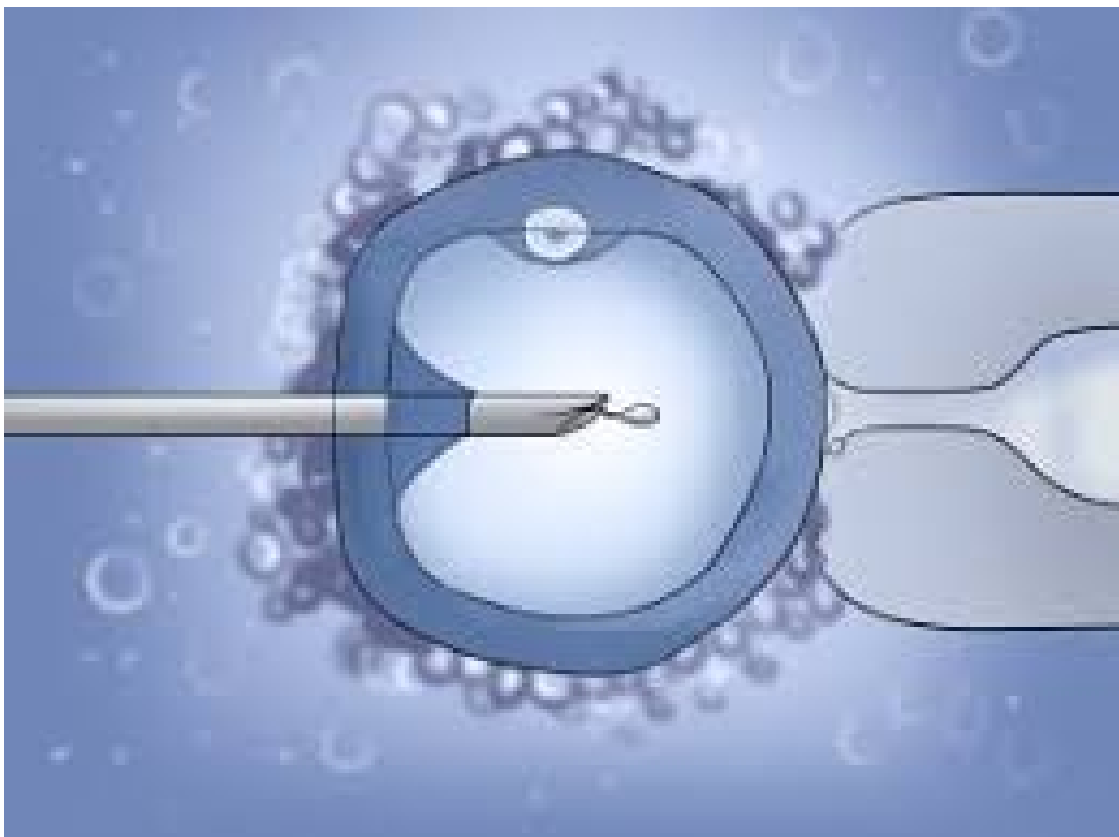


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ**

ОПТИМІЗАЦІЯ ПІДГОТОВКИ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ШТУЧНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ



Чубинське, 2022

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

**ОПТИМІЗАЦІЯ ПІДГОТОВКИ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ
СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ШТУЧНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

Чубинське, 2022

Методичні рекомендації розробили:

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

Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (протокол № 1 від 31.01.2022 року).

Оптимізація підготовки кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів
О 60 до штучного запліднення : методичні рекомендації / О. В. Щербак,
О. Ю. Лизогуб, С. І. Ковтун, П. А. Троцький. Чубинське, 2022. 24 с.

У рекомендаціях узагальнено методичні підходи щодо використання методу ICSI для отримання ембріонів сільськогосподарських тварин *in vitro*. Представлено узагальнені результати використання методу ICSI за різних його модифікацій на можливість застосування таких підходів для одержання ембріонів в умовах *in vitro*. Встановлено, що для раціонального використання племінних (генетичних) ресурсів у свинарстві необхідно розробляти та удосконалювати біотехнологічні методи відтворення з метою подальшого впровадження їх в практику.

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

Рецензенти:

Копилова Катерина Вячеславівна – доктор с.-г. наук, головний науковий співробітник відділу генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

Братиця Христина Тарасівна – доктор філософії за спеціальністю 091 Біологія, старший науковий співробітник відділу генетики та біотехнології тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

ЗМІСТ

	Стор
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
1 СТАН ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ ПОРІД СВИНЕЙ ТА ШЛЯХИ ЙОГО ВИРІШЕННЯ	6
2. ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ICSI ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЕМБРІОНІВ <i>IN VITRO</i>	8
3. ВПЛИВ СЕРЕДОВИЩ З ПВП ТА ПВА НА ДЕКОНСЕРВОВАНІ ЕЯКУЛЬОВАНІ СПЕРМАТОЗОЇДИ КНУРА ТА ЇХ ПІДГОТОВКИ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ	11
ВИСНОВКИ	19
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	20

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ПВА	полівінілалкоголь
ПВП	полівінілпіролідон
FAO	Продовольча та сільськогосподарська організація ООН
HSA	human serum albumin – сировотковий альбумін людини
ICSI	intracytoplasmic sperm injection – інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда в ооцит
<i>in vitro</i>	характеристика певного біологічного процесу, змодельованого поза організмом
<i>in vivo</i>	характеристика певного біологічного процесу, який відбувається в організмі
IVF	<i>in vitro</i> fertilization – запліднення <i>in vitro</i>

ВСТУП

Одержання ембріонів свиней *in vitro* – важливий метод для збереження різноманіття даного виду тварин. Крім того, свині є важливою експериментальною моделлю через їх біологічну схожість з людиною та можуть бути потенційними донорами органів для ксенотрансплантацій. Тому надзвичайно важливо оптимізувати процеси запліднення ооцитів свиней IVF (*in vitro* fertilization) та отримання максимально високого рівня формування та розвитку ембріонів. Для одержання ембріонів свиней за використання кріоконсервованих сперматозоїдів обмеженої кількості, застосування методу *in vitro* є малоефективним. Методика ICSI (intracytoplasmic sperm injection) наразі є унікальною завдяки якій можна отримати ембріон, використовуючи один ооцит та один сперматозоїд.

Одним з ключових етапів ICSI є знерухомлення (імобілізація) сперматозоїдів, який проводять з використанням розчину ПВП (полівінілпіролідон). Незважаючи на його широке використання, цей розчин має негативний вплив на розвиток ооцитів та непридатний для імобілізації сперматозоїдів кнурів. Розчин ПВА (полівінілалкоголь) має схожі характеристики в'язкості, але використовується у невеликих концентраціях як безпечний агент для культивування ембріонів і є альтернативою ПВП для використання під час ICSI. Основні аспекти процедури ICSI включають імобілізацію сперматозоїда шляхом пошкодження джгутика, аспірація його в ін'єкційну піпетку, аспірація цитоплазми та безпосередньо ін'єкція сперматозоїда в ооцит. Головною перевагою ICSI є використання сперми зі зниженою концентрацією або рухливістю сперматозоїдів, сексованої чи кріоконсервованої або у разі використання із придатків сім'яників (епідидиміс). У свиней IVF призводить до поліспермного запліднення понад 50% яйцеклітин, що істотно знижує ефективність отримання ембріонів *in vitro*. Тому є гостра необхідність щодо застосування даного методу в тому числі і для усунення поліспермії. Ін'єкція сперматозоїдів в цитоплазму яйцеклітин ICSI є методом допоміжного розмноження, який використовується для отримання ембріонів *in vitro* у тварин і лікування безпліддя у людей. Застосовується для реалізації програм збереження біорізноманіття, розуміння механізмів і процесів запліднення та вивчення раннього ембріонального розвитку.

1. СТАН ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ ПОРІД СВИНЕЙ ТА ШЛЯХИ ЙОГО ВИРІШЕННЯ

Згідно з даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO) щодо видового різноманіття одомашнених тварин з початку минулого століття в Європі серед локальних порід сільськогосподарських тварин зникли майже 11%, а під загрозою зникнення знаходиться понад 40%.

Якщо розглядати ситуацію щодо зникнення порід свиней, то наразі вона не є оптимістичною. Станом на 2020 рік серед регіональних порід свиней в Європі та Кавказі зниклими вважаються 21% порід, в небезпеці 32%, і лише 7% з них – не в зоні ризику (рис. 1). В Україні на межі зникнення перебувають одночасно кілька порід свиней: українська степова ряба, мангалиця, українська степова біла та локальна дніпропетровська популяція української м'ясної. Такі дані в цілому та в Україні, зокрема свідчать про недостатні зусилля, які залучені до збереження генофонду або ж неефективність методів, які застосовуються наразі.

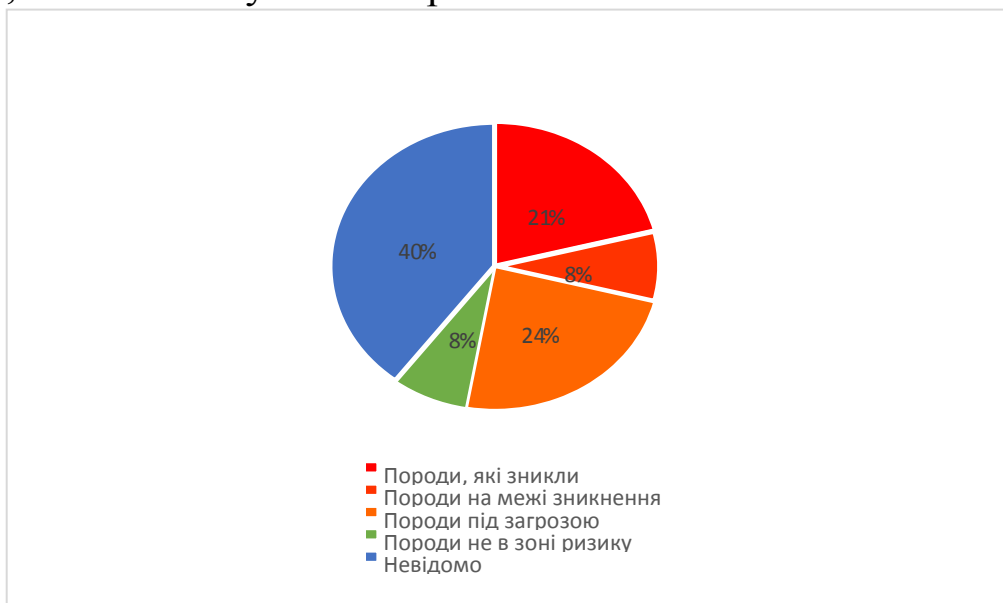


Рис. 1. Стан порід свиней в Європі та Кавказі у 2020 році.

До того ж пандемія коронавірусу Covid-19, яка розпочалася в 2019 році показала, що країни не готові до боротьби з новими вірусами, які можуть вражати як тварин, так і людей. Підтвердженням цьому є зникнення в 2018 році двох вітчизняних порід свиней: миргородської та великої чорної, внаслідок спалаху африканської чуми свиней. Тому зберігання автохтонних порід,

у вигляді невеликих популяцій є вкрай ризикованим способом збереження різноманіття. Такі підходи є ризикованими і через те, що в невеликих популяціях явище інбридингу може спричиняти дрейф генів, і як наслідок може призводити до накопичення небажаних мутацій.

Рішенням цієї проблеми може стати кріоконсервація генетичного матеріалу у вигляді сперми, ооцитів та ембріонів сільськогосподарських тварин та зберігання його у кріосховищах упродовж необмеженого часу. Зважаючи на те, що після кріоконсервації виживає невеликий відсоток ооцитів і сперматозоїдів ми маємо обмежену кількість вихідного матеріалу і тому існує нагальна потреба максимально оптимізувати процес отримання ембріонів для раціонального використання цінного генетичного матеріалу. Побічною проблемою є те, що активність кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів не завжди забезпечують високу частоту запліднення та формування якісних ембріонів на доімплантаційних стадіях у разі застосуванні методу запліднення *in vitro*. Однією з найголовніших проблем даного методу також є і неможливість контролювати явище поліспермії під час запліднення ооцита та низьку здатність до розвитку отриманих зигот. Це призводить до того, що у разі недосконалого методу дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів запліднення буде низьким і встановити причину даного явища буде вкрай важко.

Однак, у свинарстві є загроза зникнення порід через періодичні спалахи інфекційних захворювань. Науковці постійно приділяють увагу питанням збереження генофонду цього виду тварин, але підходи до кріоконсервації гамет та ембріонів все ще не забезпечують стабільних та високих результатів. Деякі біотехнологічні маніпуляції мали лише інформативний характер хоча для практичних підходів до збереження генофонду вкрай необхідні.

Дослідження із запліднення *in vitro* на розморожених незрілих ооцитах свиней, які перебували на стадії зародкового пухирця показали низький рівень формування бластоцист – 5,2% (Casillas F. et al. 2018). Встановлено, що вітрифіковані ооцити, заплідненні *in vitro* мали вищий рівень формування бластоцист, ніж ооцити тієї ж групи запліднені методом ICSI (Catt J. W. et al., 1995; Hewitson L., et al., 2000; García-Mengual E. et al., 2011). Автори це явище пояснюють

недостатністю фізіологічної складової в процесі ICSI. Сперматозоїди можуть пропускати необхідні етапи природнього запліднення, такі як впізнавання ооцита і сперматозоїда та акросомальна реакція.

Результати щодо застосування ICSI у свиней наразі мають суперечливі дані. Так в роботах Yong H.Y. et al. (2003) та Li X.X. et al. (2013) після запліднення методом IVF отримано роздроблених ембріонів на другу добу розвитку на рівні 53,2 та 88,2%, відповідно, а після запліднення методом ICSI результативність була нижчою в обох випадках, відповідно 48,7 та 85,1%. Різниця між методами ICSI та IVF спостерігалася під час культивування ембріонів від третьої до п'ятої доби розвитку, що є додатковим методом селекції для визначення найбільш життєздатних ембріонів. Відсоток сформованих бластоцист після запліднення *in vitro* за допомогою ICSI був майже в два рази нижчим (10,5 та 20,2%, відповідно), порівняно з результатами сформованих бластоцист після IVF (19,4 та 35,2%, відповідно). В дослідженнях Wu J. et al. (2001), за допомогою ICSI було отримано більше ембріонів (51,0%), ніж за допомогою IVF (45,0%). Кількість отриманих бластоцист була вищою під час запліднення методом ICSI (21,0%), ніж під час IVF (16,0%). За результатами досліджень Mandryk I. (2013) встановлено, що запліднення методом ICSI не є оптимізованою методикою, а результативність у разі її використання може коливатися від 37,5 до 53,3% отриманих ембріонів. Кількість отриманих бластоцист може збільшуватись (або зменшуватись) на 15,8% в разі застосування одного і того ж методу запліднення, а саме ICSI. Але існують випадки, коли запліднення методом ICSI – є необхідним, через обмежену кількість гамет. Зниження результатів під час такого методу запліднення пов'язують з рядом факторів серед яких використання сполуки полівінілпіролідону для знерухомлення сперматозоїдів.

2. ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ICSI ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЕМБРІОНІВ *IN VITRO*

Метод ICSI – це запліднення ооцитів *in vitro* під час якого відбувається ін'єкція одного сперматозоїда в зрілий ооцит на стадії метафази II мейозу. ICSI включає іммобілізацію сперматозоїда шляхом пошкодження хвоста, аспірацію цитоплазми ооцита ін'єкційною піпеткою та випускання одного сперматозоїда в цито-

плазму. Порушення цитоплазми ооцита та сперматозоїда є важливим етапом для успішного запліднення, оскільки пошкодження ооцита це необхідний крок для злиття двох гамет, а пошкодження хвоста сперматозоїда важливе для вивільнення розчинних факторів сперми, які мають індукувати активацію ооцитів. Наразі він добре відпрацьований на ооцитах жінок, але для ооцитів інших видів ссавців залишається недостатньо оптимізованим для досягнення відповідного рівня запліднення та формування ембріонів. Наразі в нашій країні дуже мало даних щодо застосування методу ICSI для *in vitro* запліднення тварин, в тому числі свиней, хоча цей метод підвищить ефективність запліднення та формування повноцінних ембріонів.

Проведення ICSI забезпечує вирішення складного питання поліспермії під час запліднення *in vitro*. Цей метод забезпечує використання мінімальної кількості вихідного матеріалу для отримання максимальної кількості ембріонів та надає можливість застосування в тому числі і сперматозоїдів з недостатньою рухливістю. Оскільки цей метод для одержання ембріонів свиней *in vitro* є багатоступеневим, необхідно отримати дозрілі *in vitro* ооцити, освоїти процедуру відбору сперматозоїда в ін'єкційну піпетку, проведення процедури ICSI та культивування ембріонів. Нами відпрацьовано всі етапи, хоча етап культивування ембріонів після ICSI потребує удосконалення. Так ооцити свиней, які нами культивовані *in vitro* до стадії метафази II мейозу і мали ідентифіковане перше полярне тіло були успішно ін'єктовані з внесенням одного сперматозоїда в цитоплазму ооцита (рис. 2).

Незважаючи на переваги методу ICSI та перспективність його застосування для підвищення ефективності запліднення існує ряд проблем з використанням його для гамет тварин, порівняно з гаметами людини. Насамперед, під час запліднення ооцитів великої рогатої худоби та свиней, спостерігається значно менша кількість отриманих ембріонів. На думку науковців на це можуть впливати декілька факторів, серед яких використанням ін'єкційної піпетки меншого діаметру для сперматозоїдів людини (так вони менші за гамети тварин, і, відповідно відбувається менша травматизація ооцита), відсутністю процедури центрифугування ооцитів перед ICSI, яке потрібно для деяких видів тварин та коротшим джгутиком

сперматозоїда, що забезпечує потрапляння меншої кількості чужорідної рідини в цитоплазму.

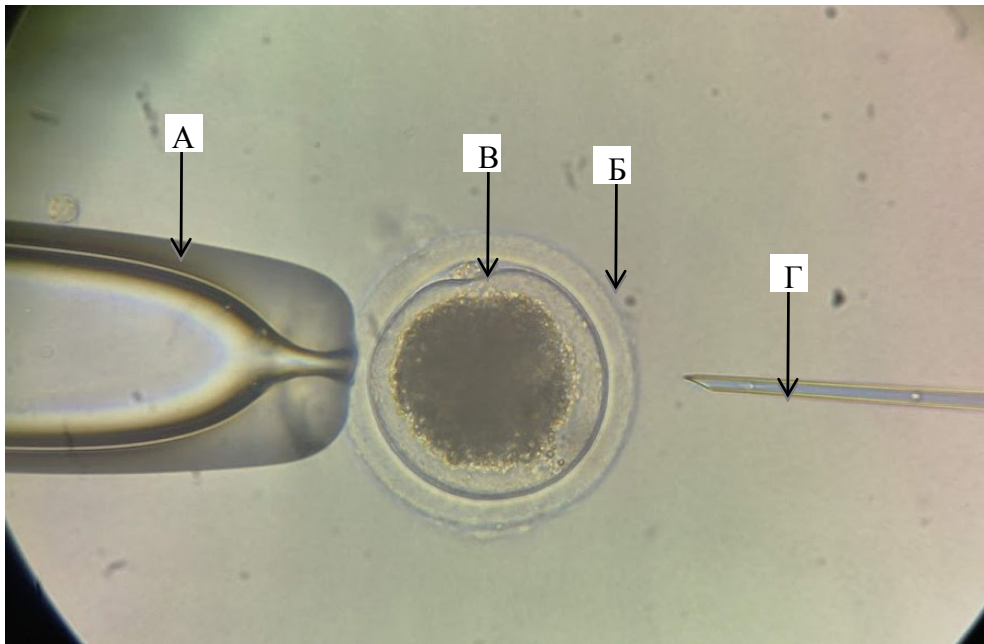


Рис. 2. Запліднення *in vitro* ооциту свині методом ICSI.

А – утримуюча піпетка; Б – ооцит свині; В – полярне тільце; Г – сперматозоїд.
Об.10х, ок.40х.

Іншим модифікованим методом ICSI є метод пошкодження головки. Під час природного процесу запліднення цитоплазма з'єднується з постакросомальною ділянкою плазматичної мембрани головки сперми. Тому для кращої результативності запліднення запропоновано пошкоджувати не джгутик, а головку сперматозоїда. Більшість існуючих методик запліднення ICSI поєднують у собі різноманітні техніки пошкодження хвоста сперматозоїда, але в 2003 році було проведено дослідження згідно з яким відбувалося пошкодження головки сперматозоїда перед поміщенням його в ооцит. Крім того, в дослідженні Yong H. Y. et al. (2003) було використано ПВА, замість ПВП. Припускають, що уникнення шкідливого ефекту від ПВП покращить розвиток запліднених ооцитів. До того ж, у разі використання ПВА мінеральна олія в процесі проведення процедури менше налипає на піпетку, так само як і клітинні рештки. Це значно покращує процес засмоктування цитоплазми та випускання сперматозоїда, і є більш безпечно, що в свою чергу знижує кількість дегенерованих ооцитів. У разі застосування такого методу утворення

бластоцист підвищувалось на 6%, порівняно з контрольною групою, де ооцити були запліднені традиційним методом ICSI.

Тривалий час існувала думка, що пошкодження головки сперматозоїда призводить до пошкодження генетичного матеріалу. Це в свою чергу призводить до відсутності запліднення чи формування аномальних ембріонів. Тому серед вимог до проведення ICSI основним було перебивання хвостика та уникнення ділянки головки та шийки сперматозоїда. Але Yong H. Y. et al. (2003) довели, що дисульфідні мости головки сперматозоїда, які формуються проходячи через епідидиміс роблять ядро сперматозоїда стійким до хімічних та фізичних розривів.

Deng T. et al. (2020) оприлюднили результати досліджень щодо обробки ооцитів під час процедури ICSI урходезоксихолевою кислотою та довели, що такий підхід збільшує кількість отриманих зигот. Цей феномен вони пояснюють здатністю даної речовини зменшувати оксидативний стрес, який спричиняється під час цієї процедури в ендоплазматичному ретикулумі та попереджувати процеси апоптозу.

Незважаючи на всі вищеназвані проблеми згідно з опублікованими даними Американської асоціації трансплантації ембріонів, за 2020 рік у Сполучених штатах Америки із усіх трансплантованих ембріонів різних видів тварин до 50% були заплідненими методом ICSI (AETA, 2021). З цього можемо зробити висновок, що хоча проблема запліднення методом ICSI залишається невирішеною, цей метод є достатньо перспективним біотехнологічним методом для застосування його у тваринництві. Зважаючи, на швидке зникнення порід свиней даний метод буде доцільним для опанування та застосування його для відтворення генофонду цінних порід свиней.

3. ВПЛИВ СЕРЕДОВИЩ З ПВП ТА ПВА НА ДЕОНСЕРВОВАНІ ЕЯКУЛЬОВАНІ СПЕРМАТОЗОЇДИ КНУРА ТА ЇХ ПІДГОТОВКИ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ

Проведення ICSI потребує використання розчину ПВП для сповільнення швидкості руху сперматозоїдів. Ця молекула може бути шкідливою під час введення її в ооцит і негативно впливати на запліднення та деконденсацію ДНК сперматозоїдів. Нами відпрацьовано успішно процедуру відбору сперматозоїда кнура в

ін'єкційну піпетку після сповільнення його руху розчину полівінілпіролідону (рис. 3).

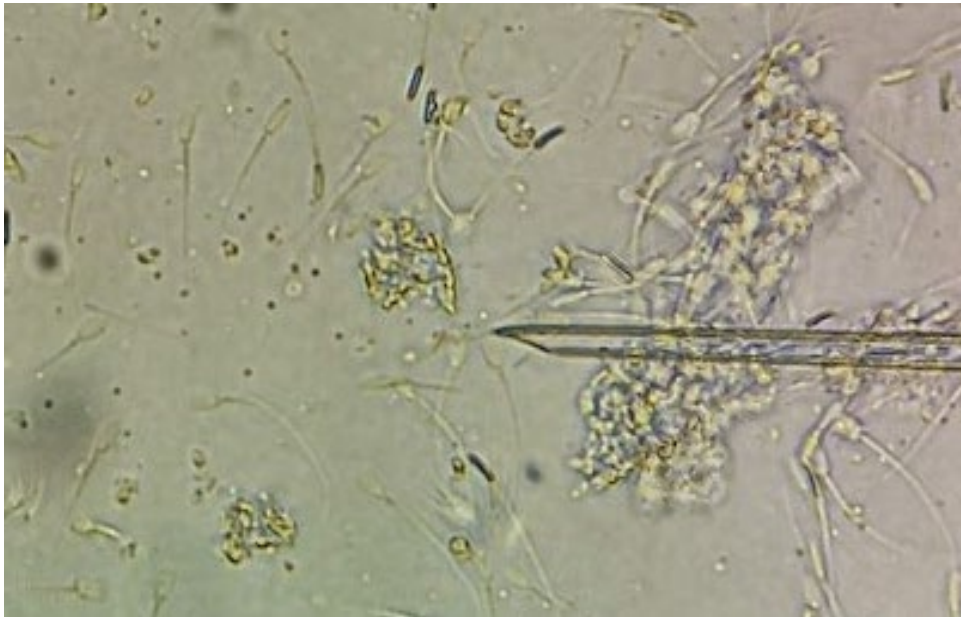


Рис. 3. Сперматозоїди кнурів в розчині полівінілпіролідону та ін'єкційна піпетка. Об.10х, ок.40х.

Для проведення знерухомлення сперматозоїдів використовують 10% розчин ПВП. Застосування ПВП також попереджує налипання сперматозоїдів та клітинного дебрису на піпетку, що полегшує проведення процедури. Однією з можливостей покращити метод ICSI є модифікований метод ін'єкції сперматозоїда з використанням ПВА замість ПВП.

На відміну від шкоди ПВП для гамет сполука ПВА не спричинює негативні ефекти на ооцити і Yong H.Y. et al (2003) показали, що доволі успішно дана сполука використовується в невеликих концентраціях в культуральних середовищах навіть для тривалого культивування ембріонів свиней.

Використання ПВП для проведення процедури ICSI полягає в тому, що це найбільш густий та в'язкий розчин для даних цілей. Під час використання такого розчину сперматозоїди сповільнюються достатньо для того, щоб їх можна було оцінити, вибрати найбільш морфологічно правильний та знерухомити. Сперматозоїди кнурів відрізняються від сперматозоїдів інших видів розмірами, характерним прямолінійним рухом (рис. 4) та досить невисокою швидкістю. Для

проведення процедури ICSI у свиней не потрібно значно сповільнювати рух тому, що зловити сперматозоїд не настільки проблематично. Тому знерухомлення сперматозоїдів кнурів в розчині ПВА є більш простим та легким, ніж в разі застосування його для інших видів тварин і є абсолютно прийнятним для застосування під час запліднення методом ICSI різних порід свиней.

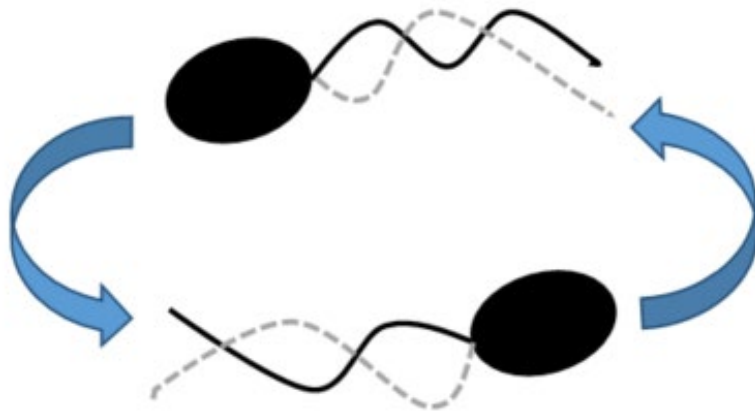


Рис. 4. Траєкторія руху сперматозоїдів кнурів

Ще одним важливим аспектом під час підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення є здатність розчину попереджувати налипання дебрису та нерухомих сперматозоїдів всередині та зовні піпетки. Слід зазначити, що найважливішим моментом є відсутність залипання сперматозоїду всередині ін'єкційної піпетки, що утруднює саму ін'єкцію, а це призведе до дегенерації ооцита. ПВП запобігає виникненню таких випадків, розчин ПВА теж має володіти такими властивостями, щоб процедура була атравматичною для ооцитів.

Середовище з додаванням ПВА може тримати стінку та порожнину ін'єкційної піпетки менш липкою упродовж довшого проміжку часу, ніж під час проведення іммобілізації сперматозоїдів без даного розчину. В результаті цього можливо досягти ефекту такого, що спостерігається в разі використання ПВП (меншого налипання мінеральної олії та шматків клітин до піпетки), але в той же час не шкодити гаметам. Тому метою роботи було вивчити вплив

середовищ з ПВП та ПВА на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура та їх підготовки до штучного запліднення.

В дослідженнях нами використано еякульовані кріоконсервовані сперматозоїди кнура миргородської породи Дніпро 641. Генетичний матеріал зберігався в Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ ім. М.В.Зубця НААН упродовж восьми років. Суспензію сперматозоїдів розморожували на водяній бані за температури $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв до повного розморожування. Відокремлення сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили за допомогою методу "swim-up" у середовищі Sp.-TALP. Для цього розташовували пробірку з 2 мл теплого середовища під кутом 45° . На дно пробірки підшаровували 0,2 мл розмороженої суспензії сперматозоїдів та на 15 хв. залишали в термостаті за температури 37°C . Після інкубації отриману суспензію сперматозоїдів розріджували середовищем Sp.-TALP до концентрації $1-5 \times 10^7$ сперматозоїдів в 1 мл.

Для тестування 10,0% розчинів ПВП (Origio, Denmark) та ПВА (Sigma, P8136, USA) підготовлювали чашку Петрі ($d=35$ мм) з двома доріжками цих середовищ та покривали мінеральною олією LiteOil (GlobalLife, USA) (рис. 5). Чашку Петрі з розчинами попередньо розміщували в термостаті за температури $+37^{\circ}\text{C}$ впродовж 60 хв. Для оцінки рухливості сперматозоїдів вносили 10 мкл відмитої суспензії сперматозоїдів в 10,0% розчини ПВП та ПВА. Після чого оцінювали рухливість в 10 полях зору збільшення в 400 разів.

Для дослідження швидкості руху сперматозоїдів використовували ін'єкційну піпетку діаметром 5,0 мкм (Cook, США). Експеримент проводили в трьох повторях.

Для успішного проведення процедури ICSI рухомий сперматозоїд механічно знерухоплюється, за допомогою маніпуляцій з хвостом сперматозоїда різними способами: ударами ін'єкційної піпетки, енергійним поглинанням, кількома п'єзоімпульсами або повторюваною аспірацією в ін'єкційну піпетку та з неї. Для цього в більшості ембріологічних лабораторій використовується хімічний агент, ПВП, а саме для уповільнення руху сперматозоїда та для полегшення пошкодження хвостика, незважаючи на переконливі дані щодо його шкідливого впливу на виживання та розвиток ооцитів після процедури ICSI.



Рис. 5. Чашка Петрі з доріжками 10,0% розчинів ПВП та ПВА

Перший етап досліджень передбачав оцінку можливості застосування 10,0% розчинів ПВП та ПВА в разі проведення запліднення методом ICSI, ми досліджували рухливість сперматозоїдів через 10 та 20 хв після розміщення їх в досліджувані розчини. Це той проміжок часу, який необхідний для проведення запліднення 10 ооцитів в одній чашці для зниження часової паузи перебування гамет поза інкубатором. Для запліднення більшої кількості ооцитів використовуються додаткові чашки та відповідно суспензія сперматозоїдів розміщується заново в нові чашки з чистими розчинами ПВП чи ПВА. Також було протестовано зручність проведення процедури для оператора, а саме відсутність залипання в піпетці клітин та дебрису, що є важливим елементом під час процедури ICSI.

Встановлено, що після розморожування рухливість сперматозоїдів кнура становила 10,7%. Після перебування сперматозоїдів в 10,0% розчині ПВП впродовж 10 хв рухливість знизилась на 68,2% і становила 3,4%, а через наступні 10 хв інкубації знизилася до 1,4%, що в 10 раз нижче, порівняно із початковою рухливістю. В 10,0%-му р-ні ПВА рухливість через 10 хв інкубації знизилась на 37,4% і становила 6,7%, а ще через 10 хв знизилась до 5,7% що в 1,8 разів нижче, порівняно із початковою рухливістю (табл. 1).

1. Вплив 10,0% розчинів ПВП та ПВА на рухливість деконсервованих сперматозоїдів кнурів

Показники	Рухливість сперматозоїдів		
	відразу після впорскування (%)	через 10 хв (%)	через 20 хв (%)
10,0% ПВП	10,7 ± 1,71	3,4 ± 0,86*	1,4 ± 1,3**
10,0% ПВА	10,7 ± 0,86	6,7 ± 1,71*	5,7 ± 0,65**

Примітка: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ порівняно із початковою рухливістю.

В разі застосування 10,0% розчину ПВП для кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів ми спостерігали швидку втрату рухливості сперматозоїдів, на 68,2% від початкової рухливості. Такий результат може бути, через те, що 10,0% розчин ПВП є достатньо в'язкий, а сперматозоїди кнурів через особливості свого руху, особливо після кріоконсервації, недостатньо добре можуть рухатися в настільки в'язкому середовищі. Так як сперматозоїди кнурів мають низьку кріорезистентність, така втрата рухливості призведе до суттєвого зниження результатів запліднення *in vitro*, тому даний розчин не підходить для використання у репродукції свиней.

Альтернативою є застосування розчину ПВА для підготовки сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення. Розчин ПВА забезпечив повільне знеруховлення сперматозоїдів кнурів, порівняно із розчином ПВП на 3,3% через 10 хв культивування та на 4,3% після 20 хв культивування. Так в 10,0% розчині ПВП за 10 хв інкубації рухливість сперматозоїдів кнурів знизилась до 3,4 %, а в 10,0% розчині ПВА до 6,7%, що на 3,3% вище, порівняно із показником рухливості в 10,0% розчині ПВП.

Через 20 хв інкубації результати були ще більш разючими під час культивування в 10,0% розчині ПВП рухливість знижувалася до 1,4%, в той самий проміжок часу рухливість сперматозоїдів в 10,0% розчині ПВА становила 5,7%.

В'язкість розчинів ПВА та ПВП однакової концентрації є схожою, 20,0% розчин ПВП за +25°C має в'язкість 0,084 Па/с, а 20,0% розчин ПВА має в'язкість 1,836 Па/с за тієї ж температури. В'язкість – це ключова характеристика, яка необхідна для сповільнення

сперматозоїдів, тому під час досліджень з отримання ембріонів свиней методом ICSI ми протестували розчин ПВА, в такій же концентрації як і наявний комерційний розчин ПВП, тобто 10,0% розчин.

Другим етапом досліджень було оцінити вплив різних концентрацій розчину ПВА на рухливість сперматозоїдів кнура (табл. 2). В дослідженнях було використано чотири концентрації: 0,1; 1,0; 5,0 та 10,0% розчини ПВА.

2. Вплив різних концентрацій ПВА на рухливість деконсервованих сперматозоїдів кнура

Показники	Рухливість сперматозоїдів		
	після впорскування (%)	через 10 хв (%)	через 20 хв (%)
10,0%	10,7 ± 0,86	6,7 ± 0,86*	5,7 ± 0,86*
5,0%	10,7 ± 0,86	8,4 ± 0,65**	7,7 ± 0,86*
1,0%	10,7 ± 0,86	9,4 ± 1,71*	9,4 ± 0,65**
0,1%	10,7 ± 0,86	10,7 ± 0,86*	9,7 ± 0,65**

Примітка: * – P<0,05; ** – P<0,01.

Для приготування розчинів ПВА використовували ПВА (Sigma), середовище Multipurpose Handling Medium-Complete (Irvine), це Hepes та MOPS-вмісне середовище, з додаванням білку (HSA – human serum albumin, Irvine) – 5%, та з гентаміцином.

Для 10% розчину ПВА – брали наважку 1 г ПВА та 9 мл приготованого середовища.

Для 5% розчину ПВА – брали наважку 0,5 г ПВА та 9,5 мл приготованого середовища.

Для 1% розчину ПВА – брали наважку 0,1 г ПВА та 9,9 мл приготованого середовища.

Для 0,1% розчину ПВА – брали наважку 0,01 г ПВА та 9,99 мл приготованого середовища.

Через 10 хв інкубації найнижчу рухливість сперматозоїдів спостерігали в 10,0% розчині ПВА і вона становила – 6,7%, що на 1,7 та 2,7% нижче, порівняно із 5,0% та 1,0% розчинами ПВА, відповідно. Слід відмітити, що рухливість сперматозоїдів в 0,1% розчині ПВА

через 10 хв інкубації не змінилась і залишилась на рівні 10,7%. Високі показники життєздатності сперматозоїдів кнурів були зафіксовані у 0,1% розчині ПВА. Так, через 20 хвилин інкубації в цьому розчині рухливість залишалася достатньо високою і становила 9,7%, що на 9,4% нижче, порівняно із початковою рухливістю. Найнижчі показники життєздатності сперматозоїдів кнурів спостерігали в 10,0% розчині ПВА, і цей показник становив 5,7%, що на 2,0; 3,7 та 4,0%, менше, порівняно із 5,0, 1,0 та 0,1% розчинами ПВА, відповідно.

Аналізуючи отримані дані після інкубації суспензії деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів у розчині ПВА з різними концентраціями ми встановили, що розчин ПВА в концентрації 10,0% є найменш вдалим, порівняно з іншими концентраціями. Так, під час підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення в 10,0% розчині ПВА швидкість руху через 20 хв знизилася до 5,7%, і проводити ін'єкцію з точки зору всмоктування та випорскування сперматозоїда було б достатньо зручно. Але зниження рухливості є достатньо високим, порівняно з іншими концентраціями, тому що, часто після розморожування сперматозоїдів кнурів кількість рухливих сперматозоїдів і так є невисокою. Для проведення процедури запліднення методом ICSI необхідно знерухомити сперматозоїд, ми маємо вибирати саме рухливий для впевненості того, що він є живим і знерухомлювати механічно ін'єкторною голкою.

Під час використання 0,1 та 1,0% розчинів ПВА через 20 хв. рухливість сперматозоїдів знизилася на 1,0 та 1,3%, відповідно, порівняно із початковою рухливістю. Але швидкість руху в ін'єкційній піпетці, була зашвидкою, так як щільність розчину майже не змінилась і була така ж як і в культурального середовища. Занадто швидкий рух може пошкодити ооцити під час аспірування цитоплазми, що є необхідним етапом в разі проведення ICSI. Наслідком аспірування великої кількості цитоплазми може бути дегенерація ооцита. Також через велику швидкість впускання/випускання рідини можна ін'єкувати велику кількість розчину всередину ооцита, що негативно вплине на розвиток ембріона.

Найбільш оптимальним розчином є 5,0% розчин ПВА. Рухливість сперматозоїдів в даному розчині становить 7,7%, за 20 хв інкубації. Швидкість руху знизилася, що спростило процедуру, до

того ж процес запліднення в даному випадку був більш безпечним для ооцита та для майбутнього ембріона.

ВИСНОВКИ

1. З огляду на несприятливі соціально-економічні зміни, які викликані пандемією та іншими інфекційними хворобами надійними підходами до ефективного вирішення завдань збереження та відтворення генофонду тварин є впровадженням в практику сучасних біотехнологічних методів.

2. Під час розробки програм збереження генофонду необхідно врахувати закономірності генетичних процесів в обмежених популяціях, орієнтуватися на широке використання таких біотехнологічних методів, як заморожування епідидимальних сперматозоїдів плідників; кріоконсервація ооцитів і отримання ембріонів *in vitro* різними методами в тому числі і методом ICSI.

3. Удосконалення біотехнологічних методів для кожного виду сільськогосподарських тварин збільшить кількість запліднених клітин та покращить якість сформованих ембріонів на доімплантаційних стадіях розвитку, що є ключовим для подальшого використання генетичного матеріалу в програмах збереження генофонду сільськогосподарських тварин.

4. Встановлено, що в разі застосування 10,0% розчину ПВП еякульовані деконсервовані сперматозоїди кнурів втрачають рухливість на 86,9% від початкової рухливості, що унеможлиблює процес вибору придатного сперматозоїда для запліднення методом ICSI.

5. Показано, що 10,0% розчин ПВА можна застосовувати для проведення іммобілізації сперматозоїдів кнурів, так як він знижує рухливість на 46,7% від початкової рухливості сперматозоїдів.

6. Доведено, що рухливість в разі інкубації деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів у 5,0% розчині ПВА знижується лише на 28,0% від початкової, що є оптимальним під час використання кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів, матеріал яких є в обмеженій кількості та зручним для оператора і безпечним для ооцитів.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Зюзюн А. Б., Щербак О. В., Ковтун С. І., Свергунов А. О., Свергунова Г. О. Аналіз ефективності розвитку поза організмом ембріонів свиней за допомогою використання наноматеріалу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2019. Т. 25. С. 231–236. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1168>
2. Ковтун С. І., Зюзюн А. Б., Щербак О. В., Троцький П. А. Використання нанобіотехнологічних методів для оптимізації технології культивування ооцитів корів поза організмом. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2018. Т. 22. С. 257–261. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.958>
3. Програма збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017–2025 роки / М-во аграрної політики та прод-ва України, Нац. акад. аграр. наук України, Ін-т розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН, Сумський нац. аграр. ун-т ; М. В. Гладій та ін. Суми, 2018. 85 с. URL: http://iabg.org.ua/images/stories/prog_zber.pdf. DOI: 636.082:502(477)
4. Avalos-Duron G., Cacedo-Del A. E., Rivero-Murillo B. J., Zambrano-Guerrero J. A., Carballo-Mondragyn E., Checa-Vizcaino M. B. Physiological ICSI (PICS) vs. Conventional ICSI in Couples with Male Factor: A Systematic Review. *JBRA Assisted Reproduction*. 2018. Vol. 22 (2). P. 139–147. doi: 10.5935/1518-0557.20180027
5. Bowley S. C., Comizzoli P., Lindell K. A., Matsas D. Genetic Cryopreservation of Rare Breeds of Domesticated North American Livestock: Smithsonian & SVF Biodiversity Preservation Project. *Diversity*. 2019. Vol. 11. P. 198. DOI: <https://doi.org/10.3390/d11100198>
6. Casillas F., Betancourt M., Cuello C., Ducolomb Y., López A., Juárez-Rojas L., Retana-Márquez S. An efficiency comparison of different in vitro fertilization methods: IVF, ICSI, and PICS for embryo development to the blastocyst stage from vitrified porcine immature oocytes. *Porcine Health Management*. 2018. Vol. 4 (16). P. 12. DOI: 10.1186/s40813-018-0093-6.
7. Casillas F., Ducolomb Y., Lemus A. E., Cuello C., Betancourt M. Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell coculture system. *Cryobiology*. 2015. Vol. 71. P. 299–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.003>
8. Deng T., Xie J., Hengtao G., Liu Q., Song X., Hu L., Meng L., Zhang C. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) enhanced intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryo developmental competence by ameliorating endoplasmic reticulum (ER) stress and inhibiting apoptosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020. Vol 37. P. 119–126. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01627-2>
9. Ding D., Wang Q., Li X., Chen B., Zou W., Ji D., Hao Y., Xue R., Zou H., Wei Z., Zhou P., Cao Y., Zhang Z. Effects of different polyvinylpyrrolidone concentrations on intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*. 2020. Vol. 28 (2). P. 148–153. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199419000820>

10. Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS) / Food and Agriculture Organization of United States. URL: <http://www.fao.org/dad-is/trend-in-risk-status/en/>.
11. Macedo M. P., Glanzner W. G., Rissi V. R., Gutierrez K., Currin L., Baldassarre H., Bordignon V. A fast and reliable protocol for activation of porcine oocytes. *Theriogenology*. 2018. Vol. 123. P. 22-29. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.021
12. Nabi A., Entezari F., Miresmaeili S. M., Vahidi S., Lorian K., Anbari F., Motamedzadeh L. Evaluation of sperm parameters and dna integrity following different incubation times in PVP medium. *Urology journal*. 2022. Vol. 19, No. 03. P. 232-237. DOI: <https://doi.org/10.22037/uj.v18i.6936>
13. Palermo G. D., Nagy Z. P. Manual of intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction with other advanced micromanipulation techniques to edit the genetic and cytoplasmic content of the oocyte. Cambridge, Cambridge university press, 2021. 171 p.
14. Petelak A., Krylov A. Surface sperm cell ubiquitination directly impaired blastocyst formation rate after intracytoplasmic sperm injection in pig. *Theriogenology*. 2019. Vol. 135 (1). P. 115-120.
15. Pinto S., Carrageta D. F., Alves M. G., Rocha A., Agarwa A., Barros A., Oliveira P. A. Sperm selection strategies and their impact on assisted reproductive technology outcomes. *Andrologia*. 2020. Vol. 53 (2). P. 18.
16. Rajska I. Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) as an alternative to standard in vitro fertilization in pigs. *Scientific annals of polish society of animal production*. 2015. Vol. 11 (3). P. 55-66.
17. Ribas-Maynou J., Yeste M., Salas-Huetos A. The relationship between sperm oxidative stress alterations and IVF/ICSI outcomes: a systematic review from nonhuman mammals. *Biology*. 2020. Vol. 9 (7). P. 178.
18. Roychoudhury S. I., Maldonado-Rosas A., Agarwal A. S., Esteves C. R., Sharma A., Gupta A. M. Parthenogenetic activation and developmental potential of mouse oocytes after intracytoplasmic injection (ICSI) of PVP (polyvinylpyrrolidone) and HA (Hyaluronic acid). *Fertility and sterility*. 2016. Vol. 106 (3). P. 544.
19. 2021 Statistical information committee report : https://www.aeta.org/docs/2020_Stats.pdf (2020 data).
20. Yamochi T., Hashimoto S., Morimoto Y. Mural granulosa cells support to maintain the viability of growing porcine oocytes and its developmental competence after insemination. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2021. Vol. 38. P. 2591-2599.
21. Yong H. Y., Pyo B. S., Hong J. Y., Keun K. S., Lee B. C., Lee E. S., Hwang W. S. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3±4 mm diameter injection pipette. *Human reproduction*. 2003. Vol. 18 (11). P. 2390-2396.

ДЛЯ НОТАТОК

НАУКОВО-МЕТОДИЧНЕ ВИДАННЯ

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

**ОПТИМІЗАЦІЯ ПІДГОТОВКИ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ
СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ШТУЧНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ**
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Загальна редакція С. І. Ковтун

Комп'ютерна верстка П. А. Троцький

Підписано до друку 31.01.2022.
Формат 60 x 84 1/16.
Ум. друк. арк. 1,4
Наклад 100 прим.

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