

УДК 612.014,636.4; 57.086.13
© 2009

*Мартиненко Н.А., доктор біологічних наук,
Коваленко В.Ф., доктор біологічних наук, академік УААН,
Ільченко М.О., аспірант,
Базалевич А.В., зоотехнік,
Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького УААН*

ФАКТОРИ СПЕРМАЛЬНОЇ ПЛАЗМИ, ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ КРІОТОЛЕРАНТНІСТЬ СПЕРМІЇВ КНУРА

Рецензент – академік УАОІ, доктор філософії, кандидат біологічних наук Близнюченко О.Г.

Огляд містить аналіз функціонального значення різноманітних факторів спермальної плазми кнура та можливості використання їх для підвищення кріотолерантності й запліднюючої здатності спермій. Зроблено висновок щодо стратегії подальшого розвитку досліджень з пошуку факторів підвищення кріотолерантності спермій кнура.

Ключові слова: кнур, кріоконсервація, спермальна плазма, малі молекули, кріотолерантність спермій.

Постановка проблеми. Для набуття комерційного рівня у штучному осіменінні свиней кріоконсервованою спермою, необхідно, аби одержані результати за функціональною активністю й запліднюючою здатністю відталених спермій були стабільними і не поступалися таким від застосування свіжої сперми. За вимогами комерційних компаній, саме на такому рівні мають бути кріобанки сперми видатних плідників [31-32]. Цього важко досягти через високу індивідуальну варіабельність кріорезистентності сперми – рідкої тканини, що складається зі спермальної плазми (СП) і гамет. Відокремлення спермій від плазми у стандартній технології їх заморожування не може бути індивідуальним для гамет, оскільки СП – полікомпонентна речовина, що включає секрети сім'яників, придатків та придаткових статевих залоз і містить варіюючі фактори – гормони, амінокислоти, жирні кислоти, ліпіди, осмоліти, пептиди і протеїни [33, 39]. Якісний і кількісний рівень усіх цих факторів варіює не лише у межах одного кнура, а й поміж окремими його еякулятами, чим обумовлена різна кріотолерантність спермій, – через що не можуть бути стабільними й результати їх кріоконсервації. За останніми даними комп'ютерного аналізу, практично всі параметри якості спермій кнура істотно погіршуються в процесі кріоконсервації [12]. Намагання поліпшити справу шляхом глибокого внутрішньоматкового осіменіння свиноматок заморожено-

відталою спермою докищо не вирішує проблеми через недосконалість цієї процедури і пристроїв для її здійснення [7-8]. Якісні зміни спермій у процесі кріоконсервації відбуваються на різних рівнях їх структури, зокрема ДНК [16, 23]. Тому на сучасному етапі загальним стратегічним напрямом є прогнозування заморожуваності сперми конкретних плідників і розробка методів їх селекції за цією фенотипічною ознакою.

Мета досліджень – висвітлити сучасний стан практичного застосування СП у кріоконсервації спермій кнура і визначити стратегію напрямку подальших досліджень.

Методи досліджень – аналіз і синтез літературних та власних експериментальних й теоретичних даних.

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. У сучасних технологіях перед заморожуванням спермій повністю видаляють СП [26]. На 20-30% менший рівень опоросів у свиноматок, яких осіменяли заморожено-відталою спермою, нині привернув увагу дослідників до можливості застосування СП у процесі кріоконсервації. Результати неоднозначні, що може бути пов'язано зі застосуванням різного методичного підходу стосовно вирішення проблеми. Збереження сперміями функціональної активності, а, отже, й запліднюючої здатності, характеризується наявністю поступально-прямолінійного руху. Заміна суб'єктивно-візуального способу оцінки цього показника на комп'ютерний аналіз сперми (CASA та ін.) підвищує точність і кількість визначених параметрів у їх взаємозв'язку. Здійснений за таким методом аналіз СП, одержаної фракційно (по 10 мл) протягом еякуляції, виявив залежність якості спермій від якості окремих порцій СП: найвища рухливість була у спермій, одержаних з першої фракції сперми, в якій концентрація СП максимальна, тоді як другій фракції впливала негативно [34]. Шляхом інкубації у СП першої фракції спермій, вилуче-

них із другої фракції, можливо було покращати характер їх кінематики, і навпаки, спермії з першої фракції втрачали свої якості при інкубації їх у другій фракції СП. У цілому рухливість сперміїв після розморожування залежала від концентрації протеїнів і бікарбонату в окремих фракціях СП.

Результати досліджень.

Фізіологічний вплив СП на репродуктивні процеси у самки.

Наявність у матці СП підвищує ефективність репродукції свиноматки за рахунок виникнення комплексу фізіологічних реакцій. При забезпеченні своєчасного транспорту сперміїв до яйцепроводів вони локалізуються в ділянці матково-трубного сполучення (МТС), де прилипають до епітелію, утворюючи так званий спермальний резервуар, необхідний для запліднення яйцеклітин. Існує незаперечний факт зменшеної кількості заморожено-відталених сперміїв у спермальном резервуарі. Так, при осіменінні свиноматок кріоконсервованою спермою, кількість сперміїв ($\times 10^3$) у цій зоні складала $9,1 \pm 3,4$ проти $211,8 \pm 84,9$ ($P < 0,01$) при осіменінні свіжою [5]. При цьому добавка 10% СП не поліпшила результату, проте питання стосовно відсотку добавки СП при кріоконсервації залишається відкритим. СП регулює розвиток доімплантаційних ембріонів свині, для яких типовим є гістотрофний тип живлення: її протеїни під впливом маточних секретів утворюють нові білкові сполуки [3-4]. Протеїни СП (PSP-I PSP-II) мають антигенні властивості й викликають в ендометрії свиноматки транзитну гостру запальну реакцію при екстенсивній проліферації маткових залоз і викиді у маткову порожнину поліморфноядерних гранулоцитів [9, 35]. Проте СП кнура також містить і специфічний протеїн сильної імуносупресивної дії, що забезпечує захист ранніх ембріонів проти імунних атак організму самки [13]. Інфузія СП у матку свині підвищує стероїдогенну активність лютеальних клітин (без збільшення їх кількості) при зростанні рівня сироваткового прогестерону [29-30]. Численні дослідження свідчать, що СП захищає спермії від кріопшкодження й підвищує заплідненість свиноматок [15, 30, 36-37].

Фізіологічний вплив СП на кріотолерантність сперміїв.

Підготовка сперми до кріоконсервації включає фазу повільного її охолодження до $+5^\circ\text{C}$, під впливом чого у сперміях проходить капацитоподібна реакція, так звана, "кріокапацитация" [20, 25], внаслідок якої ушкоджуються їх мем-

брани [38]. Інкубація відталених сперміїв кнура з добавкою 10 або 20% (v/v) СП зменшувала рівень капацитації від 59,7 до 30,3% і від 59,5 до 26,8%, відповідно [37]. Спермії, в яких відбулася капацитація, не формують спермального резервуара, оскільки не здатні прилипати до епітеліальних клітин матково-трубного з'єднання [5], наслідком чого є низький рівень запліднення свиней заморожено-відталою спермою. На відміну від сучасної стандартної технології кріоконсервації сперми кнура, наші дослідження розробки спрощеного, але ефективного її варіанта засновувалися на використанні суцільного еякуляту без попередньої концентрації сперміїв до заморожування, тобто, за наявності фізіологічно нормального об'єму СП. За таких умов заплідненість за результатами опоросів сягала 88,1% [1].

Ступінь поліпшення процесу кріоконсервації шляхом додавання СП до розбавника залежить від її якості, яку визначає рівень вмісту того чи іншого біологічно активного її інгредієнта, і також від кількості СП в еякуляті, що, в свою чергу, залежить від індивідуальності (генотипу і фенотипу) кнура. Наскільки варіабельна якість СП кнурів, демонструє факт можливості поліпшити результати кріоконсервації шляхом додавання плазми зі сперми кнура високої кріотолерантності до сперми кнура, яка погано заморожується [22, 34]. Важливим фактором кріорезистентності сперми є її протеїни [10], 90% яких у СП кнура складають 5 членів цієї родини: AQN-1, AQN-3, AWN і поліфункціональні протеїни СП: PSP-I та PSP-II.

PSP-протеїни мають здатність залипати до клітинної поверхні, тому наявні в епідімальних і еякульованих сперміях, отже, можуть модулювати їх активність [27]. Саме спермадгезини PSP-I та PSP-II позитивно, хоча й дозо-залежно, впливають на виживаемість сперміїв, кінематику їх руху, акросомний статус, мітохондріальний мембранний потенціал, відсоток рухливих сперміїв в умовах надмірного розбавлення сперми й інкубації при $+38^\circ\text{C}$ [18]. Спермадгезини кнура PSP-I і PSP-II захищають спермії також і від пошкоджень у процесі сперм-сексінгу, але так само дозо-залежно й в залежності від фази технологічного процесу [19]. Дослідження зміни протеїнового профілю сперміїв кнура протягом фази охолодження і після кріоконсервації показало в останньому випадку істотне зниження рівня протеїну 90 kDa (HSP90), пов'язаного з високотемпературним шоком (heat-shock protein 90) [24]. Доведено, що витрати протеїну 90 kDa

до 60%, порівняно зі свіжою спермою, розпочинаються протягом першої години охолодження до +5° С. Цей феномен не змінював функціональної активності спермійів на даному етапі, а передував їх пошкодженню, що наставало через 2-3 год. і виявлялось у частковій втраті нормальної рухливості спермійів. При цьому рівень протеїну HSP90 знижувався в охолоджених сперміях паралельно з порушенням їх рухливості, але він не витікає з гамети у СП, а руйнується [11].

Останнім часом запатентовано в якості кріопротектора модифіковану метанолом гідрофобну речовину спермальної плазми – ензим 11 β -гідроксістероїд дегідрогенази (11 β -HSDI), від рівня вмісту якого у спермі плідника залежить (і може бути прогнозована) кріостійкість спермійів [28]. Виявлено дві нових групи модуляторів активності 11 β -HSDI у спермі, які зберігають життєздатність спермійів у процесі кріоконсервації. Винахідники зі США [14] пропонують для підвищення показників рухливості і відсотку спермійів з інтактною акросомою метод виготовлення композиції із суміші антигена зв'язку із заплідненням (fertility-associated antigen – FAA) і тканинного інгібітора металопротеїнази типу 2 (TIMP-2).

Стратегія подальшого пошуку факторів кріотолерантності спермійів кнурів.

Аналіз публікацій з питань підвищення запліднюючої здатності заморожено-відталених спермійів кнурів свідчить про чітку тенденцію спрямованості досліджень у бік пошуку й використання фізіологічно активних інгредієнтів СП [14, 18-19, 28]. Колектив дослідників із Англії (Лондон), очолюваний L.R.Fraser, відкрив, що деякі малі молекули, наявні у СП, – стимулюючий запліднення протеїн (FPP), аденозин, кальцітонін і адреналін, – можуть регулювати капацитацію та акросомну реакцію у напрямі підтримки запліднюючої здатності спермійів. При чому достатньо було 30-хвилинної експозиції спермійів у суспензії з молекулами FPP, аби одержати вірогідне підвищення запліднення, у порівнянні з контролем [17]. Дослідження стимулюючого впливу аденозину, FPP і кальцітоніну в системі IVМ привело до фізіологічного обґрунтування

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Коваленко В.Ф., Бурлаченко Л.В., Фоломєєв В.З. Використання замороженої сперми кнурів // Свинарство. – 1980. – 33. – С.91-96
2. Осташко Ф.И. Эффект фортификации липофильных структур плазматической мембраны клеток липидными соединениями // Зб. наук. пр.

механізму відповіді клітинних структур на вплив цих молекул у їх взаємодії, утворення сАМР у процесі капацитації з модуляцією спермальных функцій під впливом протеїн-тірозинфосфориляції. Вважають, що ці (і не лише ці) молекули, додані в сперму для осіменіння свиней, поліпшать запліднюючу здатність.

Другий напрям досліджень стосується можливості вирішити проблему перикисного окислення ліпідів спермальных мембран шляхом зміцнення їх молекулярної структури (J.T. Bailey et al., 2008) [6]. І це, фактично, є намаганням доопрацювати і втілити на комерційному рівні метод фортификації ліпофільних структур цитоплазматичної мембрани ліпідними сполуками (розроблений Ф.И. Осташком 1995 [2]). Така модифікація мембрани необхідна через те, що вона містить високий рівень поліненасичених жирних кислот, зниження якого відбувається протягом кріоконсервації внаслідок перекисного окислення, зокрема у фазі розморожування. Проте існує й інший шлях попередження цієї реакції: загальна антиоксидантна активність СП кнурів складає, в середньому, 1623,7 \pm 56,28 μ M і залежить від фракції еякуляту, розподіленого як преспермальна, спермальна і постспермальна фракції, до того ж остання з них є мінімальною активності [21, 27].

Висновки.

Головним і найперспективнішим напрямом сучасних досліджень, спрямованих на підвищення кріотолерантності спермійів кнурів, є визначення пов'язаних із нею фізіологічно активних інгредієнтів СП, у першу чергу, молекулярних факторів, подібних до протеїну стимуляції запліднення (FPP).

Перспективним для поліпшення кріотолерантності спермійів кнурів є визначення в окремих фракціях СП антиоксидантів різного профілю за їх кількісною та якісною характеристикою для подальшого застосування в процесах кріоконсервації сперми. Відновлюються дослідження, спрямовані на зміцнення ліпідних структур спермальных мембран екзогенним впливом як безпосередньо на гамети, так і на якість спермопродукції кнурів, зокрема, годівлею.

Ин-ту тваринництва УААН. – Х., 1995. – Вип. 38. – С.15-29.

3. Хомяк И.И. Взаимосвязь физиологических и биохимических показателей спермы хряка с биологической полноценностью спермиев – Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков, 1981. –

24 с.

4. Яблонський В.А., Хомяк Н. Вплив секретів геніталій самок на електрофоретичну та імуноелектрофоретичну картину сперми кнурів// Свинарство. – К., 1981. – 34. – С. 66-69.
5. Abad M., Sprecher DJ, Ross P. et al. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm-reservoir in gilts// Theriogenology. – 2008. – 70. – P.1364-1367.
6. Bailey J.L., Lessard C., Jacques J. et al. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry// Theriogenology/ – 2008. – 70. – 8. – P.1251-1259.
7. Bathgate R., Eriksson BM., Thomson PC et al. Field fertility of frozen-thawed boar sperm at low doses using non-surgical, deep uterine insemination // Anim.Reprod.Sci. – 2008. – 103. – (3-4). – P. 323-335.
8. Bathgate R., Grossfeld L., Susetio D. et al. Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm// Anim.Reprod.Sci. – 2008. – 104. – (2-4). – P.440-444.
9. Bishof R.J., Lee C.S., Brandon M.R., Meeusen E. Inflammatory response in the pig uterus by seminal plasma// J.Reprod.Immunol.1994. – 26. – 2. – pp.131-146.
10. Caballero J, Vazquez J.M, Garsia F.M. et al. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa// Theriogenology. – 2008. – 70. – 8. – P/1352-1355
11. Cao WL, Wang YX, Xiang ZO., Li Z. Cryopreservation-induced decrease in heat-shock protein 90 in human spermatozoa and its mechanism// Asian J. Androl. – 2003. – 5. – 1. – P.43-46.
12. Casas L., Sancho S., Briz M. et al. Valuable boar sperm parameters when searching for freezability traits// Theriogenology, 2008. – 70. – P. 1396. Abstract.
13. Claus R. Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig// J. Reprod. Fertil. Suppl. – 1990. – 40. – pp. 117-131.
14. Cook B., Michael A. Composition and method to increase mammalian sperm function. - PCT/US2007/060771; WO/2007/084985) Priority data 19.01.2006 US
15. Crabo B., Einarsson S., Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Acta Vet Scand. – 1971. – 12. – P. 125-127.
16. Flores S., Cifuentes D., Fernandez-Novel JM., et al. Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm// Theriogenology. – 2008. – 69. – 9. – P. 1083-1094.
17. Fraser L.R. The role of small molecules in sperm capacitation// Theriogenology. – 2008. – 70. – P.1356-1359.
18. Garcia E.M, Vazquez J.M, Calvete J.J et al. Dissecting the Protective Effect of the Seminal Plasma Spermadhesin PSP-I/PSP-II on Boar Sperm Functionality // J.Andrology. – 2006. – 27. – 2. – P.434-443.
19. Graaf SP, Leahy T., Marty J. et al. Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation// Theriogenology. – 2008. – 70. – P. 1360-1363.
20. Green C.E, Watson P.F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation // Reproduction. – 2001. – 122. – P.889-898.
21. Hernández M , Cano A., Arnao MB, et al. Antioxidant capacity of boar seminal plasma// Reprod. Fert. Dev. – 2005. – 17. – 2. – P.283. Abstract 266.
22. Hernández M., Roca J., Calvete J.J, et al. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity post-thaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars// J.Andrology. – 2007. – 28, – 5. – P.689-697.
23. Hu J.H., Li Q.W, Jiang Z.L, Li W.Y. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing// Cryobiology. – 2008. – Sep 19. – [Epub ahead of print] PMID: 18834872.
24. Huan X.Y, Kuo J.H, Lee W.C., et al. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa // Theriogenology. – 1999 – 51(5):1007-1016.
25. Kaneto M, Harayama H, Miyake M, Kato S. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins// Anim Reprod Sci. – 2002. – 73. – P. 197 -209
26. Kirkwood RM, Vadnais ML, Abad M. Practical application of seminal plasma// Theriogenology. – 2008. – 70. – P. 1364-1367.
27. Manaskova P., Jonakova V. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa// J,Reprod. Immunol. – 2008. – 78. – 1. – P.40-48
28. Michael A., Thurston L. Improvements relating to semen preservation.- Patent PCT/GB 2004/00/4683 ADP № 0026001.- WO/2005/045067 Priority Data 06.11.3003 GB.
29. O'Leary S., Robertson S.A., Armstrong D.T. The influence of seminal plasma on ovarian functions in pigs – a novel inflammatory mechanism? // J. Re-

- prod. Immunol. 2002. – 57. – N 1-2. – P.225-239.
30. O'Leary S, Jasper MJ, Warnes GM, et al. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig// *Reproduction*.- 2004. – 128. – P.237-247.
31. Roca, J., H. Rodriguez-Martinez, J. M. Vazquez et al.. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination// in *Control of Pig Reprod. VII*. – 2006. – P.261-275 Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.
32. Roca J., Hernández, G. Carvajal, J.M. et al.. Factors influencing boar sperm cryosurvival// *J. Anim Sci.* – 2006. – 84. – P.2692-2699.
33. Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, et al. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*. – 2005. – 63. – P.514 -525.
34. Rodríguez-Martínez H., Saravia F., Wallgren M. et al. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing// *Theriogenology*. – 2008. – 70. – P.1242-1250
35. Rozeboom K.J., et al.. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leucocyte migration into uterus of gilts// *J. Anim. Sci.* – 1999. – 77. – 8. – P.2201-2206.
36. Saravia, F., M. Wallgren, S. Nagy, A. et.al. Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: Effects on sperm viability// *Theriogenology*. – 2005. – 63. – P.1320-1333.
37. Vadnais ML, Kirkwood RN, Specher DJ, Chou K. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlorotetracycline staining // *Anim.Reprod.Sci.* – 2005. – 90. – (3-4). – P.347-354.
38. Vadnais M.L., Robert. K.P. Effects of seminal plasma on cooling-Induced capacitative changes in boar sperm// *J.Andrology*. – 2007. – 28. – 3. – P. 416-421.
39. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, eds. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press; 1994. – P.189-317.