

Показники ефективності дослідних розбавників порівняно з контролем у %

Розбавник	Активність сперми на 1-й день зберігання	Активність сперми на 3-й день зберігання	Запліднюваність свиноматок, %
Екосперм	100	100	100
Е + цистеїн	103,2	115,17	106,7
Е + глутатіон	100,0	104,96	104,0

У таблиці 4 зведено дані про ефективність застосування дослідних варіантів розбавника порівняно з контролем на таких показниках, як активність спермій на 1-й і 3-й день зберігання та запліднюваність свиноматок після осіменіння їх спермою, що розбавлялася і зберігалася у дослідних варіантах розбавника. Для наочності в даній таблиці результати, отримані в кожному досліді у контрольної групи (при використанні розбавника «Екосперм») взято за 100 %, а результати, отримані в дослідних групах, виражено у % порівняно до контролю.

З наведених у даній таблиці даних видно, що більшу активність порівняно з контролем як на 1-й так і на 3-й день зберігання мала сперма, при розбавленні її середовищем з додаванням цистеїну. Середовище з додаванням глутатіону показало результат, рівний з контролем. При аналізі результативності осіменіння видно, що в обидвох дослідних групах цей показник був вищим порівняно з контролем, хоч різниці і незначні. Вищий результат було отримано у дослідній групі, в якій застосовували цистеїн.

Отже, наведені у таблиці дані свідчать про те, що застосування дослідних варіантів розбавників на 4,0–6,7 % підвищує запліднюваність свиноматок порівняно з контрольним середовищем та на 4,96–15,17 % підвищує збереженість сперми після трьохденного зберігання.

Висновки

Введення в середовище для розбавлення і зберігання сперми «Екосперм» органічних сірковмісних сполук покращує його дію на збереження активності спермій протягом короткотривалого (до 3-х днів) зберігання сперми кнурів та на 4,96–15,17 % підвищує збереження спермій після їхнього трьохденного зберігання.

Найкращий результат отримано при використанні як добавки до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» цистеїну в кількості 100 мг на 1 літру середовища, що на 15,17 % покращує збереження спермій після трьохденного зберігання та на 6,7 % підвищує заплідненість свиноматок порівняно з контрольною групою.

Перспективи подальших досліджень. Становить інтерес дослідження захисної дії сірковмісних органічних сполук в лабораторних умовах на спермії кнурів, та розробка на основі цього покращених варіантів середовищ для розбавлення і зберігання сперми кнурів.

S. B. Kornyat

INFLUENCE OF GLUTATHIONE AND CYSTEINE ADDED TO DILUENT

FOR SPERM BOAR ON STORAGE

S u m m a r y

The data about the influence of administration of different doses of glutathione and cysteine to the medium for boar sperm dilution and storage on the activity spermatozooids during 4 days of storage, on the medium pH and its osmotic pressure are presented in the article. It has been shown that the administration of glutathione and cysteine to the medium enhance its action on sperm activity during short-term (to 3 days) storage and increase the sperm safety to 4.96 and 15.17 % on 3 days storage. The administration of these amino acids increased fertilization by 6,7 and 4,0 %.

С. Б. Корнят

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАТИОНА И ЦИСТЕИНА, ДОДАННЫХ К СРЕДЕ ДЛЯ РАЗБАВЛЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ ХРЯКОВ, НА ЕЁ СОХРАННОСТЬ

А н н о т а ц и я

Показаны данные о влиянии цистеина, и глутатиона, введенных в разных количествах в среду для разрежения и хранения спермы хряков на активность спермиев на протяжении 4-х дней хранения, реакцию среды и его осмотическое давление. Показано, что введение в среду для разрежения и хранения спермы хряков органических серосодержащих соединений улучшает её действие на сохранность активности спермиев во время краткосрочного (до 3-х дней) хранения спермы хряков и на 4,96–15,17 % увеличивало по сравнению с контролем активность спермиев после их трёхдневного хранения. Наилучший результат получено при использовании как добавки к среде для розрежения и хранения спермы хряков цистеина, что на 15,17 % улучшает сохранность спермиев после трёхдневного хранения и на 6,7 % повысило оплодотворённость свиноматок в сравнении с контрольной группой.

1. Інструкція із штучного осіменіння свиней : інструкція / Відповідальний за випуск Ю. Ф. Мельник. – Київ : Аграрна наука, 2003. – 56 с.
2. Huo L. J. Characterization viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures / Huo L. J., Yue K. Z., Yang Z. M. / *Reprod. Fertil. Dev.* – 2002. – V.14. – №7–8. – P. 509–514.
3. Watson P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity : Boar Semen Preservation III Proc. 3rd Int. Conf. Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, August, 1995 / In: Rath, D. Johnson, L.A., Weitze, K. F., (Eds.) // *Reprod. Domest. Anim.* – Vol.31. – Blackwell, Berlin, 1996. – P.135–140.
4. De Leeuw, F. E. The role membrane damage plays in cold shock and fertility injury / De Leeuw, F. E., Colenbrander B., Vekleij A. J. / *Reprod. Domest. Anim.* – 1990. – Suppl. 1. – P. 95–104.
5. Белоус А. М. Структурне изменения биологических мембран при охлаждении / Белоус А. М., Бондаренко В. А. – Киев : Наукова думка, 1982. – 256 с.
6. Наук В. А. Структура и функции спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / Наук В. А. – Кишинёв: Штиинца, 1991. – 200 с.
7. Moore H. D. M. The binding of labeling basic proteins by boar spermatozoa / Moore H. D. M., Hibbitt K. G. // *J. Reprod. Fertil.* – 1976. – V. 46, №1. – P.71–76.
8. Ленинджер А. Основы биохимии : в 3-х томах / Ленинджер А. – Москва : Мир, 1985. – т.1. – 367 с.
9. Johnson L. A. Storage of boar semen /Johnson L. A., Weitze K. F., Fiser P., Maxwell W. M. C. / *Animal Reproduction Science.* – 2000. – V.62. – P.143–172.
10. Calvin H. I. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymus / Calvin H. I., Bedford J. M. / *J. Reprod. Fertil.* – 1971. – 13 (Suppl.). – P.65–75.
11. Meister A. Glutathione / Meister A., Anderson M. E. // *Annual Review of Biochemistry.* – V.52. – 1983. – P. 711–760.
12. Strezek J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands / Strezek J. // *Reproductive Biology.* – 2002. – V.2. – P.243–266.
13. Agrawal Y. P. Glutathione, L-glutamic acid and gamma-glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues / Agrawal Y. P., Vanha-Pertula T. // *International J. of Andrology.* – 1988. – V.11. – P.123–131.
14. Ting-Kai L. I. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma / Ting-Kai L. I. // *Biology of Reproduction.* – 1975. – V.12. – P.641–646.
15. Meister A. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization / Meister A., Tate S. S. / *Annu. Rev. Biochem.* – 1976. – V.45. – P.559–604.
16. Funahashi H. Select antioxidant improve the function of extended boar semen stored at 10°C / Funahashi H., Sano T. / *Theriogenology.* – 2005. – V.63. – P.1605–1616.

17. *Szczesniak-Fabianczyk B.* Effect of antioxidant added to boar semen extender on the semen survival time and perm chromatin structure / *Szczesniak-Fabianczyk B., Bochenek M., Smorag Z., Ryszka F.* / *Reproductive Biology.* – 2003. – V.3, №1. – P.81–87.
18. *Zini A.* Free thiols in human spermatozoa: correlation with sperm DNA integrity / *Zini A., Kamal K. M., Phang D.* / *Urology.* – 2001. – V.58(1). – P. 80–84.

Рецензент: головний науковий співробітник НВЦ з вивчення пріонних інфекцій, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Остапів Д. Д.