

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

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
З ОЦІНКИ ЯКОСТІ ПРИЗНАЧЕНОЇ ДО
КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМОПРОДУКЦІЇ
ТА СТРУКТУРНОЇ ЦІЛІСНОСТІ
СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ**

Чубинське, 2018

Авторський колектив:

С. І. Ковтун, доктор с.-г. наук, професор, академік НААН;
О. В. Щербак, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;
О. І. Метлицька, доктор с.-г. наук, ст. наук. співробітник;
Л. Ф. Стародуб, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник.

Рецензенти:

К. В. Копилова, доктор с.-г. наук, заступник директора з наукової та інноваційної роботи Інституту продовольчих ресурсів НААН;
С. В. Кузєбний, кандидат с.-г. наук, заступник директора з наукової роботи Інституту 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 №14 від 27.12.2017 року).

В рекомендаціях узагальнені лабораторні методики оцінки якості сперми кнурів та на основі власних досліджень запропоновані нові методи оцінки життєздатності деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів відповідно до «Інструкції із штучного осіменіння свиней» (Наказ Міністерства аграрної політики України від 13.12.2002 № 395) та ДСТУ 3070-95 «Штучне осіменіння сільськогосподарських тварин. Терміни та визначення».

Рекомендації розраховані на спеціалістів племпідприємств у галузі свинарства, біотехнологічних і кріобіологічних лабораторій, науковців, викладачів і студентів вищих навчальних закладів біологічного й аграрного профілю.

М 54 Методичні рекомендації з оцінки якості призначеної до кріоконсервації спермопродукції та структурної цілісності сперматозоїдів кнурів / С. І. Ковтун, О. В. Щербак, О. І. Метлицька, Л. Ф. Стародуб. – Чубинське, 2018. – 28 с.

ЗМІСТ

	Стор
1. Методичні підходи до кріоконсервації сперми кнурів	4
2. Лабораторні методи оцінки якості сперми	6
2.1. Визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва	6
2.2. Визначення рухливості сперматозоїдів	8
2.3. Визначення тривалості виживаності сперматозоїдів поза організмом	9
2.4. Прискорений метод визначення виживаності сперматозоїдів (терморезистентна проба)	11
2.5. Тест на термостресстійкість сперматозоїдів	12
2.6. Визначення структурної цілісності деконсервованих сперматозоїдів за допомогою гіпоосмотичного тесту	13
2.7. Визначення цілісності хроматину/розривів ДНК в сперматозоїдах тварин (тест ДНК-комет)	14
3. Практичне застосування лабораторних методів оцінки якості сперми кнурів	16
ДОДАТОК	23
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	24

1. Методичні підходи до кріоконсервації сперми кнурів

Перші повідомлення про методи тривалого збереження еякульованої сперми кнурів з'явилися у 70-х роках минулого сторіччя (Pursel & Johnson, 1975). Було експериментально доведено показано, що розроблені методики кріоконсервації сперми кнурів суттєво відрізняються від підходів щодо тривалого зберігання сперми інших видів сільськогосподарських тварин.

Зокрема, у 1975 р. Пурсель і Джонсон розробили метод заморожування сперми кнурів у вигляді гранул. Його ефективність визначалася відносно високою збереженістю рухливості гамет після їх розморожування, але головним недоліком було відсутність можливості індивідуальної ідентифікації кожної гранули. Пізніше були розроблені інші методи кріоконсервації сперми кнурів, які ґрунтувались на заморожуванні зразків сперми у пайетах різного об'єму ("maxi" – 5,0 мл та "mini" – 0,25 або 0,5 мл), що забезпечило індивідуальну ідентифікацію кожної спермодози кнура (Bwanga et al., 1990; Bwanga, 1991).

Упродовж тривалого періоду прогрес у створенні ефективних методів низькотемпературного зберігання еякульованої сперми кнурів був незначний через те, що методологія цього процесу ґрунтувалася на емпіричному підході до досліджень, а не на фундаментальних кріобіологічних основах. Фундаментальний кріобіологічний підхід досліджує та враховує біофізичні характеристики сперми за розробки протоколів кріоконсервації.

Запорукою успішної кріоконсервації сперми є збереження структурної та функціональної цілісності сперматозоїдів. Ці фактори мають вирішальне значення, оскільки різні складові цієї клітини (наприклад, акросома, джгутик, ядро) будуть по-різному переносити процедуру кріоконсервації і мають бути повністю захищені для забезпечення результативного запліднення деконсервованими сперматозоїдами в умовах *in vivo* та *in vitro*. Рухливість сперматозоїда після деконсервації може залишатись на досить високому рівні, а цілісність акросоми може бути порушена під дією, наприклад, фізичних чинників, таких як осмотичний стрес (Gilmore et al., 1998; Agca et al., 2002; Guthrie et al., 2002; Walters et al., 2005).

Наразі існує два методи кріоконсервації сперми кнурів: традиційний метод занурення в азот та спосіб регульованої швидкості заморожування. Показано, що кращі показники життєздатності сперматозоїдів отримують після деконсервації в разі застосування програмного заморожування, порівняно із методами заморожування із неконтрольованою швидкістю (Verheyen, 1993). Проте інші дослідження (Thalchil, 1981) не підтвердили розбіжності результатів застосування цих двох методів. Окрім породоспецифічної плодючості, результати польових досліджень показали, що середня рухливість деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів різних порід (ландрас та дюрк) була відмінною. У кнурів різної породної належності виявлено відмінності у складі мембранних ліпідів, але так і не з'ясовані головні відмінності виживаності сперміїв та загальної фертильності кнурів різних порід

(Waterhouse et al., 2006). Показано, що деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнурів проявляють дещо знижений рівень запліднення та отримання малої кількості потомства після штучного осіменіння (Johnson et al., 2000; Buranaamnuay et al., 2006).

Відносно невисока запліднююча здатність деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів пов'язана з багатьма чинниками. Показано, що генерація активних форм кисню, індукована процесом кріоконсервації, може бути відповідальною за ушкодження сперматозоїдів у ссавців (Griveau і Le Lannou, 1997). Утворення активних форм кисню пов'язане зі зниженням рухливості сперматозоїдів та зниженням здатності сперматозоїда проникати у яйцеклітину. Сперматозоїди чутливі до перекисного окислення ліпідів через високий вміст поліненасичених жирних кислот і не здатні ресинтезувати їхні мембранні компоненти, хоча це не єдиний механізм, який впливає на функціональну активність сперматозоїда та активні форми кисню. Показано, що додавання антиоксидантів до середовищ для розрідження сперми кнурів покращували показники якості свіжої сперми кнурів (Bamba and Cran, 1992; Funahashi and Sano, 2005) та кріоконсервованих еякульованих сперматозоїдів (Breininger et al., 2005; Gadea et al., 2005, Pena et al., 2003; Roca et al., 2004; Roca et al., 2005).

Наразі, оцінка сперми переважно застосовується для прогнозування фертильності кнурів та її придатності до тривалого збереження за наднизьких температур. Традиційні лабораторні методи оцінки сперми, такі як концентрація сперми, рухливість і морфологічні показники сперміїв не здатні виявити тонкі аномалії та порушення, що негативно впливають на здатність до репродукції (Holt et al., 2005), підкреслюючи необхідність пошуку нових методів оцінки глибоких змін сперміїв у процесі кріоконсервації (Rusu A.V. et al., 2009). Одним із відносно нових лабораторних підходів, що застосовується в роботі кріолабораторій, є тест HOST (гіпо-осмотичний тест), який дозволяє визначати рівень функціональності мембран сперматозоїдів після їх розморожування.

Незважаючи на тривалий період досліджень властивостей сперміїв під впливом наднизьких температур, до цього часу залишаються невизначеними деякі характеристики сперми, що можуть впливати на процеси заморожування-відтаювання (Hernandez et al., 2007). Геномна цілісність є одним з основних нещодавно досліджених параметрів, що визначає важливу роль у штучному осіменінні й заплідненні *in vitro*, а високий рівень фрагментації ДНК впливає на процес запліднення і нормальний розвиток ембріону.

Незважаючи на збереження функціональності мембран і життєздатності сперматозоїдів, проблеми із тривалим збереженням сперми за наднизьких температур, можуть бути викликані порушеннями цілісності геному, що можуть бути визначено чутливим методом аналізу – ДНК-комет тестом.

У методичних рекомендаціях запропонований детальний опис основних лабораторних методів для ефективно оцінки сперми: спермограма, структурна та морфологічна оцінка, визначення геномної цілісності сперматозоїдів.

2. Лабораторні методи оцінки якості сперми

2.1. Визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва

Для визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, камера Горяєва (рис. 1), столик з підігрівом, термостат водяний, гумова груша, еритроцитарний меланжер, скельця шліфовані покривні та предметні, палички скляні, піпетки мірні, салфетки марлеві, 3% розчин хлориду натрію, спирт етиловий ректифікований (C_2H_5OH). Слід відмітити, що цей метод є одним із доступних і не потребує великих фінансових витрат.

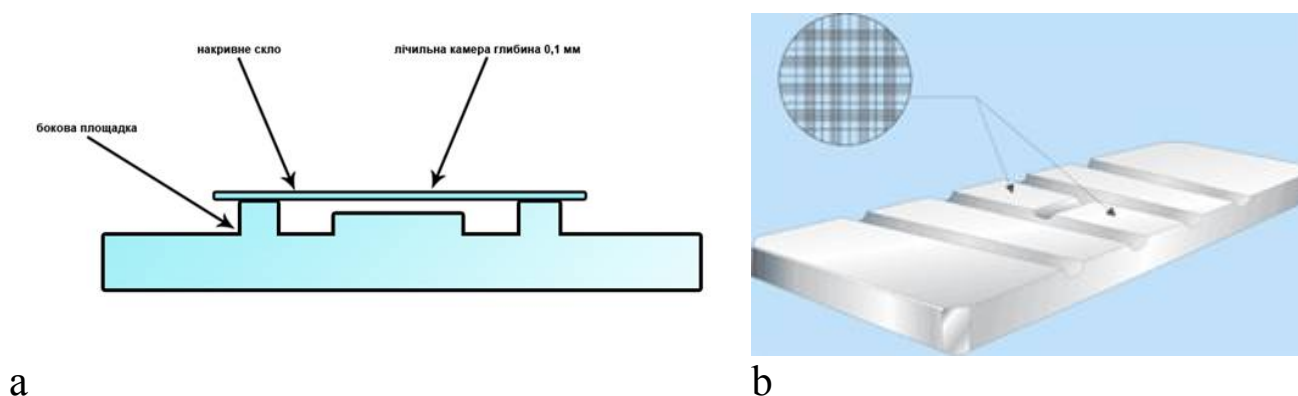


Рис. 1. Загальний вигляд (а) та будова камери Горяєва (б)

На початку проведення досліджень еритроцитарний меланжер промивають сумішшю етилового спирту з ефіром у співвідношенні 1:1.

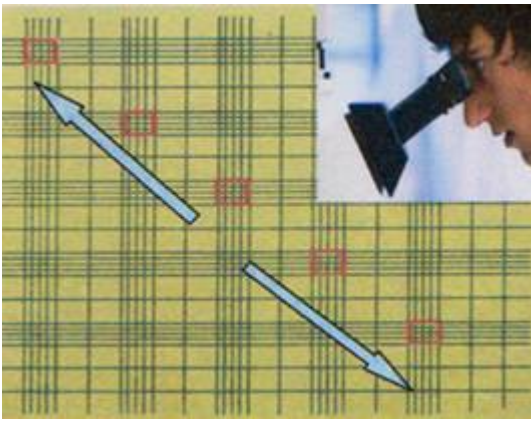
Отриману сперму ретельно перемішують скляною паличкою і набирають у меланжер до мітки «0,5». До мітки «11» набирають 3% розчин хлориду натрію. Фізіологічний розчин розріджує сперму в 20 разів і призводить до адинамії сперматозоїдів.

Обидва кінці меланжера затискають великим і вказівним пальцями. Меланжер струшують упродовж двох – трьох хвилин для рівномірного перемішування сперми з фізіологічним розчином. Для підрахунку кількості сперматозоїдів, перші 3-4 краплі розведеної сперми не використовують. Четверту та п'яту краплі наносять на край притертого до камери Горяєва шліфованого покривного скла. Нанесені краплі сперми затікають під скло і заповнюють камеру.

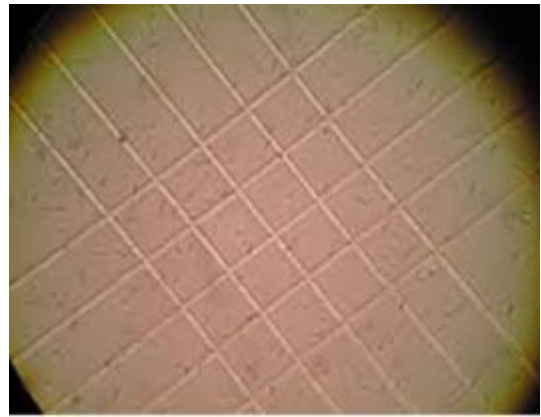
Підрахунок кількості сперматозоїдів здійснюють при збільшенні окуляра $7\times$ і об'єктива $40\times$ або відповідно $15\times$ і $20\times$.

Необхідно стежити, щоб на сітці камери не утворювались пухирці повітря і сперма не потрапляла під притерті краї покривного скла.

Це дозволяє в полі зору мікроскопа розмістити один великий або 16 малих квадратів. Кількість сперматозоїдів підраховують у розміщених по діагоналі 80 малих квадратах (рис. 2).



П'ять великих квадратів розміщені по діагоналі



Один великий квадрат складається із 16-ти маленьких

Рис. 2. Схема підрахунку сперматозоїдів у камері Горяєва

Зображення сперматозоїдів, які знаходяться у глибині камери, постійно корегують мікрогвинтом мікроскопа. Розміщення клітин з зовнішньої або внутрішньої сторін квадрата визначають за місцем знаходження головок. Розміщені на лівій і верхній лініях квадрата головки сперматозоїдів зараховують до того квадрата, у якому здійснюють підрахунок; розміщені на правій і нижній лініях – до наступного.

Загальний вигляд робочого місця під час визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва представлено на рисунку 3.

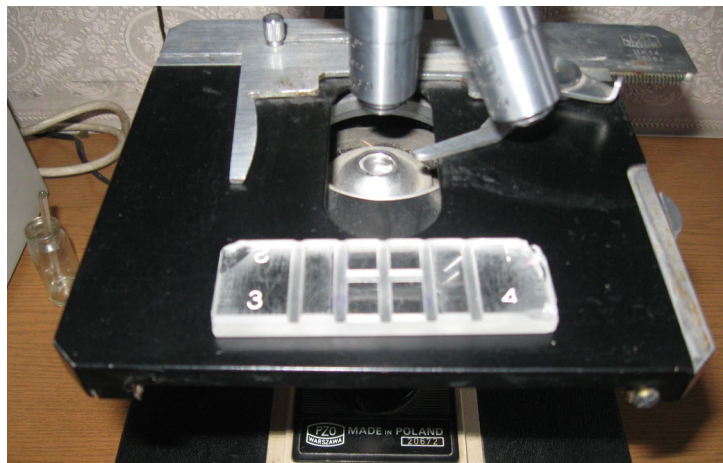


Рис. 3. Сітка з камерою Горяєва на предметному столику мікроскопа

Концентрацію (C) клітин в еякулятах або спермодозі визначають за формулою:

$$C = \frac{n \cdot D \cdot S}{N \cdot p \cdot 1\,000\,000}$$

де: N – кількість малих квадратів (n = 80),
n – кількість підрахованих клітин,

D – розведення сперми у меланжері (20),
S – площа малого квадрата (400 мм²),
p – глибина камери (0,1 мм),
1 000000 – коефіцієнт для перерахунку кількості сперматозоїдів (млрд./мл).

За кінцевий результат приймають середнє арифметичне з трьох визначень. Різниця між величинами не має перевищувати ± 10%.

Приклад. Якщо в п'ятьох великих квадратах нарахували 17+28+22+16+17=100 сперматозоїдів, то при розведенні еякуляту в 20 разів їх концентрація у 1 мл сперми становить 0,1 млрд.

$$C = \frac{100 \cdot 20 \cdot 400}{80 \cdot 0,1 \cdot 1\,000\,000} = 0,1 \text{ млрд} / \text{мл}$$

Мінімальні вимоги до сперми, придатної для кріоконсервації, відображено у додатку (стор. 22).

2.2. Визначення рухливості сперматозоїдів

Під рухливістю сперматозоїдів вважають їх здатність до прямолінійного поступального руху. Для проведення оцінки рухливості сперматозоїдів необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, термостат, предметне скло, покривні скельця, палички скляні, піпетки мірні, натрій лимоннокислий (C₆H₅O₇Na₃ · 5H₂O), натрій хлористий (NaCl).

За 20–30 хв. до початку роботи вмикають термостат. Робоча температура внутрішньої камери термостата має становити 40–42°C. Стерильний лабораторний посуд (скельця шліфовані покривні і предметні, скляні палички, піпетки) і потрібні розчини зберігають за температури 35–40°C.

Рухливість статевих клітин визначають за допомогою біологічного мікроскопа при збільшенні у 120 або 180 разів. Скляною паличкою (піпеткою) на предметне скло наносять краплю сперми, до якої додають 2–3 краплі 3% розчину лимоннокислого натрію. Сперму змішують з розчином і накривають покривним скельцем. Рухливість сперматозоїдів визначають у полі зору мікроскопа. Підраховують кількість клітин з прямолінійним поступальним, манежним і коливальним рухами, а також мертвих. У кожній пробі три рази поспіль (n=3) визначають кількість рухливих сперматозоїдів. Оцінювання проводять за десятибальною системою: за кожних 10% сперматозоїдів з прямолінійно-поступальним рухом ставлять один бал (0–10) або відсотками (0–100; рис. 4).

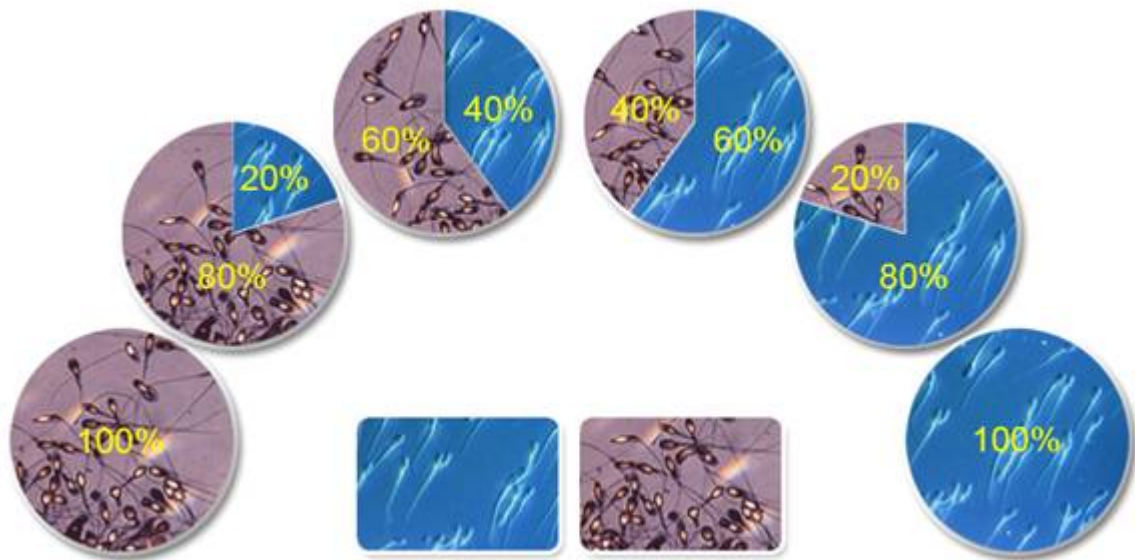


Рис. 4. Оцінка якості сперми за рухливістю

Рухливість сперматозоїдів (P_c) визначають за формулою:

$$P_c = \frac{n_1 \cdot 10 \cdot (100)}{n},$$

де: n – сумарне число підрахованих сперматозоїдів;

n_1 – число підрахованих клітин з прямолінійним поступальним, манежним і коливальним рухами;

10 (100) – постійні коефіцієнти, потрібні для оцінки рухливості сперматозоїдів балами (0–10) або відсотками (0–100).

За кінцевий результат досліджень приймають середню арифметичну величину за даними двох визначень.

Мінімальні вимоги до сперми, придатної для кріоконсервації, відображено у додатку (стор. 22).

2.3. Визначення тривалості виживаності сперматозоїдів поза організмом самця

Запліднювальна здатність сперматозоїдів тісно пов'язана з їх виживаністю поза організмом, що, у свою чергу, залежить від їх стійкості до зовнішніх впливів. Абсолютну виживаність сперматозоїдів визначають за кожний окремо взятий інтервал часу в процесі зберігання сперми після її розрідження. Тривалість виживаності визначають кількістю годин, що минули від початку зберігання сперми до повної втрати рухливості клітинами.

Для проведення визначення тривалості виживаності сперматозоїдів поза організмом самця необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, термостат, холодильник, предметне і покривне скло, колби мірні (50–500 мл), глюкозо-жовтково-цитратне середовище.

Перед початком дослідження не менше ніж дві проби розріджують глюкозо-жовтково-цитратним середовищем. Ступінь розведення сперми має коливатися у межах 1:8–1:32. Для досліджень використовують лише один ступінь розведення сперми. Розріджену сперму зберігають у холодильнику за температури 3–5°C. Рухливість сперматозоїдів визначають після кожного інтервалу (t=24 год.) від початку одержання сперми. Закінченням досліджень вважають день, коли мінімальна кількість рухливих сперматозоїдів знижується до 0,5 бала або 5 відсотків.

Абсолютну виживаність сперматозоїдів (At) визначають за формулою:

$$At = a_1t_1 + a_2t_2 + a_3t_3 + \dots + a_nt_n,$$

де $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$ – рухливість сперматозоїдів за інтервали часу у балах; $t_1, t_2, t_3, \dots, t_n$ – інтервали часу, впродовж яких рухливість сперматозоїдів становить $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$, год;

$a_1t_1 + a_2t_2 + a_3t_3 + \dots + a_nt_n$ – виживаність сперматозоїдів за інтервали часу.

За кінцевий результат досліджень приймають середнє арифметичне з двох визначень. Невідповідність між величинами не має перевищувати $\pm 10\%$.

Інтервали часу (t_1, t_2, t_3, \dots) в годинах визначають за формулою:

$$t_1, t_2, t_3 = \frac{T_{n+1} - T_{n-1}}{2},$$

де T – час від початку до наступного дня досліджень, год.;

n – порядковий номер дня досліджень.

В останній день досліджень, коли неможливо встановити мінімальну рухливість сперматозоїдів, інтервал часу (t_n) в годинах знаходять за формулою:

$$t_n = \frac{T_{nc} - T_{n-1}}{2},$$

де T_{nc} – час виживання сперматозоїдів, год;

T_{n-1} – час від першого до наступного дня дослідження, год.

Час виживання сперматозоїдів (T_{nc}) обчислюють годинами за формулою:

$$T_{nc} = \frac{T_n - T_{n-1}}{2} + T_{n-1},$$

де T_n – час від початку до останнього дня досліджень, год. Результати з визначень проведених досліджень записують у лабораторний журнал.

Приклад.

1. Інтервал часу на четвертий день досліджень за формулою становить 36 годин.

$$t_4 = \frac{T_5 - T_3}{2} = \frac{120 - 48}{2} = 36 \text{ год.}$$

Показник виживання сперматозоїдів за даний інтервал часу становить 252 ум. од.

$$a_4 t_4 = 7 \cdot 36 = 252 \text{ ум. од.}$$

2. Вживання сперматозоїдів у годинах за формулою становить 252 години.

$$T_{nc} = \frac{T_n - T_{n-1}}{2} + T_{n-1} = \frac{264 - 240}{2} + 240 = 252 \text{ год.}$$

3. Інтервал часу на кінцевий (дев'ятий) день досліджень становить 18 годин.

$$t_9 = \frac{T_{nc} - T_{n-1}}{2} = \frac{252 - 216}{2} = 18 \text{ год.}$$

4. Абсолютне вживання сперматозоїдів ($n=3$) становить:

$$At_2^1 = \sum_{at}(108+216+288+252+216+180+72+48+18) = 1398;$$

$$At_2^2 = \sum_{at}(108+216+216+216+216+120+48+18) = 1410;$$

$$At_2^3 = \sum_{at}(108+216+288+288+288+216+180+56+48+18) = 1458.$$

Невідповідність між мінімальним (1398) і максимальним (1458) значеннями абсолютного вживання сперматозоїдів становить 60 ум. од. або 4,3%, а його середнє значення за формулою становить 1422 ум. од.

$$At^{1-3} = At^1 + At^2 + At^3/3,$$

$$\text{де } At^{1-3} = 1398+1410+1458/3 = 1422 \text{ ум. од.}$$

2.4. Прискорений метод визначення вживаності сперматозоїдів (терморезистентна проба)

З метою зменшення затрат часу на визначення рухливості сперматозоїдів упродовж тривалого зберігання за кімнатної температури доцільно застосовувати терморезистентну пробу (Квасницький О.В., 2010).

Для постановки терморезистентної проби необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, термостат, предметне скло, покривні скельця, мірні колби (20–50 мл), палички скляні, піпетки мірні, натрій лимоннокислий ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5H_2O$), .

Одержану нерозріджену або розріджену сперму вносять у стерильну мірну колбу, яку розміщують у термостаті за температури $+38^\circ C$ на три години. Через три години проводять оцінку рухливості сперматозоїдів, яка і буде відображати стан якості сперми. Сперма доброї якості приймається з показником рухливості сперматозоїдів не менше 60%.

Мінімальні вимоги до сперми, придатної для кріоконсервації, відображено у додатку (стор. 22).

2.5. Тест на термостресстійкість

У практиці штучного осіменіння свиней широко застосовується розріджена сперма кнурів, яка зберігається за температури $+16^{\circ}\text{C}$ – $+18^{\circ}\text{C}$. Відомо, що придатність такої сперми для штучного осіменіння, в основному, визначається за показником прямолінійно-поступальної рухливості сперматозоїдів. Згідно з існуючим нормативними документами цей показник розрідженої сперми впродовж 72 год. зберігання за вищезгаданої температури повинен бути не менш ніж 6 балів (60%), а нативної – 7 балів (Інструкція із штучного осіменіння свиней, 2003). Застосування такої сперми, за умов дотримання всіх чинників технології штучного осіменіння, гарантує одержання високих стабільних результатів запліднення та приплоду в свиноматок. Використання сперми кнурів-плідників довготривалого зберігання (замороженої в рідкому азоті при -196°C) у виробничих умовах поки що обмежено, в зв'язку з низьким рівнем заплідненості свиноматок та їх продуктивністю. Однією з основних причин такого явища є низька функціональна активність сперматозоїдів після процедури заморожування-розморожування (кріоконсервації), яка в кращому випадку становить близько 4-5 балів. Причому, відомо, що тільки від незначного відсотку наявного поголів'я кнурів можна одержати сперму, яка витримує наднизькі температурні умови. Отже, попередній відбір еякулятів кнурів, придатних до кріоконсервації, має суттєве значення в практиці відтворення поголів'я. Науковцями Інституту свинарства та АПВ НААН (Квасницький О.В., Мартиненко Н.А., Коваленко В.Ф., Базалевич А.В., 2010) для визначення придатності сперми кнурів до кріоконсервації і довготривалого збереження був запропонований тест на визначення термостресстійкості сперматозоїдів кнурів.

Основою тесту на термостресстійкість є визначення рівня життєздатності сперматозоїдів кнура в діапазоні від температури тіла тварини (приблизно $+38^{\circ}\text{C}$) до передпорогової межі температурного шоку (приблизно $+13^{\circ}\text{C}$). Застосування цього тесту забезпечує об'єктивний прогноз рівня здатності сперматозоїдів витримувати дію багаторазових температурних стресів – термостресстійкість (ТСС).

На початку проведення тесту на термостресстійкість визначають початкову рухливість сперматозоїдів. Для цього у біологічній пробі сперми, певного еякуляту, об'ємом 5–10 мл., розрідженої згідно з технологією кріоконсервації у співвідношенні 1:1 глюкозо-хелато-цитратно-сульфатно-жовтковим середовищем (ГХЦСЖ) або його аналогами, оцінюють початкову рухливість сперматозоїдів за температури $+38^{\circ}\text{C}$ при збільшенні мікроскопа у 180 – 300 разів. Рухливість сперматозоїдів повинна бути не менше 8 балів. Наступний етап тесту передбачає контрастну зміну температурного режиму зберігання сперми, а саме: упродовж трьох годин пробу сперми поперемінно витримують по 30 хв. за температури $+38^{\circ}\text{C}$ та $+13^{\circ}\text{C}$. Потім реєструють кінцеву рухливість сперматозоїдів, що і відповідає показнику їх ТСС. Придатними для використання визначаються проби, в яких рухливість

сперматозоїдів, після дії контрастного позитивного температурного режиму, становить не менше 4 балів.

ТСС сперматозоїдів є об'єктивним показником прогнозування придатності еякулятів кнурів до кріоконсервації.

Мінімальні вимоги, що висуваються до сперми, призначеної для кріоконсервації, відображено у додатку (стор. 22).

2.6. Визначення структурної цілісності деконсервованих сперматозоїдів за допомогою гіпоосмотичного тесту

Тест HOST (гіпоосмотичне набухання сперматозоїдів) (Jeyendran et al., 1984) ґрунтується на визначенні інтактних життєздатних сперматозоїдів. При додаванні до зразків сперми гіпоосмотичного розчину відбувається набухання цитоплазми цілих неушкоджених сперматозоїдів. Метод ґрунтується на нездатності сперматозоїдів із ушкодженими мембранами до набухання та закручування їх джгутиків. За результатами цього тесту еякулятом, придатним для проведення подальших біотехнологічних маніпуляцій (норма), приймається такий, у якому кількість сперматозоїдів із набухлою цитоплазмою та закрученими джгутиками визначається у кількості понад 58%.

Цей метод є корисним для відбору життєздатних сперматозоїдів без застосування їх фарбування.

Сперматозоїди з інтактними мембранами набухають упродовж 5 хв. у гіпоосмотичному розчині, а форми джгутиків стабілізуються до 30 хв. (Hossain et al., 1998).

Розчин для набухання з метою визначення ушкоджених сперматозоїдів готують із 0,375 г дигідрату цитрату натрію і 1,351 г D-фруктози у 100 мл дистильованої води. Аліквоти цього розчину по 1 мл заморожують за температури (-20⁰ C).

Готову аліквоту необхідно нагріти у конусній пластиковій пробірці за +37⁰C упродовж 5 хв. Далі ретельно перемішується зразок сперми у кількості 100 мкл. і додається до гіпоосмотичного розчину, обережно перемішується піпетуванням. Готова суміш інкубується за температури +37⁰C упродовж 30 хв. Відбирається 10 мкл підготованого розчину і розміщується на чисте предметне скло, накривається покривним скельцем (22 × 22 мм). Відбирають повторну аліквоту підготовленого підігрітого гіпоосмотичного розчину та додають пробу сперми у кількості 10 мкл. Процедура з цим зразком повторюють у тому порядку та режимі, як зазначено вище. Кожне скло оцінюється у фазово-контрастному мікроскопі при збільшенні ×200 або ×400 (табл. 1).

За допомогою лабораторного лічильника, підраховують кількість не набухлих (мертвих) і набухлих клітин (живі). Для досягнення мінімальної статистичної похибки проводиться оцінка 200 сперматозоїдів у кожній аліквоті та розраховується середній процент живих клітин і різниця між аліквотами. Якщо різниця між двома вимірюваннями не перевищує зазначеного у таблиці,

визначають середнє значення живих клітин. У випадку отримання великого значення похибки, всю процедуру повторюють з початку.

1. Допустимі рівні підрахунку статистичної похибки між вимірюваннями двох аліквот сперми

Число сперматозоїдів	Статистична похибка, %	Число сперматозоїдів	Статистична похибка, %
5	20,0	75	11,5
30	18,3	80	11,2
35	16,9	85	10,8
40	15,8	90	10,5
45	14,9	95	10,3
50	14,1	100	10,0
55	13,5	150	8,2
60	12,9	200	7,1
65	12,4	250	6,3
70	12,0	300	5,8

Набухлі сперматозоїди ідентифікують за зміною форми клітини та скручування джгутика (рис. 5).

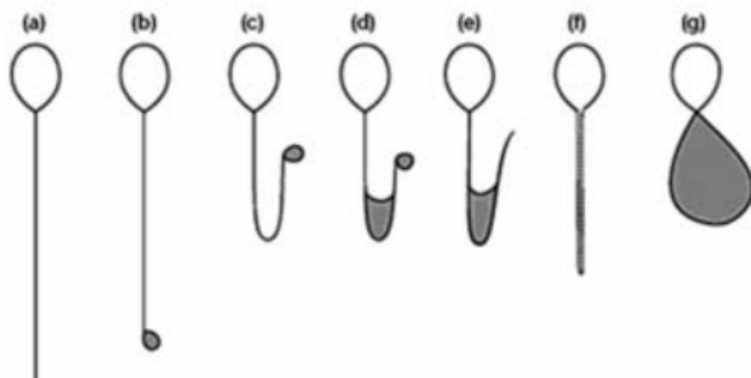


Рис. 5. Типові зміни форми голівок і хвостиків сперматозоїдів при гіпоосмотичному стресі (за Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez-Pelaez M., Crabo V. G., Zaneveld L. J. D. (1984)

- a) зміни відсутні,
- b-g) різні типи набухання джгутиків.

Живі клітини ідентифікують за різними формами набухання джгутиків і підраховують як живі сперматозоїди з неушкодженими мембранами.

2.7. Визначення цілісності хроматину/розривів ДНК в сперматозоїдах тварин (тест ДНК-комет)

Для проведення визначення цілісності хроматину/ДНК в сперматозоїдах тварин (ДНК-комет тест) особливу увагу приділяють підготовці предметних скелець для нанесення зразків сперми.

Предметні скельця поміщають у розчин агарози (опис нижче) вертикально і утримують в ньому упродовж 60 сек., повторюючи це 10 разів доти, доки на склі не утвориться однорідна плівка (товщина 1–2 мм). Розчин звичайної агарози з концентрацією в 1% готується на дистильованій воді в чашці Копліна і доводиться до кипіння на водяній бані. Після того, як розчин агарози стає повністю прозорим, він переноситься у вертикальні контейнери. Контейнери для агарози повинні бути попередньо нагріті до температури від +60°C до +100°C, наприклад до +70°C, у водяній бані, щоб підтримувати розчин агарози в рідкому стані. Після занурення скельця у розчин агарози їх розміщують горизонтально на гладку поверхню, наприклад на скло чи метал, і охолоджують у холодильнику при $t=+4^{\circ}\text{C}$ до повного застигання агарози на поверхні скла. Далі предметні скельця розміщують у горизонтальному положенні в сухожаровій шафі за $t=+37^{\circ}\text{C}$ до повного застигання агарози і утворення нею тонкої плівки на поверхні скла.

Наступним етапом дослідження є приготування зразків сперми для нанесення на предметні скельця.

Зразок сперми поміщається в агарозний мікротгель. Для цього готується розчин легкоплавкої агарози з концентрацією 2% в дистильованій воді. Сперма і розчин агарози обережно змішується у пробірках так, щоб кінцева концентрація агарози була 1% (70 мкл розчину агарози з 30 мкл зразка). Температура розчину агарози повинна бути не вищою ніж +37°C. Краплю суміші (20 мкл) за допомогою мікропіпетки наносять на готові скельця і накривають покривним склом. Скельця з агарозним гелем поміщають у холодильник за температури -4°C на 30 хв. до повного застигання агарози. Після затвердіння агарози предметні скельця обережно знімають, не пошкоджуючи мікротгель.

Наступним етапом дослідження є стадія обробки зразка, що містить сперматозоїди, розчином, який денатурує ДНК.

В якості розчину для денатурації ДНК використовують розчин соляної кислоти з концентрацією 0,2 N.

Предметні скельця із зразками розміщують у горизонтальному положенні у контейнер, який містить розчин, денатуруючий ДНК. Потім їх інкубують протягом 15 хв. за температури +22 °C.

Наступним етапом досліджень є стадія обробки зразка, що містить сперматозоїди, розчином для лізису ДНК.

Кожне предметне скло занурюється у горизонтальному положенні у ємність, яка містить лізуючий розчин, на 25 хв. за $t=+22^{\circ}\text{C}$.

Склад лізуючого розчину: (pH – 7,5)

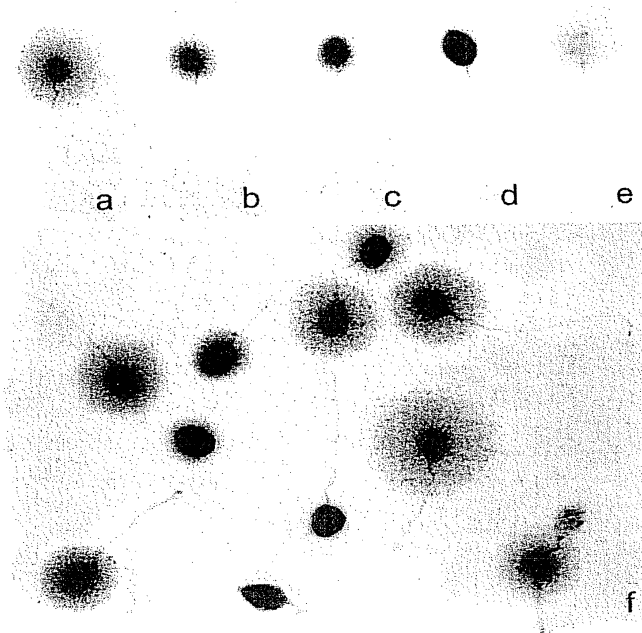
- 1) 2,5M NaCl;
- 2) 0,2M дітіотрейтолу (DTT);
- 3) 0,2M Tris;
- 4) 0,1M ЕДТА (трилон Б);
- 5) 1% Triton X-100®.

Для аналізу за використання світлового мікроскопу зразки фарбують барвником Райта. Розчин Райта перемішується з фосфатним буфером у співвідношенні 1:1 за об'ємом. У барвник, налитий у ємність, розміщується у горизонтальному положенні зразок так, щоб шар барвника повністю покривав мікрогель. Час фарбування складає 10 хв. Далі предметні скельця промивають дистильованою водою і залишають на повітрі за кімнатної температури до повного висихання.

Визначення цілісності хроматину/ДНК сперматозоїдів здійснюють шляхом диференціації різних типів клітин.

Аналізується як мінімум 500 сперматозоїдів на кожному зразку, застосовуючи наступні критерії (рис. 6):

- 1) сперматозоїд без диспергованого ореолу хроматину;
- 2) сперматозоїд без диспергованого ореолу хроматину і деградований (ядро яких фрагментоване на гранули);
- 3) сперматозоїд із диспергованим ореолом маленького розміру: ширина ореолу менше чи рівна $1/3$ найменшого діаметра ядра;
- 4) сперматозоїд із середнім розміром диспергованого ореолу: ширина ореолу знаходиться в наступному діапазоні: більше ніж $1/3$ від найменшого діаметра ядра і менше ніж діаметр ядра.
- 5) сперматозоїд із диспергованим ореолом великого розміру: сперматозоїд, у якого ореол більший чи рівний найменшому діаметру ядра.



- a. сперматозоїд з ореолом великого розміру \geq найменшому діаметру ядра;
 - b. сперматозоїд з ореолом середнього розміру $>1/3$ від найменшого діаметра ядра;
 - c. сперматозоїд з ореолом маленького розміру $\leq 1/3$ від найменшого діаметра ядра;
 - d. сперматозоїд без ореолу;
 - e. деградований;
 - f. загальна картина з різними типами сперматозоїдів;
- a. b. без фрагментації ДНК;
c. d. e. із фрагментацією ДНК.

Рис. 6. Визначення цілісності ДНК сперматозоїдів

Сперматозоїди без ореолу чи з ореолом маленького розміру відображають значну фрагментацію ДНК у них. Процентний вміст сперматозоїдів із

фрагментованою ДНК дорівнює сумі, яка складається з трьох категорій сперматозоїдів – з маленьким ореолом, без ореола та деградованих сперматозоїдів без ореолу. Ступінь фрагментації ДНК в межах норми становить 0-15%.

3. Практичне застосування лабораторних методів оцінки якості сперми кнурів

Практичне застосування лабораторних методів оцінки якості сперми кнурів є визначальним етапом у технології кріоконсервації сперми плідників. Результати, отримані під час досліджень, забезпечать ефективність технології довгострокового зберігання генетичних ресурсів тварин.

За використання інформативних біотехнологічних методів стало можливим проведення оцінки придатності сперми кнурів до кріоконсервації та накопичення такого генетичного матеріалу у банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

У роботі використовували сперму кнурів, відібрану одночасно від трьох кнурів миргородської породи, які утримувалися у державному підприємстві дослідне господарство «Надія» Інституту свинарства і АПВ НААН.

Еякуляти відбирали мануальним методом від плідників миргородської породи (№№1159, 79, 347) віком 2–2,5 роки за умов відсутності попередніх еякуляцій упродовж тижня. Одразу після отримання сперму оцінювали за її основними якісними показниками та розріджували середовищем для транспортування, яке розроблено науковцями Інституту свинарства і АПВ НААН. Тривалість транспортування еякулятів до лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН не перевищувала шести годин. Оцінена сперма кнурів відповідала вимогам, визначеним «Інструкцією із штучного осіменіння свиней» (2003).

Концентрацію сперматозоїдів у еякуляті визначали за допомогою камери Горяєва. Вживаність сперматозоїдів у годинах визначали за терморезистентною пробою при $+38^{\circ}\text{C}$ упродовж трьох годин. Термостресстійкість визначали упродовж трьох годин з еквілібрацією температур від $+12^{\circ}\text{C}$ до $+38^{\circ}\text{C}$ упродовж кожних 30 хв., згідно описаних вище методичних підходів. Весь обсяг лабораторних досліджень проводився на базі Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (табл. 2).

Для підготовки сперми до кріоконсервації її центрифугували при 3100 об./сек. (900 g) упродовж 5 хвилин для концентрації сперматозоїдів у невеликому об'ємі еякуляту. Одержану концентровану суміш сперматозоїдів розріджували лактозо-глицерино-жовтковим (ЛГЖ) середовищем та після 3-годинної еквілібрації при $+4^{\circ}\text{C}$ заморожували у формі відкритих гранул.

2. Характеристика отриманої сперми кнурів

Індивідуальний №	Показник					
	об'єм, мл	порівняння із середнім показником, %	об'єм сперматозоїдів в еякуляті, %	загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, млрд.	рухливість сперматозоїдів, %	порівняння із середнім показником, %
1159	260,0	86,7	4,2	76,1	90,0	103,8
79	240,0	80,0	5,0	31,5	80,0	92,3
347	400,0	133,3	3,0	36,4	90,0	103,8
Середній показник	300,0		4,06	48,0	86,7	

Встановлено, що найменший об'єм еякуляту був відібраний від кнура №79, найбільший – у №347 (табл. 2). Відмітимо, що у еякуляті останнього з досліджуваних кнурів, поряд з високим об'ємом сперми, спостерігався найменший об'єм сперматозоїдів у еякуляті (3,0%) за рівня їх рухливості 90%. У кнура №79, навпаки, було відмічено найвищий відсоток сперматозоїдів у еякуляті, але у перерахунку на кількість їх значення було найменшим серед досліджених тварин і не перевищувало 31,5 млрд. за дещо заниженого рівня їх рухливості (80%).

Кращими показниками характеризувалася сперма кнура №1159, а зафіксований в його еякуляті показник кількості сперматозоїдів був найвищим і склав 76,1 млрд. Отже, за основними морфологічними параметрами, спермограма досліджених кнурів не виходила за межі визначених стандартів для свиней, усереднений рівень рухливості сперми дослідних кнурів сягав 87,5%.

Для визначення придатності сперми кнурів до кріоконсервації і довготривалого збереження нами застосовано прискорений метод визначення виживаності сперматозоїдів (терморезистентна проба) та тест на термостресстійкість. За вказаними основними показниками придатності сперми кнурів до кріоконсервації (рис. 7), кращими показниками характеризувалася сперма кнура №1159, для якого показники терморезистентної проби та термостресстійкості становили відповідно 40,0% та 35,0%.

Термостресстійкість сперми кнура №347 знаходилася на рівні 20,0%, що дає підставу зробити висновок про знижену придатність сперматозоїдів цієї тварини для тривалого зберігання шляхом кріоконсервації. Причина такого явища може полягати у генетичних особливостях батька матері, що за даними зоотехнічного обліку, отриманий шляхом «прилиття крові» тварин породи п'єтрен, для яких визначено гірші показники якості спермопродукції, в тому числі стійкості сперматозоїдів до дії наднизьких температур. Очевидно, що селекційні прийоми, спрямовані на зниження показників осаленості туш тварин миргородської породи за рахунок використання плідників породи п'єтрен, супроводжується небажаним зниженням показників фертильності

тварин миргородської породи із різними долями кровності за поліпшувальною породою.

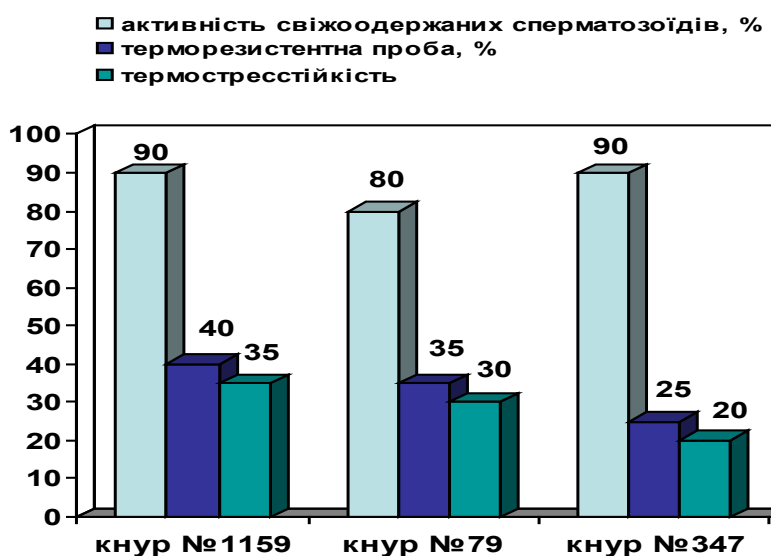


Рис. 7. Показники якості спермопродукції досліджених кнурів на придатність її до заморожування

Наступний етап досліджень передбачав застосування технології кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів з наступною перевіркою їх життєздатності після розморожування. Встановлено, що після центрифугування, розрідження сперматозоїдів кнурів середовищем ЛГЖ та 3-годинної еквілібрації при +4°C їх рухливість знизилась у середньому на 5%. Слід зазначити, що від кожного кнура нами одержано по 250 гранул кріоконсервованих сперматозоїдів.

Розморожені сперматозоїди кнурів миргородської породи проявляли рухливість на рівні 13,33%. За аналізу рухливості після розморожування встановлено, що цей показник знизився в середньому на 83,7 % (рис. 8).

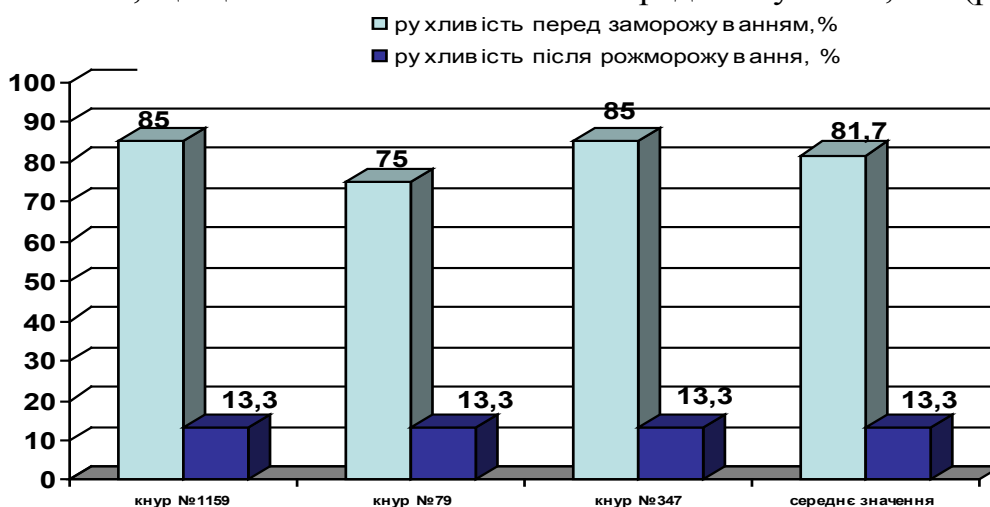


Рис. 8. Оцінка придатності еякульованої сперми кнурів до глибокого заморожування

Нами відмічена індивідуальна особливість якості сперми кнурів миргородської породи, що впливає на її придатність до кріоконсервації. Найбільш придатною до кріоконсервації за показником термостресстійкості була сперма кнурів № 1159 та № 79, яка становила відповідно 35,0% та 30%. Хоча, в цілому, показники придатності сперми кнурів до дії наднизьких температур були невисокими, це давало змогу зберегти отриманий генеративний матеріал тварин зникаючої породи миргородських свиней, що дає можливість проведення із ним подальших біотехнологічних маніпуляцій. За нашими даними, після де-консервації, в середньому, показник рухливості сперматозоїдів знизився на 83,7%.

За результатами аналізу племінних карток, всі кнури дослідів були потомками одного плідника лінії Ловчика 1205, який у попередніх наших дослідженнях характеризувався негативними показниками стійкості сперми до заморожування. Відзначимо, що за результатами застосованих біотехнологічних методів при оцінці свіжоотриманої сперми кнурів, гірша її здатність до заморожування може бути пов'язана із впливом генотипу кнурів породи п'єтрен, що виступали як представники породи-поліпшувача м'ясних якостей, але призвели до зниження показників стійкості сперми до дії наднизьких температур. Таким чином, наразі виникає суттєва проблема застосування існуючих біотехнологічних методів до збереження генеративного матеріалу тварин миргородської породи внаслідок нераціонального використання плідників породи п'єтрен із невизначеним комплексом небажаних спадкових факторів і їх непрогнозованих комбінацій у особин помісного походження, що внаслідок недосконалості існуючої системи племінного обліку визнаються тваринами із статусом племінних. Отже, в комплексних програмах із збереження генофонду малочисельних і зникаючих порід свиней необхідно враховувати можливі ризики негативної коселекції, що поряд із підвищенням м'ясних якостей, може призводити до погіршення імунного статусу, якості м'ясної продукції, зниження фертильності та втрати унікальних генних комплексів адаптивності автохтонних тварин.

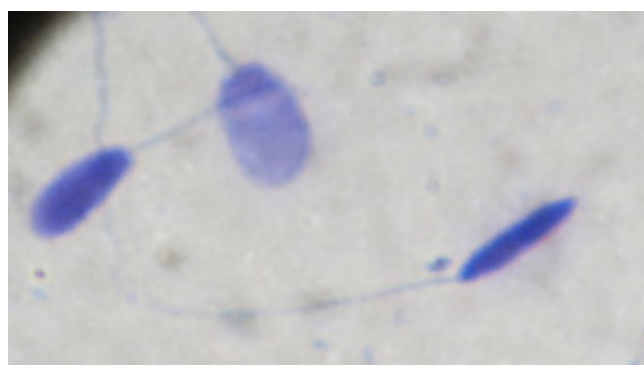
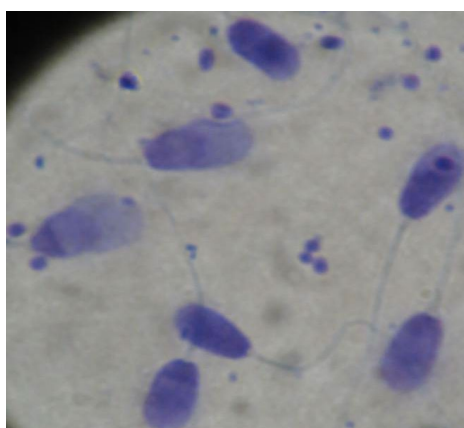
Показано, що фрагментація ДНК тісно корелює з показниками рухливості і, насамперед, із зниженням запліднюючої здатності генеративних клітин. Метод ДНК-комет тест, призначений для визначення фрагментації ДНК у сперматозоїдах тварин, є одним із інформативних методів для оцінки сперми (як нативної так і замороженої) в якості доповнення до стандартної спермограми плідників.

Результати оцінки кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів миргородської породи за використання методу ДНК-комет тесту наведені у таблиці 3.

3. Рівень фрагментації ДНК кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів

Індивідуальний №	Сперматозоїди з великим ореолом	Сперматозоїди з середнім ореолом	Сперматозоїди з малим ореолом	Клітини без ореола	Деградовані сперматозоїди	Клітини з фрагментованою ДНК
1159	95,2±0,1	2,0± 0,3	1,2± 0,4	1,2± 0,3	0,4± 0,2	2,8± 0,3
79	43,3±0,4	50,1± 0,2	2,7± 0,3	–	3,3± 0,4	6,2± 0,1
347	31,0±0,3	54± 0,1	6,4± 0,1	6,6± 0,5	1,4± 0,1	14,4±0,2
Середнє значення	56,5±19,7	35,4±16,7	3,4±1,5	2,6±2,0	1,7±0,8	7,8±0,33,4

За результатами ДНК-комет тесту було встановлена схильність еякульованих сперматозоїдів кнура № 347 до фрагментації ДНК, на що вказує найвищий її рівень (14,4%) проти 2,8% у кнура № 1159. Оскільки головним показником відсутності фрагментації ДНК, згідно використаного ДНК-комет тесту, є наявність сперматозоїдів з великим ореолом, то їх максимальна кількість була характерна саме для кнура № 1159 (95,2%; рис. 9). Слід зазначити, що саме сперма кнура № 1159 виявилась найбільш придатною до кріоконсервації за показником термостресстійкості та терморезистентної проби.



а – сперматозоїди з великим і б – стрілкою зазначений сперматозоїд з середнім ореолом
 і б – стрілкою зазначений сперматозоїд з малим ореолом з наявністю ДНК фрагментації

Рис. 9. Диференціація різних типів клітин за ДНК-комет тестом

Сперматозоїди з наявністю фрагментованої ДНК після відповідної обробки і забарвлення характеризуються наявністю малого ореолу (рис. 5б), а їх максимальна кількість була встановлена у кнура № 347 (6,4%).

Таким чином, підводячи підсумок щодо результатів комплексного застосування лабораторних методів оцінки сперми кнурів на придатність до кріоконсервації, гірша заморожуваність сперми досліджених кнурів миргородської породи може бути пов'язана із впливом генотипу кнурів породи п'єтрен, що виступали в якості породи-поліпшувача м'ясних якостей. Це певним чином відбилося на показниках збалансованості їх каріотипу, що показано нашими попередніми дослідженнями (Стародуб Л. Ф., 2012), проте відмічена різниця між ними і чистопородними тваринами миргородської

породи попередніх генерацій була статистично невірогідною через обмеженість досліджуваної вибірки тварин.

Оскільки в результаті проведеної роботи були отримані результати щодо можливості застосування отриманих зразків еякульованої сперми кнурів миргородської породи до кріоконсервації за використання сучасних комплексних методичних підходів, незважаючи на незначні показники її виживаності після розморожування внаслідок генетичних особливостей кнурів, обраних для досліджень, відмічаємо перспективність проведення подальших досліджень з розробки та оптимізації відповідних методик, створення оптимальних видоспецифічних кріосередовищ для підвищення якісних показників розмороженої сперми кнурів зникаючих порід та доцільність продовження досліджень за цим напрямом. Без сумніву, існуючі селекційні програми роботи з малочисельними породами свиней потребують суттєвого вдосконалення у зв'язку з необхідністю врахування можливих ризиків зниження репродуктивних якостей і систематично підходити до комплексного оцінювання генотипу тварин, що використовуються в якості поліпшувачів та засновників ліній, впроваджувати у практику племінної роботи сучасні методи генетичного прогнозування оптимальної сполучуваності батьківських пар для отримання гетерозисного ефекту потомків на чистопородній основі.

ДОДАТОК

МІНІМАЛЬНІ ВИМОГИ ДО ЯКОСТІ СПЕРМИ КНУРІВ ДЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ (Коваленко В. Ф., 2011)

Параметри	Мінімальні вимоги
Колір	Сіро-білий, білий, жовто-білий
Консистенція	молочна
Запах	специфічний
Об'єм, мл	100
Концентрація сперматозоїдів млн./мл	150–200
Загальна кількість сперматозоїдів, млрд.	15–20
Прямолінійна рухливість, %	75
Терморезистентна проба, %	60
Комплексний бал оцінки сперми, бал	7
Термостресстійкість, %	40
Загальні морфологічні аномалії, %	20

Список використаної літератури

1. Pursel, V. G. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure / V. G. Pursel, L. A. Johnson // *Journal of Animal Science*. – 1975. – Vol. 40. – № 1. – P. 99–102.
2. Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws / C. O. Bwanga, M. M. Braganca, S. Einarsson et al. // *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A*. – 1990. – Vol. 37. – № 9. – P. 651–658.
3. Bwanga, C. O. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review / C. O. Bwanga // *Acta Veterinaria Scandinavica*. – 1991. – Vol. 32. – № 4. – P. 431–53.
4. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation / J. A. Gilmore, J. Liu, A. T. Peter et al. // *Biology of Reproduction*. – 1998. – Vol. 58. – № 1. – P. 28–36.
5. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars / Y. Agca, J. Gilmore, M. Byers et al. // *Biology of Reproduction*. – 2002. – Vol. 67. – № 5. – P. 1493–1501.
6. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa / H. D. Guthrie, J. Liu, J. K. Critser et al. // *Biology of Reproduction*. – 2002. – Vol. 67. – № 6. – P. 1811–1816.
7. Osmotic tolerance of mouse spermatozoa from various genetic backgrounds: Acrosome integrity, membrane integrity, and maintenance of motility / E. Walters, H. Men, Y. Agca et al. // *Cryobiology*. – 2005. – Vol. 50. – P. 193–205.
8. Verheyen, G. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm / G. Verheyen, I. Pletincx, A. Van Steirteghem // *Human Reproduction*. – 1993. – Vol. 8. – № 10. – P. 1678–1684.
9. Thachil, J. V. Preservation techniques for human semen / J. V. Thachil, M. A. Jewett // *Fertility and Sterility*. – 1981. – Vol. 35. – № 5. – P. 546–548.
10. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm / K. E. Waterhouse, P. O. Hofmo, A. Tverdal, R. R. Jr. Miller // *Reproduction*. – 2006. – Vol. 131. – № 5. – P. 887–894.
11. Storage of boar semen / L. A. Johnson, K. F. Weitze, P. Fiser, W. M. C. Maxwell // *Animal Reproduction Science*. – 2000. – Vol. 62. – P. 142–172.
12. Intra-uterine artificial insemination with frozen-thawed boar semen in sows in Thailand / K. Buranaamnuay, T. Wongtawan, K. Kaeoket et al. // *Proc. 19th IPVS, (Copenhagen, Denmark. 16-19 July 2006) Copenhagen, 2006*. – P. 16–19.
13. Griveau, J. F. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function / J. F. Griveau, Le D. Lannou // *International Journal Andrology*. – 1997. – Vol. 20. – № 4. – P. 195–200.
14. Bamba, K. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution / K. Bamba, D. G. Cran // *Journal Reproduction and Fertility*. – 1992. – Vol. 95. – № 1. – P. 69–77.

15. Funahashi, H. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C / H. Funahashi, T Sano // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 63. – № 6. – P. 1605–1616.
16. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation / J. Gadea, D. Gumbao, C. Matás, R. Romar // *Journal Andrology*. – 2005. – Vol. 26. – № 6. – P. 749–756.
17. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability / M. Hernández, J. Roca, M. A. Gil et al. // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 67. – № 9. – P. 1436–1445.
18. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen / E. Breininger, N. B. Beorlegui, C. M. O'Flaherty, M. T. Beconi // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 63. – P. 2126–2135.
19. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate / F. J. Pena, A. Johannisson, M. Wallgren, H. Rodriguez Martinez // *Animal Reproduction Science*. – 2003. – Vol. 78. – P. 85–98.
20. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene / J. Roca, M. A. Gil, M. Hernandez et al. // *Journal Andrology*. – 2004. – Vol. 25. – P. 397–405.
21. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase / J. Roca, J. M. Rodriguez, M. A. Gil et al. // *Journal Andrology*. – 2005. – Vol. 26. – P. 15–24.
22. Holt, W. V. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality / W. V. Holt, K. J. W. Van Look // *Journal Reproduction*. – 2005. – Vol. 127. – P. 527–535.
23. Rusu, A. V. New model of boar semen evaluation and the impact of cryogenic factor on spermatid cells / A. V. Rusu, V. Miclea, M. A. Zahan // *J. Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*. – 2009. – Vol. 42. – № 1. – P. 85–91.
24. Hernandez, M. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars / M. Hernández, H. Ekwall, J. Roca et al. // *Cryobiology*. – 2007. – Vol. 54.(1). – P. 63–70.
25. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics / R. S. Jeyendran, H. H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. G. Crabo, L. J. Zaneveld // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1984. – Vol. 70. – P. 219–228.
26. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes / A. M. Hossain, B. Rizk, S. Barik et al. // *Human Reproduction*. – 1998. – Vol. 13. – № 6. – P. 1578–1583.
27. Інструкція із штучного осіменіння свиней / Відповідальний за вип. Ю.Ф. Мельник. – Київ : Аграрна наука, 2003. – 56 с.

28. Пат. 52538 Україна МПК А61D 19/00. Спосіб прогнозування термостресстійкості сперміїв кнура / Коваленко В.Ф., Ільченко М.О., Базалевич А.В., Титаренко О.О., Квасницький О.В., Біндюг О.А., Артюх В.Г., Зінов'єв С.Г., Мартиненко Н.А.; заявник і патентовласник Інститут свинарства УААН.– № у 201003336 ; подано 22.03.2010 ; опубл. 25.08.2010, Бюл. № 16.

29. Коваленко, В. Ф. Використання у тваринництві низьких температур для селекції статевих клітин / В. Ф. Коваленко, А. В. Базалевич // Біотехнологічні, селекційні та організаційні методи відтворення, зберігання і використання генофонду тварин : зб. наук. пр. – Київ, 1997. – С. 74–75.

30. Нарижный, А.Г. Влияние способов обработки спермы перед замораживанием на показатели заморожено-оттаянной спермы / А. Г. Нарижный, Н. И. Крейндылина // Зоотехния. – 2007. – № 7. – С. 31–32.

31. Моніторинг цитогенетичних показників різних порід свиней / Л. Ф. Стародуб, С. О. Костенко, П. П. Джус та ін. // Вісник Сумського національного аграрного університету. Сер. Тваринництво. – 2012. – Вип.12. – С. 60–64.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

Ковтун Світлана Іванівна
Щербак Оксана Василівна
Метлицька Олена Іванівна
Стародуб Любов Феофілівна

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ З ОЦІНКИ ЯКОСТІ ПРИЗНАЧЕНОЇ ДО КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМОПРОДУКЦІЇ ТА СТРУКТУРНОЇ ЦІЛІСНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ

За редакцією доктора сільськогосподарських наук, професора,
академіка НААН С. І. Ковтун

Комп'ютерна верстка та макетування П. А. Троцький

Підписано до друку 29.01.2018 р.
Формат 60 × 84 1/16
Ум. друк. арк. 1,6
Наклад 100 прим.

ДЛЯ НОТАТОК