

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ТА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ, РОЗРІДЖУВАЧАХ І ТРИВАЛОСТІ ІНКУБАЦІЇ

Лобченко С. Ф., науковий співробітник

Гусар Т. О., молодший науковий співробітник

Лобченко В. О., кандидат біологічних наук

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, 36013, Україна

pigbreeding@ukr.net

У статті висвітлені результати досліджень життєздатності сперматозоїдів за умови різного часу їх інкубування в різних концентраціях та за використання різних розріджувачів. (Не)концентровані сперматозоїди розріджували: 1) власною плазмою; 2) середовищем 199; 3) сумішшю рівних об'ємів плазми та середовища 199. Дослід спланували таким чином, щоб сформувані експериментальні зразки з концентраціями сперматозоїдів, підготовленими згідно з методикою, а саме: 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 млрд/мл. Оцінювали сперму через 2, 4, 6 та 8 годин. Перспектива такого дослідження є значною і дає можливість вивчати різні аспекти цього питання у широкому діапазоні.

У зв'язку з цим, було проведено серію дослідів у цьому напрямі. Отримані дані статистично оброблені і дозволяють висвітлювати результати, які стосуються кожного етапу дослідження.

Зокрема в цій статті виявлена певна закономірність між життєздатністю сперматозоїдів, типом розріджувача та кратністю розрідження, про що свідчать дані представлені в таблицях.

У результаті інкубування сперми життєздатність сперматозоїдів залишається щонайменше в тенденції найбільшою, коли сперму розріджують до концентрації 0,1 млрд/мл, не залежно від типу розріджувача з тих, які використовували. Для збереження життєздатності сперматозоїдів з використанням цієї їх концентрації середовище 199 не краще як за власну плазму, так і за його суміш з рівним об'ємом плазми через будь-яку тривалість часу інкубування такої сперми. Найчастіше саме за цієї концентрації сперматозоїдів їх життєздатність характеризувалася найменшим коефіцієнтом варіації, не залежно від типу використаного розріджувача, що може свідчити про найбільшу стабільність результату в цих умовах.

Життєздатність сперматозоїдів з концентрацією 0,1 млрд/мл статистично значуще зменшується лише через 6, а то й 8, год інкубування. Якщо сперму інкубують усього лише 2 год, не залежно від типу використаного розріджувача досліджені концентрації сперматозоїдів не впливають на зберігання їх життєздатності.

Ключові слова: кнур, сперматозоїди, плазма сперми, концентрація, інкубування, середовище 199, активність, життєздатність, розрідження.

Необхідність дослідження активності та життєздатності сперматозоїдів поза організмом виникає через надзвичайно важливе значення вибору саме якісної сперми для відтворення свиней. Як зазначено в Інструкції зі штучного осіменіння свиней [1, 5], якісне поліпшення поголів'я відбувається при використанні сперми високопродуктивних плідників як власних порід, так і кращого світового генофонду.

У літературних джерелах можна зустріти багато даних про дослідження властивостей сперми, її складу, переживання сперматозоїдів в різних середовищах і розрі-

дживачах та про вплив різних факторів на їх активність. Здавалося б, що тема дослідження сперми кнурів вже вивчена достатньо, і ці знання вже використовуються у наш час на практиці.

Однак, практика показує, що сперма продовжує бути предметом подальшого дослідження, оскільки якість сперми залежить не лише від режиму використання кнурів [2, 3, 4], впливу факторів зовнішнього середовища, годівлі [5], але і способів підготовки її до штучного осіменіння свиноматок.

Метою роботи було дослідити життєздатність сперматозоїдів після розрідження сперми різними середовищами до різної концентрації.

Матеріали і методи досліджень. Об'єктом дослідження була сперма кнурів, яку брали на станції штучного осіменіння Інституту свинарства і АПВ НААН. Показники активності та концентрації визначали на станції візуально під мікроскопом та на фотоелектроколориметрі. Відбирали для експериментів тільки ті зразки еякулятів, які мали активність не нижчу 80 % та концентрацію сперматозоїдів не нижчу 0,20 млрд/мл.

Відібрані зразки відразу ж доставляли у лабораторію та опрацьовували в умовах стерильного боксу. На першому етапі проводили концентрування сперматозоїдів та плазми. З цією метою необхідний об'єм еякуляту центрифугували 5-7 хв. при 3000 об/хв для отримання осаду сперматозоїдів. Після цього обережно відбирали шприцом надосадову рідину (спермальну плазму) і переносили її у стерильний флакон. Об'єм плазми, що відбирали, визначали попередньо з таким розрахунком, щоб у залишку концентрація сперматозоїдів становила 1,6 млрд/мл. Сперматозоїди переводили з осаду у суспензію м'яким струшуванням флакону, або за допомогою скляної палички чи струменем плазми, яку набирали у шприц з голкою.

Одержану суспензію використовували як вихідну для приготування кінцевого експериментального зразка з необхідною концентрацією сперматозоїдів. Це досягалося шляхом поступового додавання до порції сконцентрованої сперми відповідних кількостей плазми та середовища 199, яке служило розріджувачем плазми. Експериментальні зразки з досліджуваною концентрацією сперматозоїдів та плазми об'ємом 1 мл поміщали у скляні стерильні флакони об'ємом 5 мл. Їх завантажували в ексікатор, що попередньо знаходився у термостаті і містив на дні дистильовану воду для попередження втрат вологи із зразків під час їх інкубування.

Закритий герметично ексікатор поміщали у термостат, де підтримувалась температура 38 °С. Протягом 8 годин через кожні 2 години із експериментальних зразків відбирали проби (одну краплину) для визначення активності сперматозоїдів шляхом візуальної оцінки під мікроскопом. З одержаних значень активності сперматозоїдів вираховували показник їх життєздатності за відповідною формулою (Милованов, 1962), згідно з якою він визначався площею фігури, обмеженої координатами активності, часу та кривою падіння активності протягом часу інкубування сперми.

Показник активності вираховували за формулою:

$$S = \sum at,$$

де S-абсолютний показник переживання сперматозоїдів;

Σ -знак суми;

a-рухливість в балах;

t-показник часу, що вираховують по формулі:

$$t = \frac{T_{n+1} - T_{n-1}}{a}$$

де T-час від початку зберігання сперми до даного визначення;

T_{n+1}-час наступного визначення;

T_{n-1}-час попереднього визначення.

Результати досліджень. З табл. 1 видно, що якщо в якості розріджувача сперми використовувати середовище 199, то за тривалості її інкубування протягом 2 год життєздатність сперматозоїдів залишається однаковою (статистично значуще не відрізняється) не залежно від кратності їх розрідження, у тому числі й порівняно з концентрацією цільної сперми, хоча можна бачити тенденцію досягнення більшого значення за концентрації 0,1 млрд/мл.

Інкубування сперми в цьому середовищі протягом 4 год виявило, що немає смислу розбавляти сперму цим середовищем у півтора рази ($p > 0,05$), але в результаті розрідження утричі її життєздатність збільшується ($p < 0,05$) порівняно з розрідженням навіть у півтора рази, а тим більше - порівняно з цільною спермою ($p < 0,001$). Розрідження сперми більше, ніж утричі не покращило життєздатність сперматозоїдів порівняно з розрідженням утричі ($p > 0,05$).

Інкубування сперми в цьому середовищі протягом 6 год виявило, що розрідження сперми утричі покращує життєздатність сперматозоїдів порівняно з такою нерозбавленою спермою ($p < 0,001$) або розбавленою лише у півтора рази ($p < 0,05$). Розрідження сперми більше, ніж утричі характеризується тенденцією до зменшення виживаності сперматозоїдів ($p > 0,05$).

Нарешті, інкубування сперми в цьому середовищі протягом 8 год виявило, що трикратне розрідження сперми забезпечує у тенденції більшу життєздатність сперматозоїдів, ніж розрідження сперми у півтора та шість разів ($p > 0,05$). Хоча життєздатність сперматозоїдів і не розрідженої сперми та розрідженої більше, ніж у 6 разів статистично значимо не більша за таку сперми, розрідженої утричі ($p > 0,05$).

Отже, не залежно від тривалості інкубування сперми, протягом двох чи восьми годин, розріджувати її середовищем 199 найкраще утричі. Адже саме за концентрації сперматозоїдів 0,1 млрд/мл, яка утричі менша за концентрацію цільної сперми, вона характеризувалася найбільшою виживаністю. Цікаво, що саме за цієї кратності розрідження сперми, життєздатність сперматозоїдів, через будь-яку тривалість їх інкубування, характеризувалася найменшим коефіцієнтом варіації, - найстабільнішим результатом.

За цієї концентрації сперматозоїдів, порівняно з їх життєздатністю через 2 год інкубування, вона зменшилася ($p < 0,01$) лише через 8 год цього процесу.

З табл. 2 видно, що якщо в якості розріджувача сперми використовувати її власну плазму, то за інкубування її протягом 2 год життєздатність сперматозоїдів лише у тенденції найбільша за концентрації їх у 0,05 млрд/мл. Але, сперму можна розріджувати власною плазмою й до концентрацій 0,2, 0,1 та 0,025 млрд/мл. Адже статистично значущої різниці між виживаністю сперматозоїдів за усіх цих концентрацій не виявлено.

За інкубування такої сперми протягом 4 год життєздатність сперматозоїдів у тенденції найбільша за концентрації їх у 0,1 млрд/мл. Але, сперму можна розріджувати власною плазмою й до концентрацій 0,2 та 0,05 млрд/мл. Адже статистично значущої різниці між виживаністю сперматозоїдів за усіх цих концентрацій не виявлено.

За інкубування такої сперми протягом 6 год життєздатність сперматозоїдів у тенденції найбільша за концентрації їх у 0,1 млрд/мл. Але, сперму можна розріджувати власною плазмою й до концентрацій 0,2 млрд/мл. Адже статистично значущої різниці між виживаністю сперматозоїдів за цих концентрацій не виявлено. Розрідження сперми до концентрації удвічі меншої, ніж 0,1 млрд/мл, у тенденції, але більше, ніж на порядок, погіршує її життєздатність.

Лише через 8 год інкубування такої сперми стало видно, що життєздатність сперматозоїдів за концентрацій 0,1 та 0,2 млрд/мл однакова та краща за таку при інших розрідженнях з тих, які були досліджені щодо цього показника.

1. Життєздатність сперматозоїдів сперми цільної та розрідженої середовищем 199 за інкубування при 38,0 °С, умовних одиниць (n=6)

Тривалість інкубування, год	Статистичний параметр	Сперма				
		цільна	розріджена			
		концентрація сперматозоїдів, млрд/мл				
		0,3	0,2	0,1	0,05	0,025
2	M±m	43,33± 13,02	55,83± 11,43	70,00± 8,06	65,00± 10,17	49,17± 12,87
	S	31,89	28,00	19,75	24,90	31,53
	Cv	73,58	50,15	28,21	38,31	64,13
4	M±m	16,67± 7,71	36,67± 11,60	71,67± 6,41	50,50± 13,24	25,83± 12,00
	S	18,89	28,40	15,71	32,43	29,40
	Cv	113,31	77,46	21,91	64,21	113,79
6	M±m	6,67± 3,82	21,50± 9,42	58,33± 11,08	34,00± 14,97	6,50± 5,72
	S	9,35	23,07	27,14	36,67	14,01
	Cv	140,29	107,31	46,53	107,86	215,55
8	M±m	1,00± 0,82	2,00± 1,03	23,67± 11,13	6,67± 4,77	0,17± 0,17
	S	2,00	2,53	27,25	11,69	0,41
	Cv	200,00	126,49	115,15	175,36	244,95

За концентрації сперматозоїдів 0,1 млрд/мл, порівняно з їх життєздатністю через 2 год інкубування, вона зменшилася ($p < 0,01$) лише через 8 год цього процесу.

2. Життєздатність сперматозоїдів, сконцентрованих до 1,6 млрд/мл у власній плазмі та розріджених нею до відповідної концентрації, за інкубування при 38,0 °С, умовних одиниць (n=6)

Тривалість інкубування, год	Статистичний параметр	Концентрація сперматозоїдів, млрд/мл			
		0,2	0,1	0,05	0,025
2	M±m	41,67± 14,30	50,00± 12,97	57,50± 11,60	36,67± 9,63
	S	35,02	31,78	28,42	23,59
	Cv	84,06	63,56	49,42	64,35
4	M±m	22,50± 12,21	42,83± 14,23	39,33± 14,19	1,00± 0,45
	S	29,92	34,84	34,77	1,10
	Cv	132,97	81,35	88,39	109,54
6	M±m	16,00± 10,94	22,17± 13,12	1,50± 0,67	0,00± 0,00
	S	26,80	32,13	1,64	0,00
	Cv	167,47	144,94	109,54	0,00
8	M±m	1,50± 1,15	3,83± 3,27	0,00± 0,00	0,00± 0,00
	S	2,81	8,01	0,00	0,00
	Cv	187,38	208,97	0,00	0,00

З даних, представлених у табл. 3, видно, що через дві години інкубування сперми, розрідженої сумішшю рівних об'ємів плазми та середовища 199, життєздатність сперматозоїдів залишалася однаковою не залежно від того, у скільки разів її розрідили, у 8 (1,6/0,2) чи в 64 (1,6/0,025).

Через чотири години інкубування сперми, розрідженої сумішшю рівних об'ємів плазми та середовища 199, життєздатність сперматозоїдів за їх концентрації 0,1 млрд/мл була в тенденції більшою за таку у випадку використання концентрації 0,2 та 0,05 млрд/мл та більшою ($p < 0,001$) за таку у випадку використання концентрації 0,025 млрд/мл.

Через шість годин інкубування такої сперми, життєздатність сперматозоїдів за їх концентрації 0,1 млрд/мл була в тенденції більшою за таку у випадку використання концентрації 0,2 млрд/мл та більшою ($p < 0,01$) за таку у випадку використання концентрації 0,05 млрд/мл.

Через вісім годин інкубування такої сперми, життєздатність сперматозоїдів за їх концентрації 0,1 млрд/мл була в тенденції більшою за таку у випадку використання концентрації 0,2 млрд/мл та більшою ($p < 0,05$) за таку у випадку використання концентрації 0,05 млрд/мл.

З цієї таблиці також видно, що життєздатність сперматозоїдів у тенденції зменшується уже через 6 год інкубування цієї сперми та особливо різко – через 8 год. Так, при концентрації сперматозоїдів 0,1 млрд/мл через 6 год інкубування цієї сперми життєздатність їх зменшилася ($p < 0,05$) ледве не удвічі, а ще через 2 год – ще у 8,5 рази ($p < 0,001$ порівняно з життєздатність через 2 год інкубування).

3. Життєздатність сперматозоїдів, сконцентрованих до 1,6 млрд/мл у своїй плазмі та розрідженої розчином: плазма/199 = 50/50 % до відповідної концентрації, за інкубування при 38,0 °С, умовних одиниць (n=6)

Тривалість інкубування, год	Статистичний параметр	Концентрація сперматозоїдів, млрд/мл			
		0,2	0,1	0,05	0,025
2	M±m	71,67± 6,41	76,67± 1,05	75,00± 1,83	57,50± 9,20
	S	15,71	2,58	4,47	22,53
	Cv	21,91	3,37	5,96	39,18
4	M±m	60,00± 9,92	78,33± 1,05	51,67± 12,02	3,17± 0,91
	S	24,29	2,58	29,44	2,23
	Cv	40,48	3,30	56,98	70,38
6	M±m	20,33± 5,30	48,33± 11,95	6,17± 4,80	0,17± 0,17
	S	12,99	29,27	11,75	0,41
	Cv	63,87	60,56	190,61	244,95
8	M±m	2,67± 0,61	5,67± 1,36	0,83± 0,83	0,00± 0,00
	S	1,51	3,33	2,04	0,00
	Cv	56,46	58,71	244,95	0,00

Порівняння життєздатності сперматозоїдів залежно від їх концентрації показує, що за 0,1 млрд/мл вона щонайменше в тенденції більша за таку, що має місце у випадку використання інших концентрацій.

Зважаючи на той факт, що життєздатність сперматозоїдів щонайменше в тенденції найбільша у випадку використання концентрації 0,1 млрд/мл, типи використаних розріджувачів порівняли саме за цієї концентрації. Виявилось, що для збереження життєздатності сперматозоїдів середовище 199 не краще за власну плазму через будь-яку тривалість часу інкубування сперми цієї концентрації.

Те ж саме виявило порівняння середовища 199 з його 50 % сумішшю з плазмою.

Висновки. У результаті інкубування сперми життєздатність сперматозоїдів залишається щонайменше в тенденції найбільшою, коли сперму розріджують до концентрації 0,1 млрд/мл, не залежно від типу розріджувача з тих, які використовували. Для збереження життєздатності сперматозоїдів з використанням цієї їх концентрації середовище 199 не краще як за власну плазму, так і за його суміш з рівним об'ємом плазми через будь-яку тривалість часу інкубування такої сперми.

Життєздатність сперматозоїдів з концентрацією 0,1 млрд/мл статистично значуще зменшується лише через 6, а то й 8, год інкубування. Якщо сперму інкубують усього лише 2 год, не залежно від типу використаного розріджувача досліджені концентрації сперматозоїдів не впливають на їх життєздатність.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Анисимов А. Г., В. П. Хлопицкий, та А. Г. Нарижный. 2014. Показатели спермы хряков и воспроизводительные качества свиноматок при использовании стандартной ГХЦС среды. РусьАгроЮг отраслевой агропромышленный портал. 03 мая 2014 г. 14:23<http://rusagroug.ru/articles/2249>

2. Schulze M., M. Dathe, D. Waberski, та K. Müller. 2016. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. Volume 85, Issue 1, Pages 39-46. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.016.

3. Poolperm, P. Factors Influencing Semen Quality and Fertility in Boars. // A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. *Physiology*. Raleigh. 2001. 156 p.

4. Henning H., A. M. Petrunkina, R. A. P. Harrison, та D. Waberski. Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function. *Reprod., Fertil. and Dev.* 2014. 26(5) 623-632. <https://doi.org/10.1071/RD13113>

5. Мельник, О. Ф. 2003. Інструкція із штучного осіменіння свиней. К.: Аграрна наука, 56.

REFERENCES

1. Anisimov, A. G., V. P. Khlopitsky, and A. G. Narizhny. 2014. Boar semen and reproductive performance of sows using standard GCC medium. *RusAgroYug branch agro-industrial portal*. May 03, 2014 14: 23<http://rusagroug.ru/articles/2249>.

2. Schulze. M., M. Dathe, D. Waberski, and K. Müller. 2016. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. Volume 85, Issue 1, Pages 39-46. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.016.

3. Poolperm, P. 2001. Factors Influencing Semen Quality and Fertility in Boars. A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. *Physiology*. Raleigh. 156.

4. Henning, H., A. M. Petrunkina, R. A. P. Harrison, and D. Waberski. 2014. Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function. *Reprod., Fertil. and Dev.* 26(5) 623-632. <https://doi.org/10.1071/RD13113>

5. Mel'nyk, O. F. 2003. *Instruktsiya iz shtuchnoho osimeninnya svynei – Instruction on artificial insemination of pigs*. K.: Ahrarna nauka, 56 (in Ukrainian).

Лобченко С. Ф., Гусар Т. А., Лобченко В. А. Исследование активности и жизнеспособности сперматозоидов при различной концентрации, разбавителей и длительности инкубации

В статье освещены результаты исследований жизнеспособности сперматозоидов хряков после различной продолжительности инкубирования при их различных концентрациях и типах разбавителей. (Не) концентрированные сперматозоиды разбавляли: 1) собственной плазмой; 2) средой 199; 3) смесью равных объёмов плазмы и среды 199. Опыт спланировали таким образом, чтобы сформировать экспериментальные образцы с концентрациями сперматозоидов, подготовленными согласно методике, а именно: 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 млрд/мл. Оценивали сперму через 2, 4, 6 и 8 часов.

Перспектива такого исследования является значительной и даёт возможность изучать различные аспекты этого вопроса в широком диапазоне.

В связи с этим, было проведено серию опытов в этом направлении. Полученные данные статистически обработаны и позволяют освещать результаты по принципу этапов проведения исследования.

В частности, в этой статье прослеживается определенная закономерность между жизнеспособностью сперматозоидов, типом разбавителем и кратностью разбавления (концентрацией спермы), о чем свидетельствуют данные представленные в таблицах.

В результате инкубирования спермы жизнеспособность сперматозоидов остаётся по крайней мере в тенденции наибольшей тогда, когда сперму разбавляют до концентрации 0,1 млрд/мл, не зависимо от типа разбавителя из тех, которые использовали.

Для сохранения жизнеспособности сперматозоидов с использованием этой их концентрации среда 199 оказалась не лучшей как собственной плазмы, так и её смеси с равным объёмом плазмы после любой продолжительности инкубирования такой спермы.

Чаще всего именно при этой концентрации сперматозоидов их жизнеспособность характеризовалась наименьшим коэффициентом вариации, не зависимо от типа использованного разбавителя, что может свидетельствовать о наибольшей стабильности результатов в этих условиях.

Жизнеспособность сперматозоидов с концентрацией 0,1 млрд/мл статистически значимо уменьшается только через 6, а то и 8, часов инкубирования.

Если сперму инкубируют всего 2 часа, не зависимо от типа использованного разбавителя исследованные концентрации сперматозоидов не влияют на сохранение их жизнеспособности.

Ключевые слова: хряк, сперматозоиды, плазма спермы, концентрация, инкубирование, среда 199, активность, жизнеспособность, разбавление.

Lobchenko S. F., Husar T. O., Lobchenko V. O. Research of the activity and viability of spermatozoa at different concentrations, diluents, and the duration of incubation
The results of studies of the viability of spermatozoa with different incubation time at different concentrations and using different diluents are highlighted in the article. (Un) concentrated spermatozoa were diluted: 1) with their native plasma; 2) medium 199; 3) a mixture of equal volumes of plasma and medium 199. The experiment was designed to generate experimental samples with spermatozoa concentrations prepared according to the method, namely: 0.2; 0.1; 0.05; 0.025 billion / ml.

The sperm was evaluated after 2, 4, 6 and 8 hours. The perspective of such a study is significant and makes it possible to research various aspects of the subject in a wide range.

In this regard, a series of experiments were conducted in this area. The data obtained are statistically processed and allow us to highlight the results that relate to each stage of the study.

In particular, in this article it was found out some regularities between the viability of sperm, the type of diluent and the rate of rarefaction, as evidenced by the data presented in the tables.

As a result of sperm incubation, the viability of spermatozoa remains at least the highest trend when sperm are diluted to a concentration of 0.1 billion / ml, regardless of the type of diluent used. To maintain the viability of sperm using this concentration of medium 199 is not better than its native plasma, and its mixture with an equal volume of plasma through any length of time incubation of such sperm. Most often it is at this concentration of sperm that their viability is characterized by the lowest coefficient of variation, regardless of the type of diluent used, which may indicate the greatest stability of the result under these conditions.

The viability of spermatozoa with a concentration of 0.1 billion / ml is statistically significantly reduced only after 6 or even 8 hours of incubation. If the sperm are incubated for only 2 hours, regardless of the type of diluent used, the sperm concentrations tested do not affect the viability of the sperm.

Key words: boar, spermatozoa, sperm plasma, concentration, incubation, medium 199, activity, viability, rarefaction.