

5. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 57.086.13:[591.463.1:636]:[631.577:633.34]

DOI [10.36016/VM-2024-110-31](https://doi.org/10.36016/VM-2024-110-31)

АНТИШОКОВИЙ ЕФЕКТ ЕКСТРАКТУ СОЇ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ СПЕРМИ РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН

Павленко Б. М., Павленко Л. М., Кошелєв В. В., Бородай Н. І., Фісенко С. А.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: pabbex@gmail.com

Представлені результати вивчення фортифікаційного ефекту на плазматичні мембрани сперми бугаїв, баранів та кнурів, оброблених гідролізатом насіння сої, після відмивання, а також після впливу перепаду температур на спермії. Встановлено, що ліпопротеїновий екстракт із сої проявляє властивість захищати статеві клітини від температурного шоку в умовах миттєвого зниження температури від 28 до 0 °С на одному рівні з нативним жовтком. Встановлено пряму залежність осмотичного тиску в екстрактах від температури експозиції і умов екстрагування. За умов заміни в кріопротективних середовищах нативного жовтка антишоковими компонентами рослинного походження забезпечується збереження високих біологічних показників сперми після відтаювання. Використання фортифіканту рослинного походження плазматичних мембран замість нативного жовтка дає змогу застосувати прості і надійні способи стерилізації, запобігти забрудненню сперми і статевих шляхів самиць збудниками захворювань, які передаються з жовтком, таким чином підвищити санітарно-гігієнічний рівень штучного осіменіння

Ключові слова: спермії, кріоконсервування, розріджувачі, ліпопротеїни, температурний шок, екстракт сої

Сучасна індустрія репродукції у тваринництві базується на широкому впровадженні штучного осіменіння тварин глибокозамороженою спермою. В біотехнології репродукції з метою функціональних джерел енергії для сперміїв за їх кріоконсервування застосовують цілий ряд різних цукрів [1–7]. Також при консервуванні сперми за допомогою низьких температур обов'язковим компонентом кріопротективного середовища є нативний жовток через велику кількість в ньому фосфоліпідів і ліпопротеїдів, які, взаємодіючи з плазматичними мембранами сперміїв, модифікують їх в напрямку підвищення міцності і стабільності [2]. Адсорбуючись ліпофільними і гідрофільними ділянками плазматичних мембран, ліпоїдні комплекси майже в три рази потовщують клітинну мембрану, що підсилює стійкість гамет до пошкодження температурним, осмотичним, імунним, фізико-хімічним і механічним факторами. Тому жовткові розріджувачі стали основою виробничих технологій консервування сперми тварин. Разом з тим, внаслідок низької суттєвих недоліків, жовток не є ідеальним компонентом штучних розріджувачів. Основним його недоліком є термолабільність, що позбавляє можливості надійно стерилізувати жовткові розріджувачі загальнодоступними способами [6,7].

Мета роботи — вивчити фортифікаційний ефект на плазматичні мембрани сперми бугаїв, баранів та кнурів, оброблених гідролізатом насіння сої, після відмивання, а також після впливу перепаду температур на спермії.

Матеріали і методи. Дослідження проведені в Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (Харків). У роботі використовували розріджувачі: 1 — стандартний лактозо-жовтково-гліцериновий розріджувач; 2 — безжовтковий лактозо-цитратно-гліцериновий розріджувач. У якості сировини для одержання антишокового компоненту використовували насіння сої.

Виготовляючи експериментальні розріджувачі, насіння сої автоклаували за 1 атм. 30 хвилин, висушували до 1 %-ї вологості, після чого змелювали до борошна. Борошно розчиняли бідистильованою водою у співвідношенні 1:3. Екстрактивну масу перемішували протягом 1 години за температури 24 °С на магнітному змішувачі, а потім прогрівали на водяній бані за температури 65 °С протягом 30 хв. Після цього екстраговану суміш центрифугували за

7000 об/хв протягом 20 хвилин. Осад видаляли, а надосадову рідину (супернатант) використовували у дослідах з метою розріджування нативної сперми за Харківською технологією. Осмотичний тиск супернатанту вимірювали кріоскопічним методом, концентрацію водневих іонів — на іонометрі.

Компенсацію осмотичного тиску проводили додатковим внесенням сахарози в одержані супернатанти, після чого їх використовували як основу для кріопротективних середовищ. Загальним контролем було лактозо-жовтково-гліцеринове середовище. Одержаними зразками середовищ розбавляли дослідні проби сперми у співвідношенні 1:1, витримували їх за кімнатної температури протягом 5 хв, після чого додатково розбавляли сперму безжовтковим лактозо-цитратно-гліцериновим середовищем у співвідношенні 1:10. Оброблену таким чином сперму випробували на кріорезистентність та на здатність до заморожування у рідкому азоті за Харківською технологією, вивчаючи водночас вплив заморожування на рухливість сперміїв після деконсервації, виживаність статевих клітин за температури 38 °С. Антишокові властивості досліджуваного гідролізату насіння сої визначали за середніми показниками коефіцієнту резистентності сперміїв до різкого зниження температури [5]. Сперму на кріорезистентність визначали за нашою методикою.

Результати досліджень. Результати з вивчення стійкості сперміїв бугая до температурного шоку після обробки їх гідролізатом відображені у таблиці 1.

Таблиця 1 — Вплив гідролізату насіння сої на стійкість сперміїв бугая до температурного шоку ($M \pm m$, $n = 10$)

Рухли- вість нативної сперми	Рухли- вість сперміїв після холодо- вого шоку	R – коефіцієнт кріорези- стентності	Рухливість сперміїв після розбавлення		Рухливість сперміїв після шокування		R – коефіцієнт кріорезистентності	
			Середо- вище з жовтком (конт- роль)	Середо- вище з екстрак- том сої (дослід)	Середо- вище з жовтком (конт- роль)	Середо- вище з екстрак- том сої (дослід)	Середо- вище з жовтком (конт- роль)	Середо- вище з екстрак- том сої (дослід)
7,7±0,11	1,6±0,24	0,20±0,1	7,1±0,18	6,8±0,25	3,95±0,22	3,95±,14	0,55±0,1	0,58±0,24
Центрифужне відмивання	1	5,9±0,18	5,8±0,20	3,4±0,29	3,1±0,28	0,57±0,04	0,55±0,04	
	2	5,6±0,16	5,3±0,13	3,1±0,22	3,0±0,25	0,55±0,04	0,56±0,04	
	3	4,8±0,24	4,7±0,15	3,0±0,21	2,7±0,18	0,62±0,1	0,57±0,04	
	4	4,1±0,13	4,2±0,19	2,6±0,29	2,2±0,18	0,63±0,1	0,52±0,03	
	5	3,8±0,28	3,9±0,31	2,3±0,27	2,3±0,3	0,6±0,1	0,58±0,05	
Достовірність різниці (P)			> 0,5		> 0,5		> 0,5	

З матеріалів, представлених у таблиці 1 видно, що спермії оброблені гідролізатом сої здобувають стійкість до температурного шоку та зберігають її навіть після п'ятикратного відмивання сперміїв ізотонічними середовищами. Досліджуючи сперму бугая встановлено, що рухливість сперміїв оброблених гідролізатом сої після охолодження знижувалась з $6,8 \pm 0,11$ до $3,9 \pm 0,14$ балів, коефіцієнт кріорезистентності сперміїв до температурного шоку дорівнював $0,6 \pm 0,1$. Водночас у контролі без антишокового компоненту рухливість сперміїв спадала з $7,7 \pm 0,11$ до $1,6 \pm 0,24$ бали, а коефіцієнт резистентності сперміїв знижувався до $0,6 \pm 0,1$ одиниці за різниці ($P < 0,001$). Коефіцієнт резистентності сперміїв, оброблених нативним жовтком був на одному рівні з коефіцієнтом кріорезистентності отриманому на спермі, обробленій гідролізатом сої. Рухливість сперміїв бугая в середовищі з нативним жовтком до шоку становила $7,1 \pm 0,18$ балів, різниця між показниками рухливості статевих клітин була високо вірогідною ($P > 0,5$), водночас коефіцієнт кріорезистентності (R) становив 0,55. У досліді рухливість сперми, розбавленої розріджувачем з вмістом антишокового компоненту становили 6,8 балів, а після шоку $3,95 \pm 0,14$ балів, водночас коефіцієнт кріорезистентності становив 0,58, що було на рівні контролю.

Аналогічні результати отримані у дослідах зі спермою барана та кнура (таблиці 2 та 3).

Таким чином, проведені дослідження показали, що гідролізат насіння сої у концентрації 3 % має захисну дію на спермії бугая, барана та кнура на одному рівні з нативним жовтком.

Таблиця 2 — Вплив гідролізату насіння сої на стійкість спермійв барана до температурного шоку ($M \pm m$, $n = 7$)

Рухливість нативної сперми	Рухливість спермійв після холодового шоку	R – коефіцієнт кріорезистентності	Рухливість спермійв після розбавлення		Рухливість спермійв після шокування		R – коефіцієнт кріорезистентності		
			Середовище з жовтком (контроль)	Середовище з екстрактом сої (дослід)	Середовище з жовтком (контроль)	Середовище з екстрактом сої (дослід)	Середовище з жовтком (контроль)	Середовище з екстрактом сої (дослід)	
6,8±0,15	0,7±0,19	1,10±0,01	6,3±0,11	6,4±0,13	2,4±0,15	2,3±0,13	0,38±0,02	0,35±0,02	
Центрифужне відмивання			1	6,2±0,08	6,2±0,08	2,3±0,15	2,2±0,11	0,37±0,03	0,35±0,03
			2	5,5±0,17	5,5±0,24	1,8±0,16	1,6±0,23	0,32±0,10	0,29±0,03
			3	5,0±0,24	4,6±0,33	1,4±0,21	1,2±0,26	0,28±0,03	0,26±0,13
			4	4,4±0,25	4,1±0,22	1,01±0,20	0,6±0,13	0,22±0,13	0,14±0,09
			5	4,1±0,33	3,7±0,18	0,9±0,22	0,6±0,14	0,21±0,13	0,16±0,11
Достовірність різниці (P)			> 0,5		> 0,5		> 0,5		

Таблиця 3 — Вплив гідролізату насіння сої на стійкість спермійв кнур до температурного шоку ($M \pm m$, $n = 7$)

Рухливість нативної сперми	Рухливість спермійв після холодового шоку	R – коефіцієнт кріорезистентності	Рухливість спермійв після розбавлення		Рухливість спермійв після шокування		R – коефіцієнт кріорезистентності		
			Середовище з жовтком (контроль)	Середовище з екстрактом сої (дослід)	Середовище з жовтком (контроль)	Середовище з екстрактом сої (дослід)	Середовище з жовтком (контроль)	Середовище з екстрактом сої (дослід)	
6,6±0,31	0,3±0,003	0,045±0,02	6,5±0,34	6,6±0,43	2,6±0,3	2,7±0,3	0,40±0,05	0,40±0,03	
Центрифужне відмивання			1	6,8±0,4	6,1±0,6	2,6±0,4	2,8±0,4	0,41±0,04	0,45±0,03
			2	5,7±0,4	5,3±0,5	2,7±0,5	2,1±0,6	0,47±0,07	0,39±0,06
			3	4,3±0,5	4,4±0,5	1,2±0,3	1,3±0,2	0,27±0,03	0,29±0,04
			4	4,3±0,5	4,4±0,5	1,3±0,4	1,3±0,4	0,30±0,05	0,29±0,06
			5		4,4±0,5	1,4±0,4	1,2±0,4	0,30±0,07	0,27±0,06
Достовірність різниці (P)			> 0,5		> 0,5		> 0,5		

Щодо поетапного зниження якості сперми за досліджень у всіх зразках, то його слід віднести на рахунок механічного фактору (пошкодження спермійв під впливом центрифугування) про що свідчать результати, отримані у контролі, де сперму після кожного центрифугування знову змішували з середовищем зі вмістом яєчного жовтку.

Захисну дію гідролізату насіння сої можна пояснити утворенням на поверхні спермію гідрофобного ліпопротеїнового шару, який перешкоджає пошкоджуючим факторам при охолодженні, аналогічно використанню нативного жовтку, а збереження цього шару після багатократного відмивання свідчить про міцний хімічний зв'язок компонентів жовтка з мембранами спермійв. Таким чином, нашими дослідженнями визначено ступінь захисту спермійв компонентами гідролізату насіння сої від температурного шоку.

Як свідчать отримані дані, гідролізат насіння сої в якості компоненту середовища для розбавлення сперми замість курячого жовтка запобігає температурному шоку спермійв бугая, барана та кнур на одному рівні з 30 % концентрацією нативного жовтка.

Вивчаючи зв'язок антишокового компоненту з цитоплазматичними мембранами спермійв проводили багаторазове центрифужне відмивання його від спермійв ізотонічним цукрово-сольовим буфером з подальшим визначенням стійкості їх до температурного шоку. Водночас на спермі бугая коефіцієнт кріорезистентності становив після першого відмивання 0,57, після п'ятого — 0,57. У контролі ці показники були відповідно 0,55 і 0,61. Різниця між дослідом і контролем була статистично невірогідна ($P > 0,5$). Аналогічна залежність виявлена і в

дослідах на спермі барана і кнура. Показник рухливості спермійв бугая після розбавлення і подальших відмивках у дослідних і контрольних зразках вірогідно знижувався ($P < 0,01$), а коефіцієнт кріорезистентності лишився на одному рівні ($P > 0,5$). Дані дослідження вказують на те, що гідролізат насіння сої і нативний жовток захищають спермії бугая, барана і кнура від температурного шоку на однаковому рівні.

Аналіз експериментальних даних свідчить про те, що всі вивчені компоненти здатні захищати спермії від температурного шоку за їх гіпотермії як у зоні плюсових, так і в зоні субньюлових температур.

Висновки. 1. Встановлено, що ліпопротеїновий екстракт із сої проявляє властивість захищати статеві клітини від температурного шоку в умовах миттєвого зниження температури від 28 до 0 °C на одному рівні з нативним жовтком.

2. Встановлено пряму залежність осмотичного тиску в екстрактах від температури експозиції і умов екстрагування.

3. За умов заміни в кріопротективних середовищах нативного жовтка антишоковими компонентами рослинного походження забезпечується збереження високих біологічних показників сперми після відтаювання.

4. Використання фортифіканту рослинного походження плазматичних мембран замість нативного жовтка дає змогу застосувати прості і надійні способи стерилізації, запобігти забрудненню сперми і статевих шляхів самиць збудниками захворювань, які передаються з жовтком, таким чином підвищити санітарно-гігієнічний рівень штучного осіменіння.

Список літератури

1. Sperm Notes. Міжнародний інформаційний бюлетень зі штучного запліднення домашніх та сільськогосподарських тварин від фірми Minitub. 2005. № 10. С. 7–8.
2. Murphy E. M., O'Meara C., Eivers B., Lonergan P., Fair S. Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on *in vitro* sperm kinematics and *in vivo* fertility of frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci.* 2018. Vol. 191. P. 70–75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.010>.
3. Shakhova Yu. Yu., Paliy A. P., Paliy A. P., Shigimaga V. O., Kis V. M., Ivanov V. I. Use of multicomponent cryoprotective media during cryopreservation of murine embryos by vitrification. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2020. Vol. 30, No 2. P. 203–206. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.02.203>.
4. Sánchez-Calabuig M. J., Mailló V., Beltrán-Breña P., de la Fuente Martínez J., Galera-Carrillo S., Pérez-Gutiérrez J. F., Pérez-Cerezales S. Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. *Reprod Biol.* 2017. Vol. 17, No 3. P. 233–238. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.05.007>.
5. Layek S. S., Mohanty T. K., Kumaresan A., Parks J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim Reprod Sci.* 2016 Vol. 172. P. 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>.
6. Руденко Є. В., Осташко Ф. І., Сушко О. Б., Павленко Б. М., Ісаченко Є. В., Савельєва М. С., Павленко М. П., Кузнецов Г. М., Литвин Б. Я., Зубенко А. І., Олейніков В. П., Олексенко Т. І., Івченко М. Ф. Національна технологія кріоконсервації та використання сперми племінних плідників у системі крупномасштабної селекції (Харківська технологія асептичного одержання, кріоконсервації і зберігання сперми бугаїв в облицьованих гранулах та штучного осіменіння самиць). Харків: Інститут тваринництва НААН, 2011. 98 с.
7. Осташко Ф. І., Павленко М. П., Паленко Л. М. Методика визначення властивостей захисних компонентів в розріджувачах при дії низьких температур на спермії. *Нове в методах зоотехнічних досліджень.* 1992. С. 138–142.

ANTISHOCK EFFECT OF SOYBEAN EXTRACT DURING SPERM CRYOPRESERVATION OF DIFFERENT ANIMAL SPECIES

Pavlenko B. M., Pavlenko L. M., Kosheliev V. V., Borodai N. I., Fisenko S. A.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The results of the study of the fortification effect on the plasma membranes of sperm from bulls, rams, and boars treated with soybean seed hydrolysate after washing and after exposure to temperature changes on sperm are presented. It was found that the lipoprotein extract from soybeans has the ability to protect germ cells from temperature shock under conditions of instantaneous temperature drop from 28°C to 0°C at the same level as native yolk. The direct dependence of the osmotic pressure in the extracts on the exposure temperature and extraction conditions was established. The replacement of native yolk in cryoprotective media with anti-shock components of plant origin ensures the preservation of high biological parameters of sperm after thawing. The use of a plant-derived plasma membrane fortifier instead of native yolk makes it possible to apply simple and reliable methods of sterilization, prevent contamination of sperm and female genital tract with yolk-transmitted pathogens, and thus increase the sanitary and hygienic level of artificial insemination

Keywords: sperm, cryopreservation, diluents, lipoproteins, temperature shock, soybean extract