

КРІОКОНСЕРВАЦІЯ СПЕРМИ КНУРІВ – ВАЖЛИВА ЛАНКА У ТЕХНОЛОГІЇ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ СВИНЕЙ EX-SITU

В.Ф. Коваленко

Інститут свинарства ім. О.В.Квасницького УААН

Стаття стосується вітчизняного та зарубіжного досвіду вдосконалення технології заморожування сперми кнурів із метою розкриття закономірностей процесів її заморожування-відтавання та збереження генофонду свиней EX-SITU. Вчені світу, використовуючи новітнє обладнання, препарати для біохімічних досліджень наближаються до розкриття закономірностей процесів заморожування-відтавання сперми кнурів, передбаченню результатів кріоконсервації гамет, що дасть змогу успішно вирішувати проблему довготривалого їх зберігання, а отже генофонду свиней EX-SITU

Ключові слова: гамети, кріоконсервація, кріопротектор, сперма, генофонд.

Галузь свинарства, за умов науково обґрунтованого її ведення, є найбільш рентабельною в системі тваринництва завдяки короткому репродуктивному циклу, багатоплідністю, високому рівню оплати корму, невимогливості цих тварин, а також дієтичній цінності та високим смаковим якостям м'яса. Між тим, багато вітчизняних порід свиней знаходяться на межі зникнення, а немало вже зникли безслідно. Немало цьому сприяє розповсюджена сьогоднішня практика прилиття крові високопродуктивних імпортованих порід, часто-густо без наукового обґрунтування і аналізу кінцевого результату. Особливо загрозлива ситуація створюється в умовах існування розрізнених приватних ферм, не контрольованих національними програмами.

Існуючі в Україні генетичні ресурси свійських тварин це, перш за все, національний історичний скарб, який має соціальну, наукову, економічну і екологічну цінність і є джерелом селекційно-генетичної роботи. Тому, не зважаючи на наявність ефективних державних програм натурального збереження генофонду диких і свійських тварин in situ, постає необхідність створення національного Кріоцентру (кріобанку) для безстрокового збереження цього генофонду ex-situ, тобто поза організмом (поза репродуктивною системою). Методологічною основою такого закладу є незмінність генетичного матеріалу при збереженні його в рідкому азоті при стабільній температурі -196 °C.

За таких умов єдиним засобом надійного збереження генетичного потенціалу не лише чистопородного поголів'я, але й нових високопродуктивних ліній і, навіть, окремих високоцінних плідників, є кріобанк гермінативної плазми, тобто гамет і ембріонів. Але це, у свою чергу, вимагає наявності високо ефективних технологій кріоконсервації цих об'єктів. Проблема ця давно успішно вирішена у скотарстві, але свиня істотно відрізняється від інших видів сільськогосподарських тварин на рівні анатомічному, фізіологічному і навіть клітинному. А тому традиційні методи кріоконсервації сперми кнура, розроблені ще у 70-х роках минулого сторіччя [1] і пізніше модифіковані застосуванням соломин [2], не забезпечують стабільності і достатньої ефективності результатів.

Головним лімітуючим фактором широкого застосування у свинарстві кріоконсервованої сперми кнура є значно нижча запліднювальна її здатність, у порівнянні зі свіжою спермою, а також варіабельність здатності до

заморожування еякуляту різних кнурів. Отже, існує необхідність вдосконалення наявних і розробки нових методів кріоконсервації сперми кнура.

Існуючий стратегічний підхід до вирішення проблеми кріоконсервації засновується на двох основних чинниках: кріопротектантах і режимах заморожування-відтавання. Водночас фактором істотного впливу на результати кріоконсервації є також застосування оптимальної форми і об'єму ємкостей для заморожування (контейнерів), про що свідчать численні експериментальні дані.

У нашому інституті в сімдесятих роках минулого століття розпочиналась розробка технології заморожування сперми кнурів. У 1976 році, використовуючи для осіменіння свиноматок заморожену сперму, були одержані поросята. Пізніше проводилось удосконалення варіанта Полтавської технології заморожування та тривалого зберігання сперми кнурів [3]. Згідно н неї заморожування здійснювалося в кулькових синтетичних ємкостях об'ємом 20 – 25 см³, що забезпечувало герметизацію кожної спермодози, в якій знаходилось по 2 млрд/см³ прямолінійно-поступальних спермійів і збереження високої біологічної якості (А.С. №1307636 з пріоритетом від 25.07.1984 р.).

Наші результати та світовий досвід свідчать про те, що у виробничих умовах, поки що, не досягнуто бажаних показників заплідненості свиноматок. Тому у багатьох країнах продовжують досліджувати проблему вдосконалення процесів заморожування-відтавання сперми кнурів.

У дослідженнях [4] найкращі результати були одержані при заморожуванні сперми у плоских поліетиленових пакетах FlatPacks зі швидкістю 50 °C/хв і відтавання 13 с у водяній бані 50 °C. Цей режим відтавання дав найкращі результати стосовно показників характеристики руху спермійів, виживання їх після відтавання, а також рівня заплідненості і багатоплідності свиноматок, тоді як заморожування сперми у максі-соломках дало вірогідно гірші результати ($P < 0,05$). Крім того, було виявлено, що 3-годинна інкубація сперми, яку включає стандартний протокол заморожування у FlatPacks, непотрібна, бо вона не підвищує виживання спермійів після відтавання.

Ці дослідження також показали, що не зважаючи на вірогідну ($P < 0,05$) різницю параметрів *in vitro* сперми окремих кнурів, варіабельність її якості після відтавання була незначною, що, за думкою автора, свідчить про можливість покращити ефективність запліднення замороженою спермою без селекційних заходів. Але така точка зору спростовується фактом існування вірогідної ($P < 0,001$) різниці між окремими еякулятами, тобто кнурами, щодо відсотка рухливих спермійів після відтавання [5]. Постало питання дослідження цього феномена на генетичному рівні. Нещодавно з'явилося повідомлення [6] про незалежне від типу розбавника і пакувального матеріала порушення цілісності ДНК сперматозоїдів у наслідок процесу заморожування-відтавання, причому ступінь такого порушення варіював між окремими кнурами. Thurston L.M. et all. [7] підтвердили існування генетичного базису для варіабельності якості сперми після відтавання у межах еякулятів окремих кнурів. Більше того, автори довели можливість ідентифікації молекулярних маркерів для прогнозування заморожуваності сперми кнурів за технологією визначення поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP technology).

Для з'ясування впливу окремих фаз традиційного циклу кріоконсервації (процесу відтавання, включно) на загальну рухливість і параметри індивідуальної кінематики рухів спермійів кнура нещодавно здійснили дослідження з використанням комп'ютерної системи аналізу [8]. Кластерний аналіз виявив 3 субпопуляції спермійів: із прогресивним і енергійним рухом (58,7 %), лише з

прогресивним рухом (24,6 %) і лише з енергійним, подібним до гіперактивного (16,7 %). Відносна частота появу цих субпопуляцій варіювала поміж окремими еякулятами (кнурми), проте не спостерігалось будь-якої взаємодії цих показників з будь-якою з перевірених фаз кріоконсервації. Перша з цих субпопуляцій залишалася постійною протягом усіх фаз циклу, тоді як дві інші істотно варіювали протягом процедури кріоконсервації зі збільшенням третьої субпопуляції після центрифугування при 17 °C і після повільного охолодження при 5 °C, коли завжди проявлялася гіперактивність. Отже, було доведено, що кількість спермій з прогресивними і енергійними рухами залишається постійною протягом усього циклу кріоконсервації, зате варіює поміж кнурми.

Разом з тим, на підставі такого ж комп'ютерного аналізу було виявлено [9], що після відтавання лише 36 % спермій зберігають інтактну мембрану, єдність структурної і функціональної цілісності якої визначають результати кріоконсервації.

Щодо негативного впливу на структуру і життєздатність спермій кнура фази відтавання підтверджується і в інших дослідженнях. Так, Watson P.F. [10], аналізуючи причини низької результативності застосування у свинарстві кріоконсервованої сперми, дійшов висновку про те, що критичною ланкою цього процесу є саме відтавання, протягом якого істотно зростає пропорція спермій з ушкодженою мембраною.

Holt W et all. [11] дослідили вплив режиму охолодження сперми перед зануренням у рідкий азот, який включав два варіанти: а) від +5 °C до -5 °C та б) від -5 °C до -50 °C. Швидкість охолодження у межах від 3 °C хв⁻¹ до 12 °C хв⁻¹ не викликала істотного пошкодження цитоплазматичної мембрани спермій між +5 і -5 градусів C. Проте спермії, які охолоджувались до -5 °C зі швидкістю 24 °C хв⁻¹, були трохи ушкоджені. Рухливість практично не змінювалась у залежності від режиму охолодження. Швидкість охолодження у межах від 15 до 60 °C хв⁻¹ не змінювала виживання спермій поміж -5 і -50 °C та після відтавання. Окрім того, швидкість охолодження у межах від 3 °C хв⁻¹ до 80 °C хв⁻¹ не обумовила істотної різниці у кріовиживанні спермій. Але повільне заморожування (3 °C хв⁻¹) викликало при -50 °C дещо підвищення відсотка спермій з ушкодженням цитоплазматичної мембрани. Отже, фаза повільного охолодження є також критичною у циклі заморожування-відтавання.

Успіх збереження генетичного потенціалу видатних кнурів-плідників шляхом кріоконсервації сперми буде визначатись подоланням порогу високої чутливості спермій цього виду тварин до холодового шоку. Ця проблема пов'язана з ліпідною композицією мембрани спермій кнура, що в ній відносно високий рівень поліненасичених жирних кислот, котрий істотно знижується протягом кріоконсервації, зокрема після фази відтавання [12], у результаті перикисного окислення [13]. Перекисне окислення ліпідів корелює з пошкодженням спермій реактивними видами кисню, продукція яких спостерігається протягом циклу заморожування-відтавання [14]. Це, у свою чергу, пов'язане зі зниженням функціональної здатності відталених спермій [15], у зв'язку з чим останніми роками розгорнулись дослідження у пошуку найбільш ефективних антиоксидантів [16]. Додавання до розбавнику при заморожуванні сперми кнура бутил-бензилового спирту у мінімальній концентрації, що була у межах від 0,2 до 1,6 mM, гальмує процес пероксидації ліпідів у сперміях і поліпшує їх функції за даними результатів запліднення ооцитів у культурі *in vitro* і розвитку утворених ембріонів до стадії бластоцисти - [17]. Позитивний вплив на капацитацію спермій кнура і пропорцію живих серед них було одержано і при

додаванні до середовища заморожування редукованого глутатіону (GSH) для попередження оксидативного стресу [18].

У пошуку методів підвищення стійкості цитоплазматичної мембрани голівки спермій було запропоновано збагачення мембрани одержаними екзогенно її власними ліпідами [19]. З цією метою спермії кнурів відмивали у основній силіконовій олії і Тріс-сахарозному буфері; шляхом центрифугування відділяли і очищували диференціальним центрифугуванням цитоплазматичні мембрани голівки спермій, екстрагували з них ліпіди, які надалі замикали у одношарові мікропухирці, готуючи за відповідними методиками ліпосоми. При застосуванні авторського методу додавання ліпосом до розбавника зі сперміями забезпечувало справжнє їх злиття у 60 % гамет. У результаті збагачення мембран специфічними ліпідами вірогідно підвищувались показники виживання і рухливості спермій після контрольного охолодження до 24°C і після кріоконсервації як з додаванням яєчного жовтка, так і без нього. Отже, включення специфічних ліпідів у спермальну мембрану може реально підвищувати стійкість спермій до пошкоджуючої дії охолодження.

Нещодавно було здійснено експериментальну перевірку нової, нестандартної, технології заморожування (UFT – unique freezing technology) сперми, у порівнянні з традиційним методом використання рідкого азоту [20]. Метою розробки було поліпшення запліднювальної здатності сперми кнурів. Прилад UFT це електронно-контрольована камера охолодження, що вміщує ванну з органічною рідиною, в якій знаходяться зразки для заморожування, і яка може підтримувати температуру нижче 0 °C без застигання. Еякуляти кожного кнурів було поділено на 8 груп зразків заморожування у двох повторностях. Після закінчення процесу кріоконсервації всі зразки зберігались у рідкому азоті протягом 48 год. Після відтавання всі зразки UFT виявились вірогідно кращими за рухливістю спермій у порівнянні зі стандартною технологією кріоконсервації. Перевірка на маточному поголів'ї забезпечила 50 % опоросів і 7 поросят від свиноматки, в середньому. Таким чином, уповільнена фаза пре-консервації перед застосуванням швидкого охолодження при температурі рідкого азоту підвищує рухливість спермій після відтавання і зберігає їх запліднювальну здатність, що підтверджено результатами одержання опоросів.

Інший модифікований метод кріоконсервації сперми і новий пристрій для його здійснення запропоновано Woelders H. et al. [21]. Принцип методу заснований на подоланні шкідливого впливу суперохолодження, обумовленого різким переходом температури і осмотичними змінами. Використано елемент посіву кристалів льоду і швидкого його розповсюдження у зразках сперми, упакованих у соломинку за умов високої концентрації спермій $1,5 \times 10^9$ клітин/мл. Це забезпечило $54,8 \pm 1,9$ % спермій кнурів з інтактною мембраною проти $40,7 \pm 1,7$ % за умов стандартного варіанту кріоконсервації.

Таким чином, вчені світу, використовуючи новітнє обладнання, препарати для біохімічних досліджень наближаються до розкриття закономірностей процесів заморожування-відтавання сперми кнурів, передбаченню результатів кріоконсервації гамет, що дасть змогу успішно вирішувати проблему довготривалого їх зберігання, а отже генофонду свиней EX-SITU.

Бібліографічний список

1. Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure // J. Anim. Sci. – 1975. - 40:99–102.

2. Pettitt M, Buhr M. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane structure during cryopreservation // *J.Androl.*– 1998.-19:736–746.
3. Коваленко В.Ф, Бурлаченко Л.В. Зберігання сперми кнурів при низьких температурах // *Свинарство – К.: Урожай* – 1983. – Вип. 39.- С. 50-52.
4. Bengt Eriksson Cryopreservation of Boar Semen. Studies on sperm viability in vitro and fertility // Doctoral thesis.-Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, 2000 - 47 p.
5. Watson PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen // *Anim. Reprod. Sci.* – 2000 - 60–61:481–492.
6. Frazer L., Strzezek J. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay // *Reprod. Dom. Anim.* – 2005 - 40.- 6.-530-536.
7. Thurston L.M., Siggins K., Mileham A.J., Watson P.F., Holt W. Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism Markers Linked to Genes Controlling Boar Sperm Viability Following Cryopreservation // *Biol. Reprod.*-2002.- 66 - 545–554.
8. Cremades T., Roca J., Rodrigues-Martinez H., Abaigar T., Vazquez J., Martinez E.A. Kinematic Changes During the Cryopreservation of Boar Spermatozoa // *J. Andrology* - 2005.- 26.- 5.- P.610-618.
9. Peña F.J., Saravia F., Garcia-Herreros, Nuñezmarinez I., Tapia J.A., Johannisson A., Wallgren M., Rodriguez-Martinez H. Identification of Sperm Morphometric Subpopulations in Two Different Portions of the Boar Ejaculate and Its Relation to Postthaw Quality // *J. Andrology.*-2005.- 26.-6.-pp.716-723.
10. Watson PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen // *Anim. Reprod. Sci.* – 2000 - 60–61:481–492.
11. Holt W., Medrano A., Thurston L.M., Watson P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope // *Theriogenology.*-2005.-63.-2.-P. 370-382
12. Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi T., Cerolini T., Penny C. <C:\WINDOWS\Рабочий стол\MAIL\13.html> - affl P., Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen // *Theriogenology.*-2005.-63.-2.-P. 411-421.
13. Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. // *Reproduction.* – 200 - ; 121:395–401.
14. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation // *J. Androl.* – 1992 - 13:232–241.
15. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing // *Mol. Reprod. Dev.* – 2001 - 59:451–458.
16. Peña F.J., Johannisson A., Wallgren M., Martinez H.R. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture // *Zygote.*-2004.- 12.- P.117-124.
17. Roca J., Gil M.A., Hernandez M., Parrilla I., Vazquez J., Martinez E.A. Survival and Fertility of Boar Spermatozoa After Freeze-Thawing in Extender Supplemented With Butylated Hydroxytoluene // *J.Andrology* - 2004.-25.-3.-P.317-405.
18. Gadea J. , Garcia-Vázquez F., Gumbao D., Rodríguez F.A., Matás C. Addition of reduced glutathione to freezing medium improved the sperm functionality of thawed spermatozoa // *Reprod. Fert. Dev.* - 2005. - 17.-2.-P.192–193.

19. He L., Bailey J.L., Buhr M.M. Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential // Biol. Reprod. - 2001 - 64.-1.- P. 69-79.

20. Goolsby HA, Blanton JR, Cotter PZ, Prien SD Preliminary Trial: Motility Comparisons of a Unique Freezing Technology [UFT) to Liquid Nitrogen Mist Methodology for Cryopreservation of Porcine Spermatozoa // Reprod. Dom. Anim. - 2004 - 39.-5,-P.328 – 332.

21. Woelders H., Matthijs A., Zuidberg C.A., Chaveiro A.E.N. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws // Theriogenology. - 2005.-63.-2.-P. 383-395.

КРИОКОНСЕВАЦИЯ СПЕРМЫ ХРЯКОВ – ВАЖНОЕ ЗВЕНО В ТЕХНОЛОГИИ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА СВИНЕЙ EX-SITU

В.Ф. Коваленко, Институт свиноводства им. А.В. Квасницкого УААН

Статья касается отечественного и зарубежного опыта усовершенствования технологии замораживания спермы хряков с целью раскрытия закономерностей процессов её замораживания-размораживания и сохранения генофонда свиней EX-SITU. Ученые мира, используя новейшее оснащение, препараты для биохимических исследований приближаются к раскрытию закономерностей процессов замораживание-оттаивание спермы хряков, предусмотрению результатов криоконсервации гамет, которая позволит успешно решать проблему долгодействующего их сохранения, а также генофонда свиней EX-SITU.

Ключевые слова: гаметы, криоконсервация, криопротектор, сперма, генофонд.

FREEZING PRESERVATION TECHNIQUE OF THE BOAR SEMEN BY THE EX-SITU STORAGE FOR PRESERVATION OF THE GENETIC RESOURCES OF THE PIGS

V.Kovalenko, the Institute of pig breeding, UAAS

This article highlights the system analysis execution on freezing preservation technique improvement of the boar semen. The freezing and thawing method was applied to define the process regularity. The research was aimed at preservation of the genetic resources of the pig ex-situ. The modern appliance & preparations were used by the biological & chemical trials execution. The test data were analyzed by freezing preservation of the gametes. The results prognostication was fulfilled. The test data were utilized by the long-term gamete storage & genetic resources preservation of the pigs in ex-situ.

Key words: gametes, freezing preservation, freezing protector, sperm, genetic resources.