

ЩЕРБАК О. В.^{1✉}, КОВТУН С. І.¹, МЕТЛИЦЬКА О. І.², ТРОЦЬКИЙ П. А.¹, ЛЮТА І. М.³, ЛИЗОГУБ О. Ю.¹

¹ Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця Національної академії аграрних наук України,

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1, e-mail: kovtun_si@i.ua

² Державне підприємство «Біологічні ресурси України» Міністерства енергетики та захисту довкілля України,

Україна, 03035, м. Київ, вул. Митрополита Василя Липківського, 35, e-mail: metlitskaya.elena110@gmail.com

³ Миколаївський національний аграрний університет, Україна, 54000, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

✉ ov19792006@gmail.com, (096) 417-63-69

ОЦІНКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ЗА РІЗНИХ РЕЖИМІВ РОЗМОРОЖУВАННЯ

Мета. Оцінити активність кріоконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів за різних режимів розморожування для оптимізації біотехнологічних підходів під час відтворення свиней на основі генетичного матеріалу Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН. **Методи.** Кріоконсервовані еякульовані сперматозоїди кнурів розморожували за трьома режимами. Для оцінки життєздатності сперматозоїдів застосовували біотехнологічні, кріобіологічні, морфологічні методи. **Результати.** Визначено індивідуальну особливість якості сперми досліджуваних кнурів, що впливає на її придатність до кріоконсервації, та якісні показники після розморожування. Встановлено, що у розрідженій спермі кнурів (активність сперматозоїдів у середньому 86,7 %) після її центрифугування та трьохгодинної еквілібрації за температури +4°C, активність сперматозоїдів знизилася в середньому на 25,0 %. З метою підвищення якості кріоконсервованих сперматозоїдів проводили їх розморожування за різних режимів. Найвищим показником активності характеризувалися розморожені сперматозоїди кнура №225 миргородської породи (на рівні 25,0 %) за температури розморожування +70°C із терморезистентністю та термостресстійкістю еякуляту на рівні 70,0 % та 60,0 % відповідно. **Висновки.** Встановлено відмінності якості сперми кнурів на породному та індивідуальному рівні, що впливають на її придатність до кріоконсервації.

Ключові слова: сперматозоїди, культивування *in vitro*, кріобанк, кріоконсервація, кнури.

Пошук шляхів вирішення біотехнологічних проблем тривалого зберігання сперми кнурів світовими вченими започаткований у 1960-х рр. минулого сторіччя. Отримання потомства від кріоконсервованої сперми цього виду було забезпечено за допомогою розробленого методу фракційного штучного осіменіння через шийку матки в 1971 році [1].

Проте, незважаючи на літературні дані щодо досягнення високої запліднювальної здатності та отримання живих поросят після штучного осіменіння кріоконсервованою спермою, широкого використання у виробничих умовах таких підходів як в Україні, так і у світі поки що немає (порівняно з іншими видами сільськогосподарських тварин). Через особливості будови мембран сперматозоїди кнурів є більш чутливими до коливань температури, що призводить до їх пошкодження під час процедури заморожування-розморожування.

Наразі штучне осіменіння є найбільш розповсюдженим методом у свинарстві і займає понад 90 % у країнах Європи [2, 3]. Розбавлену сперму кнурів найчастіше використовують для штучного осіменіння свиноматок через її високу запліднювальну здатність із можливістю отримання понад 12 живих поросят за один опорос [3]. Широко застосовувати штучне осіменіння свиней розпочали у 1980-х роках, що сприяло розробці середовищ для коротко- та

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

довготривалого зберігання сперми за температури +15–17°C, а також стандартизації та комерціалізації катетерів для процедури осіменіння свиноматок [3, 4].

Через наявні біологічні особливості сперматозоїдів кнурів виникають проблеми їх тривалого зберігання за наднизьких температур. Тому дослідження щодо покращення якості кріоконсервованої сперми кнурів для підвищення її запліднювальної здатності та широкого використання для штучного осіменіння і наразі не втрачають своєї актуальності [5]. Встановлено, що якісний та кількісний склад кріосередовищ, фасування та швидкість заморожування мають вплив на життєздатність статевих клітин після розморожування [6, 7, 8]. Доведено, що спосіб та швидкість розморожування кріоконсервованої сперми тісно пов'язані з життєздатністю сперматозоїдів кнурів.

Мета досліджень. Оцінити активність кріоконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів за різних режимів розморожування для оптимізації біотехнологічних підходів під час відтворення свиней на основі генетичного матеріалу Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН.

Матеріали і методи

У дослідженнях використано кріоконсервовані еякульовані сперматозоїди трьох кнурів: термінальний кнур Альба №4995; кнур Енорм №4961 породи ландрас та кнур №225 миргородської породи. Слід зазначити, що сперматозоїди кнурів Альба №4995 та Енорм №4961 перебувають у кріоконсервованому стані у Банку генетичних ресурсів понад десять років.

Еякуляти перед кріобіологічними дослідженнями оцінювали за основними якісними показниками відповідно до «Інструкції із штучного осіменіння свиней» (2003). Також застосовували терморезистентну пробу (ТРП) та тест на термостресстійкість (ТСС) [9].

Підготовку сперми до кріоконсервації проводили шляхом її центрифугування за 3100 об/с (900 g) упродовж 5 хвилин для забезпечення концентрації сперматозоїдів у невеликому об'ємі еякуляту. Одержану концентровану суміш сперматозоїдів розріджували ЛГЖ-середовищем та після 3-годинної еквілібрації за +4°C заморожували у формі відкритих гранул.

Розморожування сперматозоїдів здійснювали у водяній бані за трьох режимів: +35°, +37° та +70°C упродовж 10 с. Виживаність сперматозоїдів визначали шляхом інкубування зразків у термостаті за температури +37°C, загальну рухливість оцінювали кожні 30 хв до повного припинення їх руху. Статистичний аналіз результатів досліджень здійснювали з використанням пакета програм StatPlus Pro 5.9.8. Дослідження проводилися на базі Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця Національної академії аграрних наук України.

Результати та обговорення

Встановлено, що найменший об'єм еякуляту був відібраний від кнура №225, найбільший – від Енорма №4961 (табл. 1). Зазначимо, що у еякуляті останнього з досліджуваних кнурів поряд із високим об'ємом сперми спостерігався найвищий об'єм сперматозоїдів в еякуляті за рівня їх активності 90 %. У кнура Альба №4995, навпаки, було помічено найнижчий відсоток сперматозоїдів в еякуляті за дещо заниженого рівня їх активності.

Таблиця 1. Характеристика свіжоодержаної сперми кнурів

| Кличка, індивідуальний № кнура | Показники якості сперми кнурів | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| | об'єм, мл | порівняння із середнім показником, % | об'єм сперматозоїдів в еякуляті, % | активність сперматозоїдів, % | порівняння із середнім показником, % |
| Альба, 4995 | 256,0 | 101,6 | 4,2 | 80,0 | 92,3 |
| Енорм, 4961 | 260,0 | 103,2 | 8,3 | 90,0 | 103,8 |
| 225 | 240,0 | 95,2 | 6,9 | 90,0 | 103,8 |
| Середній показник | 252,0 | | 4,06 | 86,7 | |

Більш стабільними показниками характеризувалася сперма кнура №225: об'єм еякуляту склав 240,0 мл з 6,9 % об'єму сперматозоїдів в еякуляті та їхньою активністю на рівні 90 %. Отже, за основними морфологічними показниками спермограма досліджених кнурів не виходила за межі визначених стандартів для свиней, а усереднений рівень активності сперми дослідних кнурів сягав 86,7 %.

Для визначення придатності сперми кнурів до кріоконсервації та довготривалого збереження нами застосовано прискорений метод визначення виживаності сперматозоїдів (терморезистентна проба) та тест на термостресстійкість [9]. За названими основними показниками придатності сперми кнурів до кріоконсервації (рис.) найкращими показниками характеризувалася сперма кнура миргородської породи №225, для якого показники терморезистентної проби та термостресстійкості становили 70,0 % та 60,0 % відповідно.

Термостресстійкість сперми кнура Альба №4995 знаходилася на рівні 15,0 %, що свідчить про знижену придатність сперматозоїдів цієї тварини для тривалого зберігання шляхом кріоконсервації. Причина такого явища може полягати у генетичних особливостях походження цього кнура. Кнури термінальної лінії Альба є продуктом багаторічної селекційно-генетичної програми, спрямованої на отримання пісної свинини високої якості. Численними дослідженнями доведено існування закономірних процесів зниження репродуктивних якостей

тварин за їх інтенсивної селекції на підвищення м'ясної продуктивності [10]. В умовах промислових комплексів України встановлено збільшення незапліднених у першу охоту свиноматок спермою кнурів Альба в 3,4 раза (порівняно із ефективністю осіменіння спермою плідників вітчизняної селекції) [11].

Імовірно, під час селекції лінії Альба у тварин не тільки відбулися зміни фізіологічних процесів відкладення сала, але і якісного складу ліпідів та співвідношення жирних кислот у плазмі сперми та структурі клітинних мембран гамет, що в свою чергу асоційовано із гіршими показниками стійкості сперми до дії наднизьких температур.

Наступний етап досліджень передбачав застосування технології кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів із подальшою перевіркою їх життєздатності після розморожування. Встановлено, що після центрифугування сперми кнурів, розрідження середовищем ЛГЖ та трьохгодинної еквілібрації за температури +4°C їх активність знизилася у середньому на 25,0 % (табл. 2).

Слід зазначити, що розморожені сперматозоїди кнура №225 миргородської породи проявляли активність на рівні 25,0 % за температури розморожування +70°C (табл. 3); в порівнянні з активністю до заморожування цей показник знизився в середньому на 73,7 %. Після розморожування сперматозоїдів за температури +35°C та +37°C їх активність знизилася в середньому на 81,6 % та 79,0 %, відповідно.



Рис. Оцінка придатності спермопродукції кнурів різних порід до заморожування.

Таблиця 2. Характеристика розрідженої сперми кнурів

| Кличка, індивідуальний № кнура | Активність сперматозоїдів, % | | | Різниця, % |
|--------------------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|------------|
| | при отри- манні | перед центрифугуванням | після еквілібрації | |
| Альба, 4995 | 80,0 | 80,0 | 30,0 | - 62,5 |
| Енорм, 4961 | 90,0 | 90,0 | 70,0 | - 22,2 |
| 225 | 90,0 | 90,0 | 95,0 | + 5,6 |
| Середній показник | 86,7±3,33 | 86,7±3,33 | 65,0±18,9 | - 25,0 |

Таблиця 3. Життєздатність сперматозоїдів кнурів за різних температурних режимів розморожування

| Кличка, індивідуальний № кнура | Температура розморожування | | | Середній показник активності, % | Вживаність, годин |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------|-----------|---------------------------------------|----------------------|
| | +35°C | +37°C | +70°C | | |
| Альба, 4995 | 10,0±1,44 | 12,5±1,44 | 15,0±1,44 | 12,5±1,44 | 1,5±0,29 |
| Енорм, 4961 | 15,0±1,44 | 17,5±1,44 | 12,5±1,44 | 15,0±1,44 | 2,0±0,29 |
| 225 | 17,5±1,44 | 20,0±2,87 | 25,0±1,44 | 20,8±2,21 | 2,0±0,29 |
| Середній показник | 14,2±2,21 | 16,7±2,21 | 17,5±3,82 | 16,1±1,44 | 1,8±0,17 |

Розморожені сперматозоїди кнура Альба №4995 найвищу активність проявляли на рівні 15,0 % за температури розморожування +70°C; в порівнянні з активністю до заморожування цей показник знизився в середньому на 50,0 %. Після розморожування сперматозоїдів за температури +35°C та +37°C їх активність знизилася в середньому на 66,7 % та 58,3 % відповідно.

Найвищу активність розморожені сперматозоїди кнура Енорм №4961 проявляли на рівні 17,5 % за температури розморожування +37°C; в порівнянні з активністю до заморожування цей показник знизився в середньому на 75,0 %. Після розморожування сперматозоїдів за температури +35°C та +70°C їх активність знизилася у середньому на 78,6 % та 82,2 % відповідно.

Середній показник активності розморожених сперматозоїдів кнура Альба №4995 становив 12,5 % і знизився в порівнянні з активністю до заморожування на 58,3 %. У розморожених сперматозоїдів кнура Енорм №4961 середня активність сперматозоїдів становила 15,0 %; в порівнянні з активністю до заморожування цей показник знизився на 78,6 %.

Нами відзначена індивідуальна особливість якості сперми кнура миргородської породи, що впливає на її придатність до кріоконсервації. Найбільш придатною до кріоконсервації

за показником термостресстійкості була сперма кнура №225, вона становила 60 %. Після деконсервації показник активності сперматозоїдів цього кнура знизився в середньому на 78,1 %.

Слід зазначити, що найнижчу активність сперматозоїдів спостерігали у розморожених гамет кнура Альба №4995 (на рівні 10,0 % за температури розморожування +35°C). Найвищий показник активності сперматозоїдів спостерігали у розморожених гамет кнура №225 миргородської породи (на рівні 25,0 % за температури розморожування +70°C).

За результатами аналізу племінних карток, кнур №225 миргородської породи є потомком плідника спеціалізованої м'ясної породи п'єтрен. У попередніх наших дослідженнях цей кнур характеризувався негативними показниками стійкості сперми до заморожування. Очевидно, що поряд із позитивним впливом породи-поліпшувача (п'єтрен) на м'ясні і відгодівельні якості тварин миргородської породи спостерігався і негативний ефект коселекції, пов'язаний із зниженням репродуктивних якостей, у тому числі показників стійкості сперми плідників помісного походження до наднизьких температур.

Таким чином, недосконалість системи визначення критерію чистопородності тварин за

даними їх генеалогії потребує обов'язкової генетичної експертизи біологічного матеріалу за генетичними маркерами для визначення доцільності його тривалого збереження у банку генетичних ресурсів [12].

Оскільки в результаті проведеної роботи були отримані позитивні результати щодо можливості застосування різних температурних режимів розморожування кріоконсервованої сперми кнурів, можна говорити про перспективність проведення подальших досліджень із розробки та оптимізації відповідних методик та розроблення оптимальних режимів деконсервації для підвищення якісних показників розмороженої сперми кнурів як вітчизняних зникаючих популяцій свиней, так і комерційних порід.

References

1. Bwanga C.O. Cryopreservation of boar semen. I: a literature review, *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1991. Vol. 32, № 4. P. 431–453.
2. Knox R.V. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*. 2016. Vol. 85, I. 1. P. 83–93.
3. Rodriguez-Gil J.E., Estrada E. Bonet In S., Casas I., Holt W.V., Yeste M. Artificial insemination in boar reproduction. *Boar reproduction*. Berlin: Springer. 2013. P. 589–608.
4. Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2000. Vol. 62. P. 142–172.
5. Knox R.V. The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015. Vol. 50 (2). P. 90–97.
6. Bailey J.L., Lessard C., Jacques J., Brique C., Dobrinski I., Zeng W., Galantino-Homer H.L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*. 2008. Vol. 70. P. 1251–1259.
7. Watson P.F., Behan J.R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: Results of a commercially based field trial. *Theriogenology*. 2002. Vol. 57. P. 1683–1693.
8. Korbets'ka O.O. Yakist' dekonservovanoi spermy knuriv zalezno vid sposobiv ii zamorozhuvannia. *Naukovo-tekhnichnyy biuletyn' IT NAAN*. 2013. № 109, ch. 1. S. 135–140. [in Ukrainian] / Корбецька О.О. Якість деконсервованої сперми кнурів залежно від способів її заморожування. *Науково-технічний бюлетень IT НААН*. 2013. № 109, ч. 1. С. 135–140.
9. Kovtun S.I., Shcherbak O.V., Metlyts'ka O.I., Starodub L.F. Metodichni rekomendatsii z otsinky iakosti pryznachenoї do kriokonservatsii spermoproduktsii ta strukturnoi tsilisnosti spermatozoidiv knuriv. Chubyns'ke, 2018. 28 s. [in Ukrainian] / Ковтун С.І., Щербак О.В., Метлицька О.І., Стародуб Л.Ф. Методичні рекомендації з оцінки якості призначеної до кріоконсервації спермопродукції та структурної цілісності сперматозоїдів кнурів. Чубинське, 2018. 28 с.
10. Lindgren Y., Lundeheim N., Boqvist S., Magnusson U. Reproductive performance in pigs reared under organic conditions compared with conventionally reared pigs. *Acta Vet. Scand.* 2013. Vol. 55. P. 33. doi: 10.1186/1751-0147-55-33.
11. Zel'din V.F., Shavkun Iu.N. Osobennosti otsenki produktivnykh kachestv sviney v usloviiakh krupnomashtabnogo proizvodstva sviny. *Svinarstvo*. 2010. Vip. 58. P. 24–31. [in Ukrainian] / Зельдин В.Ф., Шавкун Ю.Н. Особенности оценки продуктивных качеств свиней в условиях крупномасштабного производства свинины. *Svinarstvo: міжвід. темат. наук. збірник*. 2010. Вип. 58. С. 24–31.
12. Hladiy M.V., Polupan Yu.P., Kovtun S.I., Kuzebnij S.V., Vyshnevskiy L.V., Kopylov K.V., Shcherbak O.V. Scientific and organizational aspects of generation, genetics, reproduction biotechnology and protection of the genofonds in livestock breeding. *Animal Breeding and Genetics*. 2018. Vol. 56. P. 5–17. doi: <https://doi.org/10.31073/abg.56.01>.

Висновки

1. Встановлена перспективність застосування різних температурних режимів розморожування кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів з огляду на існування індивідуальних та породних особливостей тварин за цією ознакою.

2. Найвищий показник активності сперматозоїдів спостерігали у розморожених гамет кнура №225 миргородської породи (на рівні 25,0 % за температури розморожування +70°C), а терморезистентність та термостресстійкість еякуляту становили 70,0 % та 60,0 % відповідно.

3. З'ясовано відмінності у якості сперми кнурів на породному та індивідуальному рівнях (залежно від селекції за м'ясним напрямком продуктивності), що впливають на її придатність до кріоконсервації.

SHCHERBAK O.V.¹, KOVTUN S.I.¹, METLITSKA O.I.², TROTSKIY P.A.¹, LYUTA I.M., LYZOHUB O.Yu.¹

¹ *Institute of Animal Breeding and Genetics nd.a. M.V. Zubets, National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 08321, Kiev region, Borispol District, v. Chubinske, 1 Pogrebnyaka str., e-mail: kovtun_si@i.ua*

² *State Enterprise "Biological Resources of Ukraine" of the Ministry of Energy and Environmental Protection of Ukraine,*

Ukraine, 03035, Kiev, Metropolitan Vasily Lipkivsky, 35, e-mail: metlitskaya.elena110@gmail.com

³ *Mykolayiv National Agrarian University,*

Ukraine, 54000, Mykolaiv, George Gongadze, 9, e-mail: iralytaya@gmail.com

EVALUATE THE ACTIVITY OF CRYOPRESERVED BOAR EJACULATED SPERMATOZOA UNDER DIFFERENT THAWING PROTOCOLS

Aim. To evaluate the activity of cryopreserved boar ejaculated spermatozoa under different thawing protocols to optimize biotechnological approaches in pig reproduction based on the genetic material of the Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine. **Methods.** Cryopreserved ejaculated boars' sperm was thawed in three different ways. Biotechnological, cryobiological and morphological methods were used to assess the viability of the sperm. **Results.** We noted the individual feature of semen quality of the studied boars, which affects its suitability for cryopreservation and quality indicators after thawing. It was found that in liquefied boar sperm (sperm activity on average is 86.7%) after its centrifugation and three-hour equilibration at + 4 °C sperm activity decreased by an average of 25.0%. In order to improve the quality of cryopreserved sperm, it was thawed under different conditions. The highest activity of spermatozoa in thawed sperm of boar № 225 of Myrhorod pig was at the level of 25.0% at the thawing temperature + 70 °C, and the thermal resistance and heat resistance were 70.0% and 60.0%, respectively. **Conclusions.** During this study was noted that there are peculiarities of boar semen at breed and individual level, which influence its ability to tolerate cryopreservation.

Keywords: sperm, *in vitro* cultivation, cryobank, cryopreservation, boars.