ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ «АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ СУЧАСНОЇ БІОЛОГІЇ, ТВАРИННИЦТВА ТА ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ», 2–3 жовтня 2014 р., Львів

УДК 591.133.2:612.616:636.4:591.113.13

ШЛЯХИ ПОКРАЩЕННЯ УМОВ ДЛЯ ДОВГОТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ СПЕРМИ КНУРІВ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ

О. Б. Андрушко, к. б. н., с. н. с., *М. М. Шаран*, д. с-г. н., с. н. с., *С. Б. Корнят*, к. с-г. н, с. н. с.
a.andrushko@inenbiol.com.ua
Інститут біології тварин НААН

Метод штучного осіменіння набуває щораз ширшого застосування у свинарстві, а проблема довготривалого зберігання сперми кнурів стала виробничою необхідністю. У зв'язку з цим питання заморожування сперми даного виду тварин є актуальним, оскільки технологія кріоконсервації сперми кнурів все ще є недостатньою. Висока ефективність замороженої сперми суттєво залежить від складу синтетичних середовищ, призначення яких полягає у тому, щоб забезпечити надійний захист сперміїв від негативних факторів зовнішнього середовища. Метою досліджень було вивчення впливу моно, ди- та трисахаридів у складі середовища для кріоконсервації сперми кнурів на активність, переживаність та цілісність цитоплазматичних мембран сперміїв.

Сперму для досліджень відбирали мануальним методом від 4 кнурів породи ландрас віком 2–4 роки у ЛНВЦ «Західплемресурси». Свіжоотримані еякуляти другої фракції оцінювали за об'ємом, активністю та концентрацією. Заморожували еякуляти концентрацією та активністю не менше200 млн/мл та 70 % відповідно із кількістю патологічних форм не більше 15 % сперміїв. Створено 7 серій дослідних зразків, які відрізнялись за собою за введеним вуглеводом(лактоза, глюкоза, фруктоза, рамноза, тригалоза, сахароза, рафіноза), які додавали до розбавника сперми у еквімолярних концентраціях (310 мМ). Еквілібрацію проводи при 5 °С протягом 120 хв. Сперму заморожували у соломинках на програмному заморожувані з перенесенням у рідкий азот (–196 °С). Деконсервацію сперміїв здійснювали на водяній бані при 50°С. На всіх етапах заморожування сперми (перед, після еквілібрації та розморожування) брали зразки спермії для мікроскопії.

Розбавлення сперми кнурів середовищем із досліджуваним цурками та наступною еквілібрацією незначно впливало на зміну активності сперміїв. Кращі результати отримані при додаванні до середовища глюкози (65,4 %) і сахарози (59,4 %). Додавання до сперміїв рамнози і фруктози знизило активність сперміїв до 9,8 % і 9,12 % відповідно. Найвища переживаність сперміїв кнура після реконсервації була при додаванні глюкози — 6,1 год та сахарози 6,1 год, а найнижча при додаванні рамнози — 4,4 год і трегалози 4,2 год. Глюкоза та сахароза у складі середовища для кріоконсерваціїї проявили максимальну кріопротекторну дію на спермії кнура при заморожуванні. Кількість сперміїв з ушкодженими мембранами після деконсервації в окремих зразках зростала у групі із додаванням глюкози (25,2 %), сахарози (28,3 %), лактози (59,1 %), фруктози (68,4 %). У двох останніх зразках отримано гірші результати відповідно в 6,3 і 7,8 разів.

У зразках середовищ для заморожування сперми кнурів у склад яких входила глюкоза або сахароза виявлено вищий рівень активності сперміїв після деконсервації та триваліший час переживаності.

Спостерігався менший відсоток сперміїв з ушкодженою мембраною, що вказує на кращу мембрано протекторну дію глюкози та сахарози у порівнянні з іншими вуглеводами.

Найнижчий захисний ефект на спермії за всіма показниками має рамноза, а також відповідно фруктоза трегалоза та рамноза.

Доцільним є використання глюкози або сахарози у складі середовищ для заморожування сперми кнурів.

УДК 547.426.1:612.111

МЕХАНІЧНЕ ПОШКОДЖЕННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

Н. М. Шпакова, к. б. н., с. н. с., *О. Є. Нігот*, к. б. н., с. н. с.,
Н. В. Орлова, к. б. н., с. н. с.
nipotel71@gmail.com
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Вивчення стресового впливу на клітини є доволі актуальною проблемою сучасної біології. Еритроцити людини є чи не найпоширенішим об`єктом дослідження у цьому напрямку. Еритроцити тварин менш досліджені. Не дивлячись на те, що функціональне навантаження еритроцитів як людини так і тварин подібне, вони значно відрізняються за складом мембран, транспортними функціями, тощо. Виходячи з цього можна припустити, що реакція еритроцитів ссавців на стрес буде різною. Механічний стрес тісно пов`язаний зі здатністю клітин до деформації. Незначний ступінь механічного стресу спостерігається навіть в фізіологічних умовах при проходженні клітин по вузькім капілярам. При захворюваннях, пов`язаних зі зміною реологічних властивостей крові (низка інфекційних та паразитарних захворювань), здатність клітин до деформації значно знижується, наслідком чого є зростання механічного впливу на еритроцити при проникненні у капіляри.

Метою роботи було дослідження чутливості еритроцитів людини, бика, коня, щура і кролика до механічного стресу шляхом визначення рівня гемолізу та вивільнення іонів калію під час стресового впливу.

У роботі еритроцити ссавців піддавали механічному впливу шляхом перемішування клітинної суспензії в середовищі, що містило 0,15 М NaCl. Перемішування здійснювали в ємності з пластиковими кульками при кімнатній температурі (21±2 °С)і за допомогою магнітної мішалки протягом 60. Через певні проміжки часу з клітинної суспензії відбирали аліквоту для визначення вмісту гемоглобіну та іонів калію. Вміст гемоглобіну визначали спектрофотометрично. Вміст іонів калію визначали за допомогою іонселективного калієвого електроду.

Для еритроцитів усіх досліджених ссавців спостерігалося зростання виходу гемоглобіну та вивільнення іонів калію при збільшенні часу механічного впливу на клітини. Нетривале інкубування не приводило до втрати іонів калію еритроцитами людини, кролика та коня. Для еритроцитів щура рівень втрати іонів калію становив 22±3 %, бика — 10±2 %. При цьому гемолітичного пошкодження клітин не спостерігалося. При 30-хвилинному інкубуванні для еритроцитів людини, кролика та коня рівень виходу калію відповідав рівню гемолізу клітин і складав 13±2 %, 12±2 % і 17±3 % відповідно. Тобто втрата клітинами іонів калію відбувалася тільки за рахунок руйнування клітин. Для еритроцитів щура в даних умовах рівень виходу катіонів калію складав 33±3 % при рівні гемолізу 20±2 %. Для еритроцитів бика — 40±5 % та 10±2 % відповідно. Після 60 хвилин інкубації в умовах механічного стресу тільки для еритроцитів кролика рівень вивільнення іонів калію співпадав з рівнем гемолізу клітин та становив 20±3 %. Еритроцити інших ссавців характеризувалися різними рівнями виходу калію та гемоглобіну. Для еритроцитів людини рівень вивільнення іонів калію складав 38±4 % при рівні гемолітичного пошкодження 27±4 %. Для еритроцитів коня ці параметри складали 30±3 % та 20±2 %, щура 42±4 % та 30±3 %, бика 65±6 % та 20±2 % відповідно.

Аналізуючи представлені вище дані, можна сказати, що еритроцити досліджених ссавців значно відрізнялися за реакцію на механічний стрес. Для еритроцитів усіх ссавців, крім кролика, спостерігалася наявність двох субпопуляцій клітин. Еритроцити, що належать одній з субпопуляцій під дією механічного впливу пошкоджувалися повністю (спостерігався гемоліз клітин), еритроцити, що належали до іншої субпопуляції, пошкоджувалися частково (спостерігався тільки вихід іонів калію). У цілому до механічного впливу найбільш стійкими виявилися еритроцити кролика, рівень пошкодження яких за обома параметрами (рівень гемолізу та вивільнення іонів калію) був найменшим. Найбільш чутливими до механічного стресу за параметром гемолітичного пошкодження були еритроцити щура, за параметром вивільнення іонів калію — еритроцити бика.

Таким чином, рівень пошкодження еритроцитів ссавців при механічному стресі визначався видом досліджуваного ссавця та параметром, за яким оцінювалося це пошкодження. Наявність незначного пошкодження клітин за одним параметром (наприклад, цілісність клітин) не гарантувало відсутності «прихованих» пошкоджень, які виявлялися додатковими методами (наприклад, вивільнення іонів калію). Це ще раз підкреслює важливість всебічного дослідження клітин при дії стресових факторів.