

ЛИЗОГУБ О. Ю.[✉], ЩЕРБАК О. В., КОВТУН С. І., ТРОЦЬКИЙ П. А.

Інститут розведення та генетики тварин імені М.В. Зубця НААН,

Україна, 08321, Київська область, с. Чубинське, вул. Погребняка, 1, ORCID: 0000-0001-6400-8990, 0000-0002-5492-882X, 0000-0002-1569-3116

[✉] oksanalyzohub@gmail.com, 0930075370

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СЕРЕДОВИЩ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ДЕКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ

Мета. Вивчити вплив різних культуральних середовищ на якісні показники деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів *in vitro*. **Методи.** Під час проведення досліджень були використані біотехнологічні, кріобіологічні та морфологічні методи, а також методи статистичної обробки даних. **Результати.** Проведено дослідження з ефективності застосування різних середовищ для підготовки деконсервованих сперматозоїдів кнурів до запліднення *in vitro*. Після флотації в середовищі TALP без Ca^{2+} отримано живих сперматозоїдів $71 \pm 2,58$ млн у 1 мл, в разі застосування середовища Sperm Preparation Medium (Origio, Denmark) було отримано на 49,7 млн сперматозоїдів менше. Рухливість сперматозоїдів була вищою в разі застосування середовища Sp-TALP ($9,7 \pm 0,86$ %) порівняно з TALP без Ca^{2+} ($5 \pm 1,49$ %) та Sperm Preparation Medium ($0,7 \pm 0,86$ %). Після відмивання в середовищі Sp-TALP концентрація сперматозоїдів в 1 мл становила $69,7 \pm 3,1$ млн, а кількість сперматозоїдів, які можуть бути використані для запліднення становить $6,8 \pm 0,56$ млн в 1 мл. **Висновки.** Показано, що за допомогою комбінації різних підходів до маніпуляцій з деконсервованими еякульованими сперматозоїдами кнурів можливо досягти прийнятної життєздатності для забезпечення високого рівня запліднення поза організмом. Встановлено, що оптимальним середовищем для відбору сперматозоїдів методом флотації є Sp-TALP, в якому отримано $69,7 \pm 3,1$ млн/мл сперматозоїдів з яких $6,8 \pm 0,56$ млн/мл були рухливими.

Ключові слова: сперматозоїд, середовище Sp-TALP, концентрація, рухливість, інкубація.

Кріопшкодження сперматозоїдів зазвичай спостерігають після процедури заморожування-розморожування, але не всі вони ушкоджуються однаковою мірою [1]. У різних дослідженнях наводяться дані щодо значних відмін-

ностей у виживаності кріоконсервованих еякульованих сперматозоїдів після розморожування (від 25 % до 60 %). Хоча відмінності між методами заморожування, такими як кріоконсервація в парах рідкого азоту або на сухому льоду, порівняно з програмним заморожуванням з контрольною швидкістю, можуть сприяти деяким з цих відмінностей, основна детермінанта, яку наводять більшість світових вчених знаходиться в кожному індивідуальному еякуляті кнура [2]. Слід зазначити, що кожен еякулят кнура демонструє унікальну кріорезистентність з очевидними відмінностями між породною приналежністю тварини та між еякулятами однієї особи [2, 3].

Еякуляти кнурів класифікують за якістю сперми після процедури заморожування-розморожування, що визначається як «придатність до заморожування» або кріорезистентність, тобто стійкість до кріоконсервації [4–6]. Застосування цього показника допомагає уникнути проведення штучного запліднення еякулятом, який погано заморожується, оскільки запліднювальна здатність його різко знижується [7]. Кріорезистентність свіжоотриманої сперми складно передбачити, тому можуть бути збільшені витрати в разі кріоконсервації поганих еякулятів з досить високою частотою.

Отже, значні зусилля вчених спрямовані на визначення кріомаркерів, які допомагають передбачити кріорезистентність свіжоотриманого еякуляту.

Ідентифікація маркерів придатності до кріоконсервації зосереджена на білках сперматозоїдів та спермальної плазми, які опосередковують реакції гамет на осмотичний та тепловий стрес, хоча достовірний механізм, за допомогою якого вони виконують свою роль, залишається значною мірою нерозкритим [2]. Наприклад, у сперми кнурів відносно велика кількість білків, один з них білок теплового шоку 90. Цей білок зв'язує акрозин, триозофосфат ізомеразу та вольтаж-залежний аніонний канал 2 у свіжоотри-

© ЛИЗОГУБ О. Ю., ЩЕРБАК О. В., КОВТУН С. І., ТРОЦЬКИЙ П. А.

маному еякуляті, та є індикатором кріорезистентності еякулятів до заморожування [8–10]. Крім того, активність специфічного для сперми кнурів ферменту, акрозину, у свіжоотриманій спермі пов'язана з її стійкістю до заморожування-розморожування [11, 12]. Показано, що високий вміст окремих білків спермальної плазми, наприклад фібронектину 1, й активність специфічних ферментів, таких як N-ацетил- β -гексозамінідаза в еякулятах кнурів пов'язані із підвищеною кріорезистентністю та придатністю до заморожування [13, 14].

Наразі технологія кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів широко не застосовується для промислового розведення свиней. Такий підхід частіше застосовують в програмах зі збереження аборигенних порід чи в разі збереження генетичних ресурсів високоцінних особин. Тому підхід із тестування свіжоотриманих еякулятів на кріотолерантність та придатність до заморожування не завжди застосовують. Після процедури заморожування-розморожування часто такий генетичний матеріал демонструє невисокі показники життєздатності, адже в переважній кількості випадків використовується для генетичних досліджень. У разі використання деконсервованих сперматозоїдів зі зниженою життєздатністю в програмах із отримання ембріонів поза організмом необхідно проводити дослідження з підвищення їх життєвого потенціалу та фертильності. Отже, метою досліджень було вивчити якісні показники деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів за застосування різних культуральних середовищ за температури культивування $+37^{\circ}\text{C}$.

Матеріали і методи

У дослідженнях використано деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура миргородської породи Камиш 253. Генетичний матеріал зберігався у Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ ім. М. В. Зубця НААН. Сперматозоїди розморожували на водяній бані за температури $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв до повного розморожування.

Відокремлення деконсервованих сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили у трьох різних середовищах: у середовищі Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988), TALP без Ca^{2+} Ковтун С. І. та ін. (2005) та Sperm

Preparation Medium (Origio, Denmark) (табл. 1) методом «swim-up».

Для цього розташовували пробірку з 2 мл теплового середовища ($+37^{\circ}\text{C}$) під кутом 45° . Відбір сперматозоїдів від розріджувача та кріоконсерванта проводили у трьох середовищах на дно пробірки підшаровували 0,2 мл розмороженої суспензії сперматозоїдів та на 15 хв залишали в термостаті за температури $+37^{\circ}\text{C}$.

Після цього проводили оцінку рухливості та визначали концентрацію сперматозоїдів з використанням камери Маклера. Підрахунок проводили у трьох повторях при збільшенні в 400 разів.

Для всіх зразків проводили обчислення середнього арифметичного значення та значення середньоквадратичної помилки ($M \pm m$). Отриманий цифровий матеріал статистично опрацьовували із застосуванням пакета програм Microsoft Office Excel 2010.

Результати та обговорення

Сперма кнурів чутлива до низьких температур, і безумовно є важливим розробка ефективних методів кріоконсервації. Але вплив таких факторів як відмивання сперматозоїдів після розморожування, температура інкубації теж впливає на показники життєздатності сперматозоїдів, наприклад, такі як збільшення фрагментації ДНК сперматозоїда, що у свою чергу впливає на ефективність запліднення.

Після відмивання деконсервованої суспензії сперматозоїдів за температури $+37^{\circ}\text{C}$ у трьох різних середовищах ми отримали дані які наведені в таблиці 2.

За використання середовища Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988) та TALP без Ca^{2+} для флотації життєздатних сперматозоїдів концентрація їх була майже на однаковому рівні та становила, 69,7 та 71,0 млн/мл, відповідно. У разі використання середовища Sperm Preparation Medium отримано значно нижчі показники концентрації сперматозоїдів, а саме 21,3 млн/мл.

Найвищу рухливість сперматозоїдів на рівні 9,7 % спостерігали у середовищі Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988). У середовищі Sperm Preparation Medium було отримано показники рухливості сперматозоїдів у 13,8 разів нижче, ніж за використання середовища Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988).

Таблиця 1. Склад середовищ для відокремлення деконсервованих сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача (мг на 20 мл води)

Компоненти фірми Sigma (номер за каталогом)	TALP без Ca^{2+}	Sp-TALP Parrish J.J.
1. Хлорид натрію, NaCl (S 5886)	130,9	117,0
2. Хлорид калію, KCl (S 5405)	4,0	4,62
3. Гідросульфат натрію, NaHCO_3 (S 5761)	42,0	42,0
4. Дигідрофосфат натрію, NaH_2PO_4 (S 5011)	0,94	0,82
5. Лактат натрію, 60 % сироп (L 7900)	11,2	—
6. Хлорид магнію, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (M 2393)	2,0	1,62
7. Хлорид кальцію, $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (C 7902)	—	5,88
8. Нерес (H 9136)	24,0	47,6
9. Феноловий червоний (P 3532)	0,15	—
10. Канаміцин сульфату (P 5530)	1,5	—
11. Піруват натрію (P 5280)	2,2	2,2
12. БСА (A 6003)	120,0	120,0
13. Глюкоза (G 7021)	50,0	—
14. Гентаміцин (p-n)	—	20,0 мл

Таблиця 2. Кількісні показники сперматозоїдів після флотації в різних середовищах

Середовище	Концентрація (млн/мл)	Рухливість (%)	Рухливість (млн/мл)
Sp-TALP Parrish J. J. et al. (1988)	69,7±3,1*	9,7±0,86*	6,8±0,56
TALP без Ca^{2+}	71,0±2,58*	5,0±1,49*	3,56±0,27
Sperm Preparation Medium, Origio	21,3±2,27*	0,7±0,86*	0,15±0,13

Примітка. *відмінності в межах однієї колонки достовірні при $p < 0,01$.

Рухливість сперматозоїдів на рівні 5,0 % спостерігали за використання середовища для флотації TALP без Ca^{2+} .

Під час запліднення важливим є не лише показник загальної рухливості сперматозоїдів, а також кількості таких рухливих сперматозоїдів в 1 мл. За використання середовища Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988) цей показник був на рівні 6,8±0,56 млн в 1 мл. За флотації сперматозоїдів у середовищі Sperm Preparation Medium кількість рухливих сперматозоїдів в 1 мл була лише 0,15±0,13 млн/мл. За використання середовища TALP без Ca^{2+} цей показник був на рівні 3,56±0,27 млн в 1 мл.

Слід зазначити, що найвищу загальну кількість сперматозоїдів отримано в середовищі TALP без Ca^{2+} , 71,0 ± 2,58 млн/мл.

Найвищу кількість рухливих сперматозоїдів після застосування методу флотації отримано в середовищі Sp-TALP Parrish J. J. et al. (1988) цей показник становив 6,8±0,56 млн/мл. На нашу думку, така кількість рухливих сперматозоїдів може забезпечити високий рівень запліднення поза організмом, бо для результативного запліднення однієї яйцеклітини вирішальним показником є не кількість сперматозоїдів,

а здатність до запліднення. Також, застосовуючи такі підходи можливо зменшити рівень поліспермії, яка є однією з найбільш частих «аномалій» під час запліднення поза організмом у свиней.

Висновки

1. За допомогою комбінації різних підходів до маніпуляцій з деконсервованими еякульованими сперматозоїдами кнурів можливо досягти достатньої їх життєздатності для забезпечення високого рівня запліднення поза організмом.

2. Встановлено, що оптимальним середовищем для відбору сперматозоїдів методом флотації є Sp-TALP Parrish J. J. et al. (1988), у якому отримано 69,7±3,1 млн/мл сперматозоїдів з яких 6,8±0,56 млн/мл були рухливими.

3. Показано, що застосування комерційного середовища Sperm Preparation Medium не доцільно застосовувати для відбору сперматозоїдів методом флотації, за його застосування отримано найнижчу концентрацію сперматозоїдів 21,3±2,27 млн/мл з найменшою кількістю рухливих (0,15±0,13 млн/мл).

References

1. Knox R. V. The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015. Vol. 50 (Suppl 2). P. 90–97. <https://doi.org/10.1111/rda.12552>
2. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 2016. Vol. 85 (1). P. 47–64. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.047.
3. Yeste M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: State of the art and current perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015. Vol. 50 (Suppl 2). P. 71–79. <https://doi.org/10.1111/rda.12569>.
1. 12. Pinart E., Yeste M., Bonet S., Acrosin is a good predictor of boar sperm freezability. *Theriogenology*. 2015. Vol. 83 (9). P. 1525–1533. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.005>.
4. Watson P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their postthawing function. *Reproduction Fertility and Development*. 1995. Vol. 7 (4). P. 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>.
5. Casas I., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*. 2009. Vol. 72 (7). P. 930–948. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.001>.
6. Yeste M., Estrada E., Casas I., Bonet S., Rodríguez-Gil J. E. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*. 2013. Vol. 79 (6). P. 929–939. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.008>.
7. Casas I., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S. Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Animal Reproduction Science*. 2010. Vol. 118 (1). P. 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.003>.
8. Casas I., Sancho S., Ballester J., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Fàbrega A., Rodríguez-Gil J. E., Bonet S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*. 2010. Vol. 74 (6). P. 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.021>.
9. Vilagran I., Castillo J., Bonet S., Sancho S., Yeste M., Estanyol J. M., Oliva R. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*. 2013. Vol. 80 (5). P. 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.006>.
10. Vilagran I., Yeste M., Sancho S., Casas I., Rivera del Álamo M. M., Bonet S. Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage-dependent anion channel 2 with semen freezability in boars. *Theriogenology*. 2014. Vol. 82 (3). P. 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.023>.
11. Estrada E., Rodríguez-Gil J. E., Rivera Del Álamo M. M., Peña A., Yeste M. Effects of reduced glutathione on acrosin activity in frozenthawed boar spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 2015. Vol. 29 (2). P. 283–293. <https://doi.org/10.1071/RD15118>.
12. Vilagran I., Yeste M., Sancho S., Castillo J., Oliva R., Bonet S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*. 2015. Vol. 3 (2). P. 345–356. <https://doi.org/10.1111/andr.12009>.
13. Wysocki P., Orzolek A., Strzeżek J., Kozirowska-Gilun M., Zasiadczyk Ł., Kordan W. The activity of N-acetyl- β -hexosaminidase in boar seminal plasma is linked with semen quality and its suitability for cryopreservation. *Theriogenology*. 2015. Vol. 83 (7). P. 1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.025>.

LYZOHUB O. Y., SHCHERBAK O. V., KOVTUN S. I., TROTSKYI P. A.

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M. V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 08321, Kyiv region, Boryspil district, Chubynske village, Pohrebniaka str., 1

STUDY ON THE IMPACT OF DIFFERENT CULTURAL MEDIUMS ON THE VIABILITY OF THAWED BOAR SPERMATOZOA

Aim. To study the impact of different culture media on the qualitative indicators of thawed ejaculated spermatozoa of boars *in vitro*. **Methods.** Biotechnological, cryobiological, and morphological methods, along with statistical data processing techniques, were used during the research. **Results.** Research was conducted on the effectiveness of different media for preparing thawed boar spermatozoa for *in vitro* fertilization. Flotation in TALP medium without Ca^{2+} yielded 71 ± 2.58 million live spermatozoa per ml, while the Sperm Preparation Medium (Origio, Denmark) resulted in 49.7 million fewer spermatozoa. Sperm motility was higher in the Sp-TALP medium ($9.7 \pm 0.86\%$) compared to TALP without Ca^{2+} ($5 \pm 1.49\%$) and the Sperm Preparation Medium ($0.7 \pm 0.86\%$). After washing in Sp-TALP medium, the sperm concentration per ml was 69.7 ± 3.1 million, with 6.8 ± 0.56 million spermatozoa suitable for fertilization. **Conclusions.** The study demonstrated that by combining different approaches to handling thawed ejaculated boar spermatozoa, acceptable viability can be achieved for efficient *in vitro* fertilization. Sp-TALP was identified as the optimal medium for sperm flotation, yielding 69.7 ± 3.1 million/ml spermatozoa, of which 6.8 ± 0.56 million/ml were motile.

Keywords: spermatozoa, Sp-TALP medium, concentration, motility, incubation.