

## **ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЕПІДИДИМАЛЬНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ**

**С.І. Ковтун, М.Г. Порхун**

Інститут розведення і генетики тварин УААН

*У статті наведено результати досліджень збереження життєздатності сперматозоїдів кнурів великої білої породи. Встановлено відсутність негативного впливу тридобового зберігання при +5°C сім'яників кнура на життєздатність кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів.*

### **епідидиміс, епідидимальні сперматозоїди, запліднення *in vitro*, збереження генофонду**

Установлено, що використання отриманих із придатка сім'яника (епідидиміс) гамет ряду видів ссавців є останнім шансом отримання потомства від забитого або кастрованого плідника. Така технологія виявляється особливо цінною при роботі з малочисленими і зникаючими породами великої рогатої худоби, близькими дикими видами [4-10] і дає змогу зберігати їх генофонд при випадковій втраті особин високої генетичної цінності. Також використання кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів ссавців сприяє зростанню результативності ряду новітніх методів біотехнології, тому що дає можливість отримувати *in vitro* дешеві зародки [14-15]. Стосовно кнурів, враховуючи проблемність кріоконсервування еякульованих гамет самців, метод збереження епідидимальних сперматозоїдів у рідкому азоті є найбільш важливим для збереження їх генофонду.

Нині наукова література містить небагато даних про можливість використання епідидимальних сперматозоїдів ссавців. Уперше можливість отримання потомства при використанні таких гамет довів І.І. Іванов у 1907 році, досліджуючи рухливість епідидимальних сперматозоїдів бугаїв на 12 добу після кастрації. С. Хопкінс із співавторами у 1989 році зафіксували тільності корів після їх осіменіння заморожено-розмороженими епідидимальними сперматозоїдами гаура (*Bos gaurus*), які були отримані через 27 год після забою самця [13]. Встановлено, що рухливість кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів плямистих оленів становила 41,8 % після чотирьох діб збереження сім'яників при +4 °C [12]. Після 1 – 6 діб зберігання при + 5 °C епідидимісів благородного і плямистого оленів, сперматозоїди були заморожені. Після розморожування рухливість гамет була 10 – 25 % [9]. Встановлено, що епідидимальні сперматозоїди козлів, після інтрацитоплазматичної ін'єкції в яйцеклітини кіз, здатні запліднювати їх *in vitro* навіть після 15 діб зберігання сім'яників при +5 °C, але ефективність запліднення знижувалась зі збільшенням строку зберігання [19]. А. Солер із співавторами [17] отримували функціональні сперматозоїди із придатків сім'яників благородних оленів після декількох діб зберігання при +5 °C. Дослідженнями Ю.К. Дороніна із співавторами встановлено, що сперматозоїди мишей залишаються життєздатними після 18 днів зберігання епідидимісів при +6 °C [3]. Після зберігання упродовж 8 діб при +4 °C епідидимісів собак відзначено поступове зниження їх рухливості та можливості прикріплюватися до прозорої оболонки яйцеклітин [18]. Таким чином, максимальний термін збереження життєздатності епідидимальних сперматозоїдів ссавців є досить високим.

У ссавців виділяють три популяції сперматозоїдів: тестикулярні, епідидимальні та еякульовані. При використанні епідидимальних гамет їх отримують із

хвоста придатка. Це пов'язано з тим, що у хвості епідидиміса сперматозоїди депонуються до еякуляції. Відомо, що сперматозоїди із найбільш дистальної частини тіла епідидиміса і всього хвоста функціонально повноцінні. Також у нормі  $\frac{3}{4}$  зрілих сперматозоїдів знаходяться у хвостовому відділі епідидиміса [2-3].

Вивчення процесів дозрівання і диференціювання статевих клітин сім'яників тварин має велику перспективу для ембріології, біології розвитку медицини і біотехнології. Використання клітин гонад самців у біотехнології розглядається як перспективний напрям отримання трансгенних сільськогосподарських тварин у зв'язку з природною здатністю поглинати чужорідну ДНК (чДНК) при сумісній інкубації і переносити її в яйцеклітину під час запліднення. Ефективність перенесення чДНК таким чином становила 30 – 60 %, а при використанні мікроін'єкції лише – 25 % [11]. Інтенсивні роботи у цьому напрямі проводяться в багатьох країнах світу, але початок таких досліджень покладений повідомленням М.Лавітрано із спів. [16] про отримання 30 % трансгенного потомства мишей, яке стійко передавало трансген у поколіннях. При цьому використовували епідидимальні сперматозоїди мишей, оброблені ДНК pSV2cat.

Нами показана можливість ефективного кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів бугаїв та кнурів, сім'яники яких доставляли до лабораторії протягом 1-1,5 год [6-7]. Установлено, що використання методу заморожування епідидимальних сперматозоїдів плідників сільськогосподарських тварин дає можливість додатково зберігати цінний генетичний матеріал, підвищувати ефективність біотехнологічних методів та забезпечити отримання потомства після штучного осіменіння самиць [1, 7-8]. Розроблено метод кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів кнурів у формі відкритих гранул, що забезпечує результативне використання таких гамет при заплідненні *in vivo* та *in vitro*.

Враховуючи вище сказане, ми дослідили можливість зберігання при знижених температурах сім'яників кнурів протягом 3 діб, що є важливим для забезпечення життєздатності гамет при умові тривалого транспортування матеріалу від місця кастрації тварини і неможливості виконувати роботу з отримання та кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів кнурів.

**Матеріали і методи досліджень.** У досліді використано сім'яники кнура великої білої породи. Після кастрації сім'яники були відділені від мошонки і розміщені для зберігання до 3 діб у холодильнику при +5 °С. Після закінчення зберігання видаляли оболонку сім'яника і епідидиміс. Хвіст епідидиміса був відпрепарований від тіла. Сперматозоїди одержували шляхом розрізання епідидимісів лезом безпечної бритви. Для заморожування епідидимальних сперматозоїдів у формі відкритих гранул (15–20 млн. гамет у гранулі об'ємом 0,2 мл) використовували лактозо-гліцеринно-жовтковий розріджувач (ЛГЖ) та „Біоконсан”. Для встановлення можливості довготривалого зберігання таких гамет перевіряли їх виживаність при +20 °С.

**Результати досліджень.** Дослідження показали, що зразу після виділення із хвостової частини придатка сім'яника поодинокі сперматозоїди виявляють коливальні рухи. Після культивування при кімнатній температурі протягом 10 хв із використанням розріджувача ЛГЖ або „Біоконсан” спостерігається 65–70 % рухливих гамет. Слід зазначити, що на відміну від інших видів тварин, сперматозоїди кнурів рухаються не лише прямолінійно-поступально, а і гвинтоподібно, що зумовлено ложкоподібною формою голівки та ексцентричним прикріпленням шийки до голівки сперматозоїда. Після розморожування рухливість гамет була на рівні 20 %. При проведенні процедури „спливання” (swim-up) для відбору лише рухливих гамет встановлено, що протягом 15 хв

можливо відібрати сперматозоїди кнура в кількості, достатній для запліднення яйцеклітин свинок поза організмом.

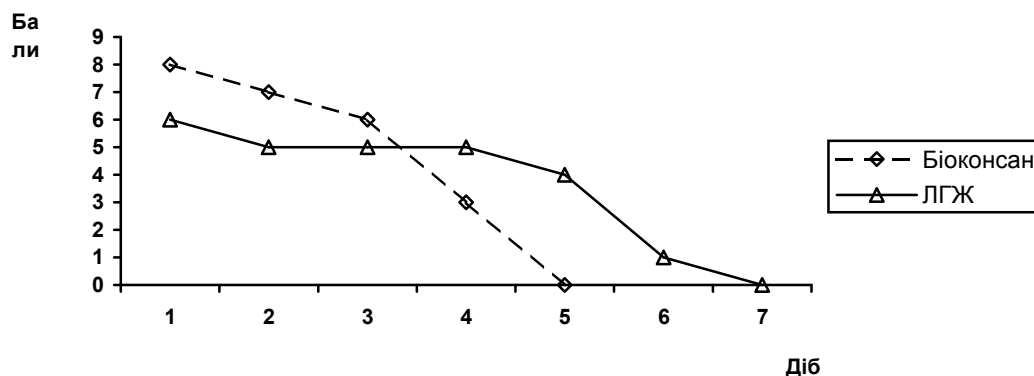


**Рис. 1. Виживаність збережених епідидимальних сперматозоїдів кнурів у різних розріджувачах**

Таким чином, нами встановлено відсутність негативного впливу тривалого (3 доби) зберігання сім'яників при зниженій температурі на життєздатність сперматозоїдів. При цьому не виявлено різниці між використаними розріджувачами. Але, як показали дослідження з вивчення виживаності свіжоотриманих епідидимальних сперматозоїдів кнура (рис. 1), з використанням розріджувача ЛГЖ гамети виживають до 7 діб, у той час як розріджувач „Біоконсан” забезпечував п'ятидобове виживання.

**Висновок.** Кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів кнурів є одним із методів збереження генофонду цього виду сільськогосподарських тварин. Відсутність негативного впливу тридобового зберігання при +5 °С на життєздатність заморожених епідидимальних гамет кнурів розширює можливості застосування біотехнологічних методів у тваринництві.

### Бібліографічний список

1. Буркат В.П. Розведення тварин і збереження їхнього генофонду // Вісн. аграрної науки. - 2006. - № 3 – 4. - С. 100 – 105.
2. Данилова Л.В., Габер Е.С. Транспорт и созревание сперматозоидов в половых путях самца и самки. Эпидидимальные сперматозоиды // «Сперматогенез и его регуляция» - Москва: Наука. – 1983. – С.66 – 73.
3. Доронин Ю.К., Максудов Г.Ю., Мохамедзаде С. М. Длительное сохранение жизнеспособности постмортальными эпидидимальными сперматозоидами млекопитающих // Цитология. – 2004.- Т.46, №9. – С. 786 – 787.
4. Иолчиев Б.С., Абилов А.И., Стрекозов Н.И. Создание зубровидного скота методом гибридизации крупного рогатого скота и зубра // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2004, №4. – С.35 – 36.
5. Ковтун С.И. Успешное использование эпидидимальных сперматозоидов быков для получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма // II Міжнар. ,конф. "Використання сучасних молекулярно-генетичних і біотехнологічних розробок у генетико-селекційних дослідженнях". – К., 1998. – С. 106 – 107.
6. Ковтун С.І. Кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів ссавців як один з методів збереження генофонду // Конференція молодих вчених та аспірантів. Інститут розведення і генетики тварин УААН – с. Чубинське, 2005. – С.28 – 29.

7. Ковтун С.І. Одержання зародків свиней *in vitro*: стан та перспективи використання // Вісн. аграрної науки. - 2004. - № 5. - С. 52 – 54.
8. Ковтун С.І., Мелешко Н.Я. Використання епідидимальних сперматозоїдів кнурів при отриманні зародків свиней *in vitro* // Всеукраїнська конф. молодих вчених “Засади сталого розвитку аграрної галузі” – К., 2002. – С. 128 – 129.
9. Сипко Т.П., Абилов А.И., Шишова Н.В. Криоконсервация постмортальной спермы диких оленей // Биопизика живой клетки. – 1994. - Т. 6. – С. 127-128.
10. Биологические особенности гибридов крупного рогатого скота и зубра/ Стрекозов Н.И., Иолчиев Б.С., Бугрим Л.Н. и др. // Вестник РАСХН. – 2001. - №6. – С.63-65.
11. Эрнст Л.К., Полтавцева Р.А. Биологические и продуктивные качества трансгенных свиней – Москва, 2001. – 132 с.
12. Hishinuma M., Suzuki K., Sekine J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. *Theriogenology*, 2003. - V. 59, №. 3-4. - P. 813-820.
13. Hopkins S.M., Armstrong D., Hummel S., Junior S. Successful cryopreservation of gaur (*Bos gaurus*) epididymal spermatozoa *J.of Zoo Wildl. Med.*, 1989. - V.19, № 4. - P.195-201.
14. Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C/ Kikuchi K., Nagai T., Kashiwazaki N. e. a. // *Theriogenology*. – 1998. – 50. – P.615-623.
15. Kolbe T., Holtz W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocyte with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa additional calcium-ionophore activation in the pig // *Theriogenology*.- 1999.- 52.- P. 671-682.
16. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice/ Lavitrano M., Camaioni A., Fazoi V.M. et all. // *Cell*. – 1989. – 57. – P. 717 – 723.
17. Soler A.J., Perezguzman M.D., Garde J.J. Storage of Red Deer epididymides for 4 days at 5-degrees-C - effects on sperm motility, viability, and morphological integrity // *J. Exp. Zool.*, 2003.- V. 295A, №. 2. – P. 188-199.
18. Yu I., Leibo S.P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C // *Theriogenology*.– 2002.– 57(3).– P. 1179 – 1190.
19. Zhou J.B., Wu Y.G., Han D., Liu L.Q., Tan X.W., Liu N., Luo M.J., Chang Z.L., Tan J.H. Effects of sperm and oocyte quality control on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in goats *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*. 2004.- V. 37, № 5.- P. 367 – 374.

#### СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЭПИДИДИМАЛЬНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ХРЯКОВ

С.И. Ковтун, Н.Г. Порхун, Институт разведения и генетики животных УААН

*Изучалось влияние трех суток хранения при +5 °С семенников хряка на жизнеспособность криоконсервированных эпидидимальных сперматозоидов.*

#### SAVING OF VIABILITY OF BOAR EPIDIDYMAL SPERMATOZOEA

S.I. Kovtun, M.G. Porhun, UAAS Institute of animal breeding and genetics

*Viability of boar epididymal spermatozoa after three days of storage at +5°C was studied.*