НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В. ЗУБЦЯ

О. В. Щербак, О. Ю. Лизогуб, С. І. Ковтун П. А. Троцький

ПІДГОТОВКА ДЕКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO*

Методичні рекомендації

Чубинське, 2023

УДК 636.4:591.463.1:57.085.2
П 32

Методичні рекомендації розробили:
О. В. Щербак, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;
О. Ю. Лизогуб, здобувач наукового ступеня доктора філософії;
С. І. Ковтун, доктор с.-г. наук, професор, академік НААН;
П. А. Троцький, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник.
(Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН).

Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (протокол № 10 від 28 листопада.2023 року).

Підготовка деконсервованих сперматозоїдів кнурів до запліднення
П 32 *in vitro*/ О. В. Щербак, О. Ю. Лизогуб, С. І. Ковтун, П. А. Троцький. Чубинське : ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН, 2023. 24 с.

У рекомендаціях узагальнено методичні підходи щодо підготовки деконсервованих сперматозоїдів до запліднення *in vitro*. Представлено результати використання методу відбору сперматозоїдів в трьох різних середовищах та отримання фракції прогресивно рухливих гамет з нормальною структурою хроматину для одержання ембріонів *in vitro*. Показано, що для раціонального використання племінних (генетичних) ресурсів у свинарстві необхідно розробляти та удосконалювати біотехнологічні методи відтворення з метою подальшого впровадження їх в практику.

Рекомендації розраховані на спеціалістів з біотехнології відтворення людини та сільськогосподарських тварин, науковців, викладачів, студентів і аспірантів та докторантів закладів вищої освіти біологічного й аграрного профілів, а також для зооветеринарних спеціалістів, ембріологів, техніків з трансплантації ембріонів людини та тварин.

Рецензенти:

Войтенко Світлана Леонідівна – доктор с.-г. наук, професор, завідувач відділу інтелектуальної власності, маркетингу інновацій та аспірантури Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН.

Копилов Кирило В'ячеславович – доктор с.-г. наук, професор, головний науковий співробітник відділу генетики та біотехнології тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН.

УДК 636.4:591.463.1:57.085.2
© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, 2023 р.

ЗМІСТ

	Стор
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……	4
ВСТУП……..……	5
1. ВИЛУЧЕННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ІЗ ЕЯКУЛЯТУ ЛЮДИНИ ЯК МОДЕЛЬ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ГАМЕТ ССАВЦІВ……..……..	7
2. ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO* СПЕРМАТОЗОЇДІВ, ОТРИМАНИХ РІЗНИМИ МЕТОДАМИ…….....	12
3. ВПЛИВ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ФЛОТАЦІЇ НА ДЕКОНСЕРВОВАНІ ЕЯКУЛЬОВАНІ СПЕРМАТОЗОЇДИ КНУРА …….…….	15
ВИСНОВКИ …….	19
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ ……..	20

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК	активна форма кисню
ДНК	дезоксирибонуклеї́нова кислота́
ІФ	індекс фрагментації
BSA	bovine serum albumin (альбумін сироватки крові великої рогатої худоби)
in vitro	характеристика певного біологічного процесу, змодельованого поза організмом
in vivo	характеристика певного біологічного процесу, який відбувається в організмі
IVC	*in vitro* culture – *in vitro* культивування
IVF	*in vitro* fertilization – *in vitro* запліднення
IVM	*in vitro* maturation – *in vitro* дозрівання
IVP	*in vitro* production – *in vitro* отримання ембріонів

ВСТУП

Відомо, що кріопошкодження сперматозоїдів кнурів зазвичай спостерігають після деконсервації, але не всі зазнають однакових пошкоджень [1]. Відомо про значні відмінності у виживаності деконсервованих еякульованих сперматозоїдів (від 25% до 60%). Хоча відмінності між методами заморожування (кріоконсервація в парах рідкого азоту або на сухому льоду), порівняно з програмним заморожуванням з контрольованою швидкістю, можуть сприяти деяким з цих відмінностей, основна детермінанта, яку наводять більшість світових вчених знаходиться в кожному індивідуальному еякуляті кнура [2]. Слід відмітити, 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 кріоконсервації, що визначається як «придатність до заморожування» або кріорезистентність, стійкість до кріоконсервації [4, 5, 6]. Застосування цього показника допомагає уникнути проведення штучного запліднення еякулятом, який неякісно заморожується, оскільки запліднювальна здатність його різко знижується [7].

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

Ідентифікація маркерів придатності до кріоконсервації зосереджена на білках сперматозоїдів та спермальній плазмі, 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, в 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 свіжоотриманому еякуляті, відрізняється між еякулятами з хорошою та поганою здатністю до заморожування [8, 9, 10]. Крім того, активність специфічного для сперми кнурів ферменту акрозину у свіжоотриманій спермі пов’язана з її стійкістю до кріоконсервації [11, 12]. Встановлено, що високий вміст окремих білків спермальної плазми, наприклад фібронектину 1 та 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. Такій 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 кріоконсервації часто такий генетичний матеріал демонструє невисокі показники життєздатності адже в переважній кількості випадків використовується для генетичних досліджень. В разі використання деконсервованих сперматозоїдів зі зниженою життєздатністю для 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 із застосуванням різних культуральних середовищ за температури культивування +37°С.

Одним із складових сім'яної рідини є присутній у ній трофобластичний b-1-глікопротеїн, який негативно впливає на запліднювальну здатність сперматозоїдів шляхом зниження активності ферменту акрозину. Акрозин – унікальна нейтральна протеїназа. Він розташовується в акросомальній ділянці головки сперматозоїда на внутрішній мембрані у формі неактивного ферменту (проакрозину), який при звільненні з акросоми перетворюється на акрозин. Встановлено, що активність акрозину високо корелює із частотою запліднення. Використання найбільш раціональної технології обробки (відмивання) сперми, у процесі якої ефективно виділяються повноцінні та функціонально активні сперматозоїди з еякуляту – це необхідна умова повноцінного запліднення *in vitro*.

Рекомендації розроблено в рамках завдання 31.03.00.06.П «Удосконалити технології кріоконсервації ембріонів вітчизняних порід свиней із застосуванням методу *in vitro*» (№ ДР 0121U107830) ПНД 31 НААН «Генетика, збереження та відтворення біоресурсів у тваринництві» (підпрограма 3 «Біотехнологія відтворення сільськогосподарських тварин», 2021–2023 рр.).

1. ВИЛУЧЕННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ІЗ ЕЯКУЛЯТУ ЛЮДИНИ ЯК МОДЕЛЬ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ГАМЕТ ССАВЦІВ

Одним з найважливіших факторів для визначення успіху під час запліднення та розвитку ембріона є якість статевих клітин. Неякісно підготовлені сперматозоїди не забезпечать отримання повноцінних ембріонів. Успішне запліднення та подальший розвиток ембріона можливі лише за умови повноцінної структури хроматину сперматозоїдів. Еякулят – це порція сперматозоїдів і плазми, що виділяється з уретри під час еякуляції. Для виділення сперматозоїдів із еякулята застосовують відмивання від сім'яної плазми шляхом центрифугування в градієнті щільності та метод «swim-up» (спливання). Важливою умовою під час вибору того чи іншого методу є збереження життєздатності, найвищої активності та повноцінної структури хроматину сперматозоїдів.

Досить часто застосовують метод центрифугування (1700 g), який дозволяє еякулят розділити на сперматозоїди та спермоплазму. Далі сперматозоїди відмивають двічі фізіологічним розчином, або після розведення сперми в 0,9% NaCI (1:1) відокремлення проводять центрифугуванням за 400 g упродовж 5 хв. Це найпростіший метод виділення сперматозоїдів із якуляту і найчастіше застосовується до еякуляту з високими фізіологічними показниками. До недоліків методу відносять утворення активних форм кисню (АФК) в осаді клітин після центрифугування, а також осідання разом з рухомими сперматозоїдами потенційно токсичних клітин та мертвих сперматозоїдів, що може мати негативний ефект на їх життєздатність.

Одним із напрямків оптимізації відокремлення сперматозоїдів є розробка методів, що дозволяють з найбільшою ефективністю виділити з еякуляту фракцію прогресивно рухливих сперматозоїдів, що використовується для запліднення ооцитів, яка мала б найкращі показники життєздатності. Тому найбільш широко застосовувують для отримання рухомих фракцій спосіб спливання «swim-up», чи фракціонування еякуляту в градієнті щільності з використанням препарату «Percoll» або «PureSperm».

Центрифугування сперми в градієнті щільності забезпечує відбір активних повноцінних сперматозоїдів. Метод ґрунтується на принципі центрифугування сперми через градієнт, утворений двома-

трьома шарами розчинів із зростаючою щільністю (маса/об'єм), що містять різні концентрації частинок колоїдного кремнію. Таким чином, підхід заснований на поділі клітин еякулята за їхньою питомою вагою та щільністю.

В разі методу градієнтного центрифугування еякулят розташовується поверх градієнта. Під час центрифугування різні клітини займають певне положення, в якому їхня плавуча щільність відповідає щільності градієнта. Поділ заснований на тому, що зрілі сперматозоїди мають щільну упаковку ДНК і більшу щільність, ніж 80% розчин, тому проходять крізь нього і осідають на дні пробірки. Сперматозоїди, які одержані на дні пробірки, мають найбільшу рухливість. Градієнтне центрифугування застосовується багатьма лабораторіями IVF як штатний спосіб обробки сперми низької якості.

У лабораторних умовах розчини препарату «Percoll» готують на HBS + BSA буфері з pH 8,0 (0,13 M NaCl, 0,004 M KCl, 0,001 M $CaCl_2$, 0,0005 M $MgCl_2$, 0,014 M фруктози, 0,01 M N-2-гідроксіетилпіперазин-N′-2-етансульфонової кислоти та 1 мг/мл сироваткового альбуміну великої рогатої худоби).

«PureSperm» складається з колоїдного розчину двоокису кремнію в збалансованому розчині солей та буфера «HEPES». Для досягнення найкращих результатів градієнт слід готувати безпосередньо перед використанням та підігріти до кімнатної температури.

Методика виділення сперматозоїдів з еякулята методом центрифугування в градієнті щільності з використанням «PureSperm» полягає в наступному:

1. Сперму інкубують за температури +37°C упродовж 30 хв для розрідження.

2. Готують два градієнти: наприклад, 1,5 мл 40% компонента та 1,5 мл 80% компонента в пробірці з конічним дном.

3. Розріджений еякулят обережно, не порушуючи розділення шарів, нашаровують на градієнт.

4. Центрифугують при 300 g упродовж 20 хв. Після центрифугування на дні конічної пробірки утворюється осад із найбільш рухомої фракції сперматозоїдів.

5. Пастерівською піпеткою обережно видаляють сім’яну плазму, а також верхню інтерфазу, 40% шар та нижню інтерфазу. Залишають основну частину 80% шару.

6. Чистою стерильною піпеткою, зануреною в 80% шар, аспірують осад, ресуспендують його в буфер для гамет і переносять в чисту пробірку для відмивання залишків колоїдного розчину.

7. Центрифугують 10 хв. при 600 g.

8. Повторюють відмивання з буфером для гамет.

9. Видаляють супернатант і ресуспендують у невеликому обсязі середовища для приготування сперматозоїдів або середовища для запліднення.

10. Підраховують кількість сперматозоїдів та обчислюють концентрацію. За потреби роблять розведення. Зберігають в інкубаторі з 6% CO_2 за температури +37°С.

В разі правильного виконання вищеописаної методики осад містить тільки функціонально активні рухливі сперматозоїди, які можуть бути використані для IVF.

Крім того, у процесі градієнтного центрифугування можуть бути відокремлені інші клітини, присутні в спермі, наприклад, лейкоцити та епітеліальні клітини, так само як мертві та ті, що гинуть сперматозоїди, які служать джерелом АФК і можуть викликати оксидативний стрес. Одночасне видалення сперматозоїдів з пошкодженим хроматином і джерелом АФК має пом'якшити вплив їх високої концентрації на зразки сперми у процесі її обробки.

Метод спливання «swim-up», або флотація, імітує природне переміщення сперматозоїдів через цервікальний слиз. При цьому фракція сперми розташовується під культуральним середовищем, що дозволяє прогресивно рухливим сперматозоїдам переміститися у фракцію середовища. До недоліків методу «swim-up» слід віднести неадекватність підходу при вираженій астенозооспермії (низькою рухливістю сперматозоїдів).

Метод «swim-up» відокремлює сперматозоїди від решти складу еякуляту виключно на основі їх рухливості, проте не відокремлює ні морфологічно деформовані, ні сперматозоїди з порушеним хроматином. Також не видаляються бактерії та віруси, присутність яких і продукованих ними ендотоксинів або реакційно-активних сполук кисню з клітин, мертвих або сперматозоїдів, що гинуть надає

згубну дію на функціональну повноцінність хроматину, на запліднювальну здатність і виживаність всіх сперматозоїдів.

Виділення сперматозоїдів даним методом можна здійснювати або з нативної сперми, внаслідок чого рухливі сперматозоїди з центрифугованого осаду виходять у верхню фазу – в нашароване чисте середовище, або краще спочатку відмити сперматозоїди та ресуспендувати осад перед наступним виділенням гамет спливанням. Для в'язкого зразка сперми можна зробити попереднє розведення із середовищем для сперматозоїдів.

Методика виділення сперматозоїдів із сперми методом спливання «swim-up» полягає в наступному:

1. У центрифужній пробірці на аліквоту розрідженого еякуляту нашаровують середовище для методу «swim-up».

2. Пробірку ставлять у термостат під кутом приблизно 45°. Інкубують упродовж однієї години за температури +37°С.

3. Після інкубації акуратно відбирають близько 1 мл суспензії над спермою, щоб не пошкодити нижній шар і інтерфазу, і центрифугують при 600 g протягом 10 хв до утворення осаду із сперматозоїдів.

4. Відбирають осад і потім ресуспендують його в малому обсязі відповідного середовища для приготування сперматозоїдів або середовища для запліднення, щоб використовувати під час IVF.

5. Підраховують кількість сперматозоїдів та визначають їх концентрацію. Зберігають в інкубаторі з 6% CO_2 при +37°С.

Методика виділення попередньо відмитих сперматозоїдів методом спливання полягає в наступному:

1. У конічну пробірку відбирають аліквоту розрідженого еякуляту та додають приблизно такий самий обсяг буфера для гамет. Центрифугують при 300 g упродовж 20 хв.

2. Видаляють супернатант, а осад ресуспендують у буфері для гамет. Центрифугують при 300 g упродовж 10 хв.

3. Видаляють супернатант, а на осад нашаровують середовище для сперматозоїдів та інкубують в атмосфері CO_2 упродовж однієї години за температури +37°С.

4. Відбирають супернатант зі сперматозоїдами, що «спливли», і переносять у чисту пробірку, підраховують концентрацію сперматозоїдів.

Метод «swim-up» забезпечує виділення сперматозоїдів від еякуляту виключно завдяки їхній рухливості. Хоча збільшується відсоток виділення рухомих сперматозоїдів, проте малорухливі сперматозоїди теж потрапляють у середовище, а також сперматозоїди з морфологічними дефектами та пошкодженою ДНК. Тобто метод «swim-up» не відокремлює морфологічно деформовані сперматозоїди і сперматозоїди з порушеним хроматином. У процесі «swim-up» не видаляються бактерії та віруси, присутність продукованих бактеріями ендотоксинів або реакційно активних сполук кисню з клітин негативно впливають на функціональну повноцінність хроматину, на запліднювальну здатність і виживання всіх сперматозоїдів.

Відомо, що застосування градієнту щільності дозволяє ефективно виділяти з еякуляту найбільш рухливі сперматозоїди. А з допомогою методу «swim-up» отримуємо найбільш життєздатні сперматозоїди, порівняно з виділеними методами простого відмивання від плазми та безперервного центрифугування в градієнті щільності.

Щодо того, який із методів виділення сперматозоїдів є більш ефективним наразі єдиної думки немає. Є дані, що вказують на переваги використання як градієнту щільності так і «swim-up». Порівняльний аналіз цих двох основних методів виділення прогресивно рухомих сперматозоїдів показав, що метод «swim-up» більш ефективний для їх відбору з нормальним хроматином, ніж градієнт щільності. Більше того, після обробки в градієнті «PureSperm» в деяких випадках підвищувався ступінь пошкодження ДНК (індекс фрагментації – ІФ). Середній ІФ в еякуляті становив 12% після застосування «swim-up» – 5,5%.

Деякі автори вважають, що ефективним для виділення найбільш рухливих сперматозоїдів з повноцінною структурою хроматину є комбінований метод. Суть його полягає у послідовному застосуванні центрифугування в ізотонічному 90% градієнті щільності «Percoll» та подальшого спливання сперматозоїдів з одержаного осаду. Ця модифікація дозволяє поєднувати переваги обох методик. Застосування комбінованого методу виділення найбільш рухливих сперматозоїдів дозволяє отримати популяцію зі значно кращими морфологічними характеристиками, порівняно з нативним еякулятом як при нормо- так і при патоспермії.

2. ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO* СПЕРМАТОЗОЇДІВ, ОТРИМАНИХ РІЗНИМИ МЕТОДАМИ

Технологія отримання *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби включає дозрівання *in vitro* (IVM), запліднення *in vitro* (IVF) і культивування *in vitro* (IVC) до стадії бластоцисти. Під час природнього запліднення цервікальний слиз створює бар'єр, який дозволяє мігрувати лише сперматозоїдам з нормальною морфологією, прогресивною рухливістю та повноцінним ядром. Свіжі еякуляти бугаїв зазвичай мають понад 80% прогресивно рухомих сперматозоїдів і 85% морфологічно нормальної форми. Кріоконсервована сперма бугая має нижчий відсоток прогресивної рухливості сперматозоїдів (30%–70%), тому під час оптимізації слід приділити особливу увагу методам їх підготовки для отримання ембріонів *in vitro*. Відбір сперматозоїдів відокремлює рухливі сперматозоїди від нерухомих, видаляє сім'яну плазму, кріопротектори, а також одночасно ініціює активність гамет. Ефективність методів підготовки можна оцінити за допомогою різних параметрів сперми, таких як: рухливість сперматозоїдів, морфологія, концентрація, життєздатність, активність мембрани, стан акросоми, утворення активних форм кисню, зрілість і цілісність хроматину [15].

Якісна характеристика сперматозоїда – це одна з найважливіших умов, при якому відбувається процес запліднення з наступним розвитком спочатку ембріона, а потім і плода [20]. Вкрай складно отримати ембріони гарної якості з погано підготовлених для запліднення сперматозоїдів. Це зумовлено тим, що еякулят багатокомпонентний і складається з сім'яної рідини, сперматозоїдів, імунних та епітеліальних клітин, бактерій та клітинного дебрису.

Препарат «Percoll» це частинки колоїдного кремнезему (15–30 нм в діаметрі), покриті полівінілпіролідоном для підвищення питомої щільності середовища до 1,13 г/мл. Він також використовується для виділення бактерій, нейтрофілів, вірусів і субклітинних частинок.

Центрифугування в градієнті щільності «Percoll» (90–45%) використовується для відбору рухливих сперматозоїдів та використання їх для запліднення *in vitro*. Спливання «swim-up» є ще одним часто використовуваним метод відбору сперми для IVF. Це

простий і дешевий метод, який відбирає високорухливі сперматозоїди, що досягають поверхні середовища після інкубації.

Враховуючи практичність вказаних вище методів відбору, Wolf C. A. з колегами (2008) вивчали як метод «swim-up» і центрифугування сперматозоїдів у градієнті щільності впливає на співвідношення статі ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* [16]. Стать ембріонів визначали за допомогою ПЛР. В разі центрифугування сперматозоїдів у градієнті щільності 48,6% ембріонів (n = 90) були чоловічої статі і 51,4% ембріонів (n = 95) – жіночими. За використання «swim-up» виявлено, що у 58,4% – ембріони чоловічої (n = 83) і 41,6% ембріонів жіночої статі (n = 59) [16].

Parrish J. J. з колегами вивчали вплив розділення сперматозоїдів бугаїв методом «swim-up», або центрифугуванням в градієнті щільності на запліднення *in vitro* та ранній ембріональний розвиток. Метою цих досліджень було охарактеризувати розділення кріоконсервованих сперматозоїдів за градієнтом щільності, а потім порівняти розділення сперматозоїдів щодо здатності сперматозоїдів запліднювати ооцити *in vitro*. Початкові експерименти показали, що центрифугування сперми в градієнті «Percoll» упродовж 15 хвилин при 700g було достатнім для отримання рухливих сперматозоїдів. Більшість нерухомих сперматозоїдів було знайдено на межі 45- і 90%-х шарів «Percoll», тоді як рухливі сперматозоїди були в основному у нижній частині градієнта.

Коли кріоконсервовану сперму від кожного з семи бугаїв відокремлювали шляхом спливання, середнє значення рухливих сперматозоїдів було 9% ± 1. Більше сперматозоїдів було відновлено після поділу в градієнті «Percoll» ($P < 0,05$), при цьому було відновлено 40% ± 4 рухомих сперматозоїдів. Вплив процедури відокремлення на запліднення *in vitro* виявив, що відокремлені сперматозоїди «swim-up» проникли в яйцеклітин у 74% ± 5, тоді як відокремлені сперматозоїди за допомогою «Percoll» проникли в 52% ± 8 яйцеклітин ($P < 0,05$).

Процедура поділу не вплинула на показники поліспермії, із середнім значенням 1,25 ± 0,9 для сперматозоїдів, відокремлених «swim-up», і 1,14 ± 0,7 для сперматозоїдів, відокремлених за методом центрифугування з «Percoll» ($P > 0,05$). За використання

сперматозоїдів двох бугаїв, відокремленими за допомогою «swim-up» або центрифугуванням в «Percoll», було виявлено різницю в швидкості дроблення на користь відокремлених сперматозоїдів методом «swim-up» ($P < 0,05$), але не спостерігали різниці під час розвитку на сьомий день до стадії морули-бластоцисти ($P > 0,05$). Недоліки методу центрифугування з «Percoll» можна легко подолати, а процедура була швидшою та дала в шість разів більше рухливих сперматозоїдів, ніж в разі використання методу «swim-up» [17].

Liu B. з колегами вивчали вплив методів «swim-up» і центрифугування в «Percoll» на якість відокремлених сперматозоїдів яків та розвиток ембріонів *in vitro*. Зразки кріоконсервованої сперми обробляли за допомогою методів «swim-up» та центрифугування в градієнті «Percoll». Оцінювали концентрацію сперматозоїдів, їх прогресивну рухливість, відновлення рухомих сперматозоїдів, цілісність мембрани, цілісність акросоми та хроматину оцінювали та порівнювали у відновлених зразках. Крім того, було оцінено вплив двох методів отримання сперматозоїдів на розвиток ембріонів *in vitro* до стадії бластоцисти. Сперматозоїди, відокремлені «swim-up», мали вищу рухливість, у той час як концентрація і відсоток відновлення рухомих сперматозоїдів були вищими під час центрифугування в градієнті «Percoll».

За даними оптичної та електронної мікроскопії за використання методу «swim-up» отримано вищий відсоток сперматозоїдів з непошкодженою плазматичною мембраною та акросомою, ніж центрифугування в градієнті «Percoll». Однак не було різниці у відсотках сперматозоїдів з інтактним хроматином. Кількість ембріонів, які досягли стадії бластоцисти у двох групах не відрізнялась, а рівень дроблення ембріонів був вищий, коли використовували метод «swim-up» [18].

Mehmood A. з колегами досліджували кріоконсервовану сперму п’яти буйволів щодо ефективності застосування вказаних вище методів для відокремлення життєздатних сперматозоїдів та одержання ембріонів *in vitro*. Аналізували відновлення рухливості сперматозоїдів (%), збільшення цілісності мембрани (%) і цілісності акросоми (%). Відокремлені сперматозоїди методом «swim-up» показали вищу рухливість ($P < 0,05$), тоді як відсоток відновлення рухомих сперматозоїдів був вищим після розділення в «Percoll»

(P < 0,05). Цілісність мембрани (%) відокремлених за допомогою «swim-up» сперматозоїдів була значно вищою (P < 0,05), порівняно зі сперматозоїдами, відокремленими за допомогою «Percoll». За використання сперматозоїдів після «swim-up» встановлено більш високий індекс дроблення ембріонів (P < 0,001). Таким чином, для покращення ефективності отримання *in vitro* ембріонів буйволів рекомендовано відокремлювати сперматозоїдів методом «swim-up» [19].

3. ВПЛИВ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ФЛОТАЦІЇ НА ДЕКОНСЕРВОВАНІ ЕЯКУЛЬОВАНІ СПЕРМАТОЗОЇДИ КНУРА

Сперма кнурів чутлива до низьких температур, і безумовно є важливим розробка ефективних методів кріоконсервації. Має значний вплив відмивання сперматозоїдів після розморожування, температура інкубації на їх життєздатність. Збільшення фрагментації ДНК сперматозоїда суттєво впливає на ефективність запліднення.

В дослідженнях використано деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура миргородської породи Камиш 253. Генетичний матеріал зберігався в Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН. Суспензію сперматозоїдів розморожували на водяній бані за температури +37ºС упродовж 5 хв до повного розморожування. Відокремлення деконсервованих сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили в трьох різних середовищах: в середовищі Sp-TALP Parrish J. J. et al. (1988), TALP $^{без\ Ca2+}$ (табл. 1) Ковтун С. І. та ін. (2005) та Sperm Preparation Medium (Origio, Denmark) методом «swim-up». Склад останнього середовища вказано на https://tsmb.ru/catalog/culture-media/environment-sperm-preparation-medium/.

Для цього розташовували пробірку з 2 мл теплого середовища (+37ºС) під кутом 45º. Флотацію 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 +37ºС рисунок 1.

1. Склад середовищ для відокремлення деконсервованих сперматозоїдів (мг на 20 мл води)

Компоненти фірми Sigma (номер за каталогом)	TALP без іонів 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, $MgCl_2$ x 6 H_2O (M 2393)	2,0	1,62
7. Хлорид кальцію, $CaCl_2$ x H_2O (C 7902)	–	5,88
8. Hepes (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 (р-н)	–	20,0 мл

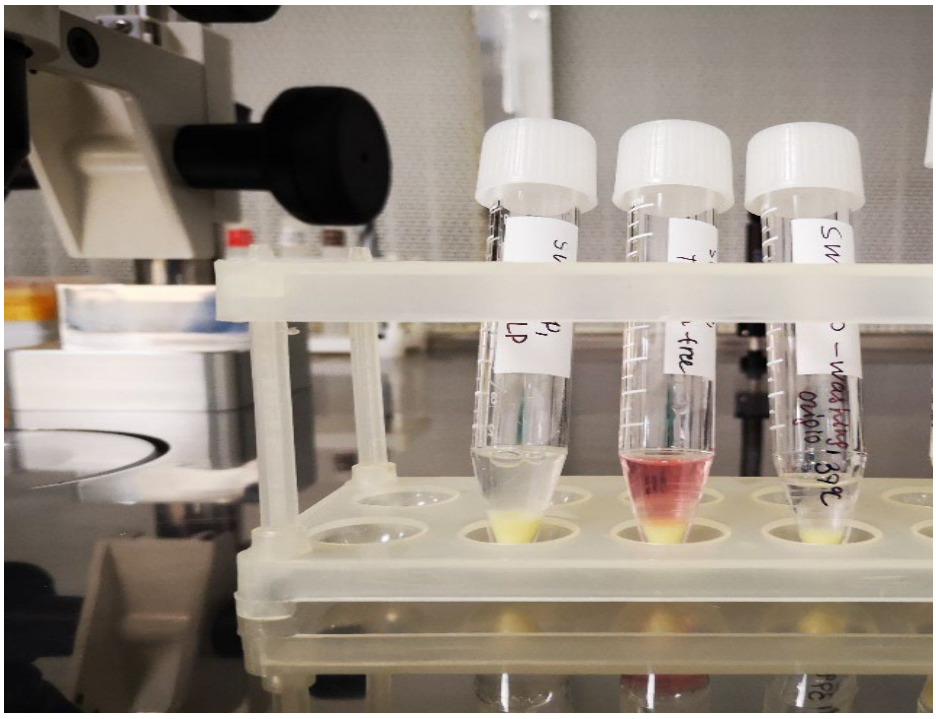


Рис. 1. Флотація суспензії сперматозоїдів у трьох різних середовищах

Після цього проводили оцінку рухливості та визначали концентрацію сперматозоїдів з використанням камери Маклера (рис. 2). Підрахунок проводили у трьох повторах за збільшення в 400 разів.

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

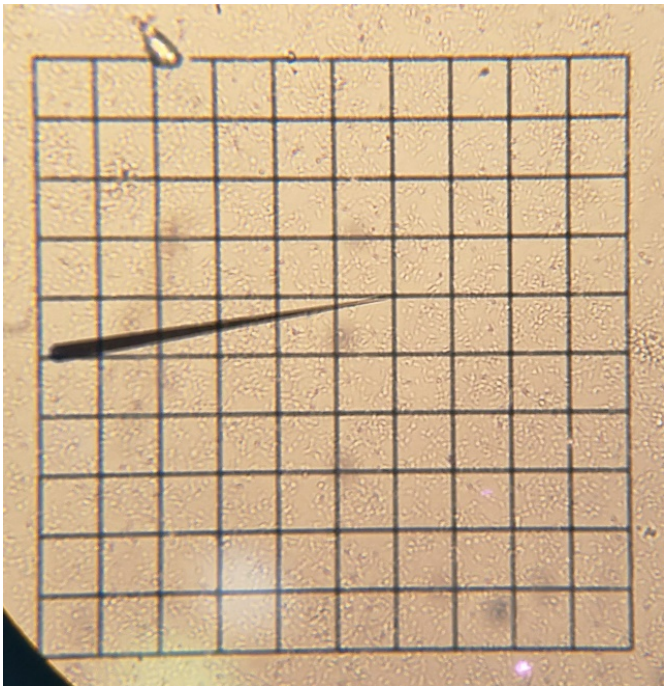


Рис. 2. Камера Маклера для підрахунку сперматозоїдів.

Після відмивання деконсервованої суспензії сперматозоїдів за температури +37°С у трьох різних середовищах ми отримали дані, які наведено в таблиці 2.

За використання середовища Sp-TALP Parrish J. J. et al. (1988) та TALP Ca^{2+}free для флотації життєздатних сперматозоїдів концентрація їх була майже на однаковому рівні та становила, 69,7 та 71,0 /мл, відповідно. В разі використання середовища Sperm Preparation Medium отримано значно нижчі показник 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). Рухливість сперматозоїдів на рівні 5,0% спостерігали за використання середовища для флотації TALP Ca^{2+}free.

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 Ca^{2+}free	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 $P < 0,01$

Під час запліднення важливим є не лише показник загальної рухливості сперматозоїдів, а також кількості таких рухливих сперматозоїдів у 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 Ca^{2+}free цей показник був на рівні 3,56 ± 0,27 млн в 1 мл.

Слід відмітити, що найвищу загальну кількість сперматозоїдів було отримано в середовищі TALP Ca^{2+}free, 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 так як 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 поширених «аномалій» під час запліднення поза організмом у свиней.

ВИСНОВКИ

Наразі різні методи виділення сперматозоїдів тварин після розморожування можна застосовувати з однаковою ефективністю. Вибір методу залежить від того, проводиться виділення сперматозоїдів для досліджень або для штучного осіменіння самок, а також від характеристик еякуляту та правил, передбачених у конкретній лабораторії.

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 Parrish J. J. et al. (1988), в якому отримано 69,7 ± 3,1 млн/мл сперматозоїдів з яких 6,8 ± 0,56 млн/мл були рухливими.

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

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

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

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

5. 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

4. 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 ., 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) 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) 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

13. 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

14. Wysocki P., Orzołek A., Strzeżek J., Koziorowska-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

15. Samardzija M., Getz I., Lojkic M., Valpotic H., Djuricic D. Optimization of Sperm for *In vitro* Production of Bovine Embryos. *SOJ Vet Sci.* 2015. Vol. 1 (2). P. 1–7. DOI: http://dx.doi.org/10.15226/2381-2907/1/2/00107

16. Wolf C. A., Brass K. E., Rubin M. I. B., Pozzobon S. E., Mozzaquatro F. D., De La Corte F. D. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Anim. Reprod.*, 2008. Vol. 5, N. 3/4. P. 110–115.

17. Parrish J. J., Krogenaes A., Susko-Parrish J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology.* 1995. Vol. 44 (6). P. 859–869. https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9

18. Liu B., Cui Y., Yu S. Effect of Swim-Up and Percoll Treatment on Sperm Quality and In vitro Embryo Development in Yak. *Journal of Integrative Agriculture.* 2013. Vol. 12, iss. 12. P. 2235–2242. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60378-0

19. Mehmood A., Anwar M., Saqlan Naqvi S. M. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen–thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science.* 2009. Vol. 111, iss. 2–4. P. 141–148. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.011

20. Morales E. C. L., Aragon M. A., Pescador S. N., Salazar G. F. SWIM-Up Procedure in Boar Semen Improves Motility and Viability but Recovered Sperm Could Carry Active Caspases and Chromatin Damage. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2012. Vol. 11, iss. 4. P. 431–437. DOI: 10.3923/javaa.2012.431.437

ДЛЯ НОТАТОК

НАУКОВО-МЕТОДИЧНЕ ВИДАННЯ

Оксана Василівна Щербак
Оксана Юріївна Лизогуб
Світлана Іванівна Ковтун
Петро Анатолійович Троцький

ПІДГОТОВКА ДЕКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO*

Методичні рекомендації

Підписано до друку 28.11.2023
Формат 60 х 84 1/16
Ум. друк. арк. 1.4
Наклад 100 прим.

Надруковано в Інституті розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321
Свідоцтво ДК № 7292 від 25.03.2021 р.