



РЕЗУЛЬТАТЫ АПРОБАЦИИ ПРОТОКОЛА КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ БЫКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГОТОВОЙ КОНЦЕТРИРОВАННОЙ СРЕДЫ-РАЗБАВИТЕЛЯ

*Корочкина Елена Александровна, канд.ветеринар.наук, доц.
Пушкина Варвара Сергеевна, Бахтурина Елизавета Игоревна,
Максимова Мария Андреевна, Никитин Владимир Вячеславович*

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия

РЕФЕРАТ

В последние годы молочное животноводство в России активно развивается во многих направлениях, обеспечивая потребителей молоком, молочными продуктами, мясом и другим сырьем. Особенно актуальными становятся автоматизация процессов выращивания крупного рогатого скота и селекция наиболее экономически выгодных молочных и мясных пород, чему способствует активное применение искусственного осеменения в данном сельскохозяйственном секторе. Успешность искусственного осеменения определяется множеством факторов, в том числе качеством используемых разбавителей спермы и корректностью протоколов криоконсервации. Целью настоящего исследования является апробация протокола криоконсервации спермы быка голштинской породы. Были произведены взятие, оценка эякулята, его предподготовка (центрифугирование, разбавление, охлаждение). Процесс заморозки проводился методом, представленным в статье Ansari M.S., Rakha B. A. et al. (2015) для спермы буйволов: соломинки выдерживали над парами жидкого азота на расстоянии 5 см в течение 10-ти минут, а затем проводили погружение в сосуд Дьюара. Оценка подвижности сперматозоидов проводилась 3 раза: после взятия спермы, после охлаждения, а также 0 часов после оттаивания. Было определено негативное влияния процесса криоконсервации на морфофункциональные характеристики сперматозоидов. В ходе исследования было отмечено снижение подвижности прогрессивно двигающихся сперматозоидов на 21,53%, а также резкое увеличение неподвижных сперматозоидов до и после криоконсервации с 6,8% до 33,82%. Количество непрогрессивно двигающихся сперматозоидов было снижено с 9,12 % до 2,91%. Изменение морфологических показателей сперматозоидов в результате криоконсервации (после охлаждения и 0ч после оттаивания): количество нормальных сперматозоидов уменьшилось на 12%, увеличилось количество сперматозоидов с дефектами хвоста на 11% и головки на 2%. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что использование данного протокола криоконсервации, с предварительной подготовкой, способствует сохранению жизнеспособности сперматозоидов. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение и создание криопротекторов, повышающих сохранность сперматозоидов быков-производителей в процессе глубокого замораживания.

Ключевые слова: сперма быка, оценка качественных показателей, протокол криоконсервации.

ВВЕДЕНИЕ

Молочное животноводство обеспечивает постоянное поступление молока и молочных продуктов на рынок, что является важным фактором для устойчивого экономического роста и повышения благосостояния населения. Исходя из этого, молочная промышленность является хорошим показателем рентабельности сельского хозяйства и устойчивым сектором экономики страны в целом [7]. Эффективность производства молока зависит от проведения ветеринарных мероприятий по воспроизводству стада, включающих в себя искусственное осеменение.

Искусственное осеменение – репродуктивная технология, при которой сперму, полученную от производителя, с помощью специальных инструментов вводят в половые пути самки [2, 8]. Известно, что при естественной случке от быка-производителя в течение года можно получить не более 60-80 телят. Криоконсервация спермы для проведения искусственного осеменения позволяет увеличить результативность до 50 тыс.

телят [4,6]. Как известно, криоконсервация – глубокое замораживание спермы (-196 °C), которое обеспечивает долгосрочное хранение генетического материала. Успешность данной процедуры определяется процентом жизнеспособности сперматозоидов после разморозки спермы и зависит от таких факторов, как режим центрифугирования, качество разбавителя и степень разбавления, время охлаждения и протокола заморозки.

На сегодняшний день существует огромное количество эффективных протоколов заморозки спермы быков-производителей, однако, многие из них разработаны для племенных станций и представляют собой достаточно сложный с точки зрения технического оснащения (аппараты для наполнения и запечатывания, контейнеры с программой «автоматическое замораживание» и т.д.) процесс. В связи с этим, актуальным является поиск и апробация протоколов, пригодных для заморозки семени в производственных условиях.

Целью настоящего исследования является апробация протокола криоконсервации спермы быка с использованием готовой концентрированной

ной среды - разбавителя компании IMV (Франция).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено в научно-образовательной лаборатории по трансплантации эмбрионов животных на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины». Было проведено взятие и исследование спермы быка голштинской породы в возрасте трех лет ($n=1$). Отбор пробы был произведен с помощью искусственной вагины модели IMV (Франция) согласно ГОСТ32222–2013 [3].

Оценка спермы состояла из комплексного исследования, включающая в себя определение таких параметров как объем, запах, цвет, концентрация, морфология, подвижность.

Исследование проводилось с помощью микроскопа Levenhuk MED 45T. Для подсчета концентрации сперматозоидов использовалась камера Горяева [1]. Оценка морфологии и подвижности сперматозоидов проводилась с использованием программы Аргус-CASA. Полученный образец был разведен в соотношении 1:100. Оценка аликвоты спермы производилась под увеличением 10x10 с использованием камеры Маклера. При оценке подвижности учитывались следующие показатели: VAP – средняя скорость движения головки по усредненной траектории, мкм/сек; VSL – скорость прямолинейного движения головки, мкм/сек; VCL – средняя скорость движения сперматозоидов по реальной траектории, мкм/сек; ALH – среднее отклонение головки, мкм; BCF – частота колебательных усредненных движений, Гц; STR – степень прямолинейности направленного движения сперматозоидов, %; LIN – степень волнистости треков, %; WOB – процент осцилляции, %. Для оценки морфологии использовалась окраска Diff-Quick (набор включает: 1 – фиксатор (триарилметан, растворенный в метилом спирте); 2 – краситель 1 (эозинофильный ксантен); 3 – краситель 2 (базофильный тиазин); экспозиция мазка в каждом растворе составляла 7 минут) с дальнейшим проведением микроскопии (увеличение с использованием иммерсионного объектива 100x10, иммерсионное масло).

Для разбавления спермы был использован готовый разбавитель компании IMV (Франция). Состав данного разбавителя включает в себя сахара, минеральные соли, буфер, антиоксиданты, глицерин, фосфолипиды, антибиотики (гентамицин, тилозин, линкомицин и спектиномицин). Перед разбавлением сперму центрифугировали в следующем режиме: 7 минут со скоростью 600 об/мин с последующим удалением семенной плазмы (20%).

Сперму разбавляли в соотношении 1:4 (1 мл – сперма, 2 мл – разбавитель, 4 мл – бидистиллированная вода), далее – охлаждали при температуре + 4°C в течение 2 часов для стабилизации взаимодействия между спермой и средой. После чего производили ручную упаковку разбавленной спермы при помощи микропипетки (Minitube) и пайет объемом 0,25 мл при температуре + 4°C.

Процесс заморозки проводился методом, представленным в статье Ansari M.S., Rakha B. A. et al. (2015) для спермы буйволов: соломинки вы-

держивали над парами жидкого азота на расстоянии 5 см в течение 10-ти минут, а затем проводили погружение в сосуд Дьюара [9]. Оттаивание спермы проводили при температуре +37°C в водяной бане в течение 30 секунд. Оценка подвижности сперматозоидов проводилась 3 раза: после взятия спермы, после охлаждения, а также 0 часов после оттаивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время разработано большое количество криопротекторных сред для успешного проведения процедуры криоконсервации спермы (OptiXcell, BioXcell, BullXcell, INRA96, NutriXcell и AndroMed, CEP-2) [11]. В состав различных разбавителей могут входить: соевый лецитин (AndroMed), свежий яичный желток (BullXcell), плазма каудального придатка семенника (CEP-2) [5]. Разбавитель компании IMV (Франция) включает липосомы и не содержит в своем составе животного белка. Концентрированная среда-разбавитель неоднократно использовалась в различных исследованиях [9, 11]. Chaudhari D.V., Dhami A. J. (2015) была доказана роль готовой концентрированной среды как эффективного криопротектора в процессе глубокой заморозки. Так, при оценке спермы буйволов после оттаивания (0 часов) были зарегистрированы такие показатели как жизнеспособность ($59.67 \pm 0.91\%$), подвижность $49.90 \pm 0.90\%$, количество нормальных сперматозоидов $88.73 \pm 0.18\%$, сперматозоидов с интактными акросомами - $78.50 \pm 0.25\%$ [10].

При проведении комплексного анализа спермы быка 0 часов после взятия были получены следующие данные: цвет белый, с желтоватым оттенком, запах - слабый специфический, объем - 10 мл, концентрация – 1.8 млрд., количество нормальных сперматозоидов составляло 69 %, количество сперматозоидов с дефектами: хвостов – 20 %, шейки – 7 %, головок – 1 %, других дефектов – 3 %, количество прогрессивно двигающихся сперматозоидов – 87,41 %, непрогрессивно двигающихся – 6,99 %, неподвижных – 5,59 %.

Была проведена криоконсервация спермы быка, которая включала в себя подготовку (центрифугирование, разбавление, охлаждение) и двухфазовую глубокую заморозку. Результаты морфологической оценки сперматозоидов быка охлажденной и размороженной спермы приведены в диаграммах 1 и 2.

Согласно данным диаграммы (рис. 1), количество морфологически нормальных сперматозоидов после 2 часов охлаждения составило 58%. Наибольшее число отклонений среди патологических форм сперматозоидов наблюдалось в хвосте (16%), также были обнаружены отклонения в шейке (15%) и головке (10%).

Согласно данным диаграммы (рис.2), количество нормальных сперматозоидов после проведенной криоконсервации составило 46%, количество сперматозоидов с патологией хвоста 27%, патологией головки 12%, патологией шейки 14%. Таким образом, морфологические показатели сперматозоидов изменились в результате криоконсервации: количество нормальных спермато-

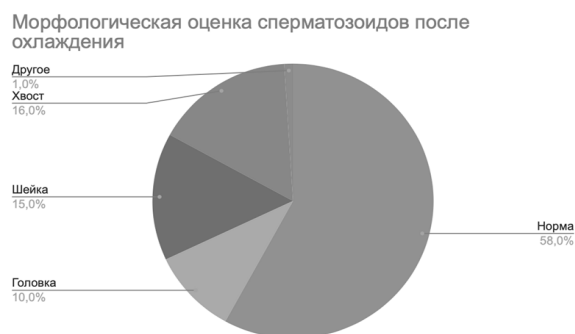


Рисунок 1. Морфологическая оценка сперматозоидов после охлаждения (2 часа).

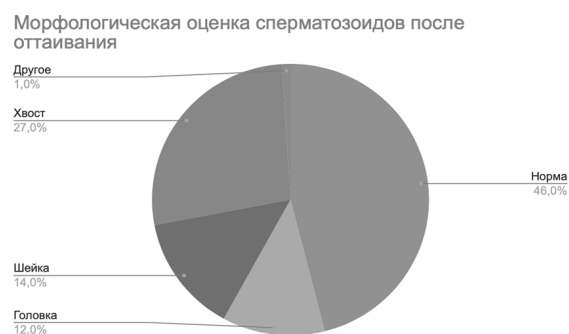


Рисунок 2. Морфологическая оценка сперматозоидов после оттаивания спермы (0 часов)

Результаты оценки подвижности сперматозоидов быка

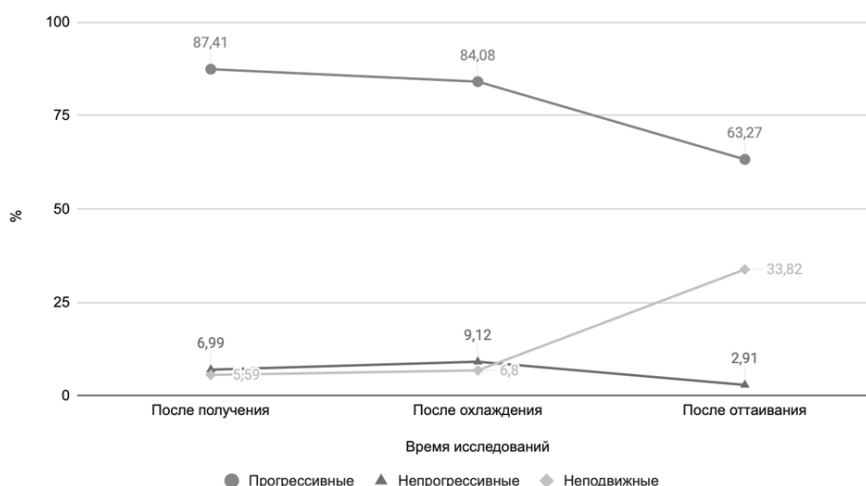


Рисунок 3. Результаты оценки подвижности сперматозоидов быка до и после криоконсервации

зоидов уменьшилось на 12%, увеличилось количество сперматозоидов со следующими дефектами: хвоста на 11%, головки на 2%.

В ходе проведения исследований было выявлено благоприятное воздействие готовой концентрированной среды-разбавителя компании IMV (Франция) на подвижность сперматозоидов (рис. 3). Так, после разбавления и охлаждения спермы наблюдалось снижение прогрессивного движения сперматозоидов с 87,41 до 84,04%, соответственно, что составило разницу в 3,33% по сравнению со значениями 0 часов после взятия. Зарегистрировано увеличение количества сперматозоидов с непрогрессивной подвижностью и неподвижных сперматозоидов после разбавления и охлаждения на 2,13 и 1,21%, соответственно.

Было определено негативное влияние процесса криоконсервации на морфофункциональные характеристики сперматозоидов. В ходе исследования было отмечено снижение подвижности прогрессивно двигающихся сперматозоидов на 21,53%, а также резкое увеличение неподвижных сперматозоидов до и после криоконсервации с 6,8% до 33,82%. Количество непрогрессивно двигающихся сперматозоидов было снижено с 9,12% до 2,91%.

Кинематические параметры подвижности сперматозоидов приведены в таблице 1.

Согласно данным таблицы 1, скорость прямо-

линейного движения (VSL) и скорость перемещения сперматозоидов по траектории (VCL) снижались после криоконсервации на 382,45 и 486,63 мкм/сек, соответственно. Средняя скорость движения по усредненной траектории (VAP) также имела тенденцию к снижению после криоконсервации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в проведенном исследовании использовался следующий протокол: разбавление спермы готовой концентрированной средой-разбавителем (IMV, Франция) в соотношении 1:4, охлаждение при температуре 4 °C в течение 2 часов, заморозка, включающая в себя фиксацию соломинок над парами азота в течение 10 минут на расстоянии 5 см, далее полное погружение в сосуд Дьюара [9]. Использование данного протокола криоконсервации, с предварительной подготовкой, способствует сохранению жизнеспособности сперматозоидов с такими показателями как 46% нормальных сперматозоидов, 27% с патологией хвоста, 14% с патологией шейки, 12% с патологией головки, 1% с другими патологиями, а также 63,27% прогрессивно двигающихся сперматозоидов, 2,91% непрогрессивно двигающихся и 33,82% неподвижных сперматозоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баженова, Н.Б. Оценка качества спермы жи-

Таблица 1.

Кинематические показатели подвижности сперматозоидов быка после взятия, охлаждения и оттаивания спермы

Время проведения	Показатели подвижности							
	VSL, мкм/сек	VCL, мкм/сек	LIN, %	VAP, мкм/сек	WOB, %	STR, %	ALH, мкм	BCF, %
После получения (0 часов)	725,76	1087,16	66,76	926,7	85,24	78,32	2,23	0
После охлаждения (0 часов)	1207,1	1416,03	85,25	1232,25	87,02	97,96	1,99	3571,43
После оттаивания (0 часов)	824,65	929,4	88,73	845,22	90,94	97,56	1,95	0

вотных / Н. Б. Баженова, К.В. Племяшов. – СПб.: «Издательство СПбГАВМ», 2007. – 22 с.

2. Генджиева, О.Б. Опыт проведения искусственного осеменения телок калмыцкой породы / О. Б. Генджиева, А. Я. Генджиев // Российский ветеринарный журнал. 2007. № Спецвыпуск. Май.

3. ГОСТ 32222–2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. – Введен 2015-01-27. – М.: Стандартинформ, 2018. – 10 с.

4. Зырянова, С.В. Интенсивность роста ремонтных тёлочек Михайловского типа в зависимости от происхождения по отцу / С.В. Зырянова, Р.В. Тамарова // Вестник АПК Верхневолжья. — 2018. — № 4. — С. 24-29.

5. Корочкина, Е.А. Значение разбавителей спермы разных видов сельскохозяйственных животных в процессе ее криоконсервации / Е. А. Корочкина, А. И. Мороз // Генетика и разведение животных. – 2022. – № 4. – С. 108-113.

6. Пронина, Н.Ю. Изучение биологических показателей спермы быков-производителей татарстанского типа при её криоконсервации, хранении и использовании на головном племпредприятии «Элита» татарстана / Н.Ю. Пронина, Н.М. Василевский, Б.Г. Пронин // Ученые записки Казанской государствен-

ной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. — 2015. — № 221. — С. 175-181.

7. Слепцов, В.В. Пути повышения экономической эффективности производства молока // Эпоха науки. 2017. №9.

8. Студенцов, В.С. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных: учебник для вузов / А. П. Студенцов, В. С. Шипилов, В. Я. Никитин [и др.]. — 12-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2022. — 548 с.

9. Ansari M.S. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm / M.S. Ansari, B.A. Rakha, S. Akhter, M. Ashiq // Theriogenology. – 2016. – Vol. 85. – №3. – P. 528-532

10. Chaudhari D.V. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen / D.V. Chaudhari, A.J. Dhami, K.K. Hadiya, J. A. Patel // Veterinary World. – 2015. – Vol. 8. – №2. – P. 239-244

11. Salman A. Extension of the equilibration period up to 24 h maintains the post-thawing quality of Holstein bull semen frozen with OPTIXcell® / A. Salman, E. Fernández-Alegre, R. Francisco-Vázquez, R. Gómez-Martín // Animal Reproduction Science. – 2023. – Vol. 250. – P. 1-11

RESULTS OF TESTING THE PROTOCOL FOR CRYOPRESERVATION OF BULL SPERM USING A CONCENTRATED DILUTENT MEDIUM

Elena Aleksandrovna Korochkina, PhD of Veterinary Sciences, Docent

Varvara S. Pushkina, Elizaveta I. Bakhturina, Maria A. Maksimova, Vladimir V. Nikitin
St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russia

In recent years, dairy farming has been actively developing in Russia in many directions, providing consumers with milk, dairy products, meat and other raw materials. Particularly relevant are the automation of the processes of raising cattle and the selection of the most economically profitable dairy and meat breeds, which is facilitated by the development of artificial insemination in this agricultural sector. The success of artificial insemination is determined by many factors, including the quality of sperm extenders used and the correctness of cryopreservation protocols. The purpose of this study is to test a protocol for cryopreservation of Holstein bull sperm. The ejaculate was collected, evaluated, and pre-prepared (centrifugation, dilution, cooling). The freezing process was carried out using the method presented in the article by Ansari M.S., Rakha B. A. et al. (2015) for buffalo sperm: the straws were kept above liquid nitrogen vapor at a distance of 5 cm for 10 minutes, and then immersed in a Dewar flask. Sperm motility was assessed 3 times: after sperm collection, after cooling, and 0 hours after thawing. The negative impact of the cryopreservation process on the morphofunctional characteristics of sperm was determined. The study noted a decrease in the motility of progressively moving sperm by 21.53%, as well as a sharp increase in immobile sperm before and after cryopreservation from 6.8% to 33.82%. The number of non-progressive spermatozoa was reduced from 9.12% to 2.91%. Changes in the morphological parameters of sperm as a result of cryopreservation (after cooling and 0 hours after thawing): the number of normal sperm decreased by 12%, the number of sperm with tail defects increased by 11% and head by 2%. Based on the data obtained, we can conclude that the use of this cryopreservation protocol, with preliminary preparation, helps preserve sperm viability. Further research will be aimed at studying and creating cryoprotectors that increase the safety of sperm of breeding bulls during deep freezing.

Key words: cryopreservation of bull sperm, assessment of quality indicators, cryopreservation protocol.

REFERENCES

1. Bazhenova, N.B. Assessing the quality of animal sperm / N.B. Bazhenova, K.V. Plemyashov. – St. Petersburg: “SPbGAVM Publishing House”, 2007. – 22 p.

2. Gendzhieva, O.B. Experience in artificial insemination of Kalmyk breed heifers / O.B. Gendzhieva, A. Ya. Gendzhiev // Russian Veterinary Journal. 2007. No. Special issue. May.

3. GOST 32222–2013. Means of reproduction. Sperm. Sampling methods. – Veden 2015-01-27. – М.: Standartinform, 2018. – 10 p.
4. Zyryanova, S.V. Growth intensity of Mikhailovsky type replacement heifers depending on paternal origin / S.V. Zyryanova, R.V. Tamarova // Bulletin of the agroindustrial complex of the Upper Volga region. - 2018. - No. 4. - P. 24-29.
5. Korochkina, E.A. The importance of semen diluents of different types of farm animals in the process of cryopreservation / E. A. Korochkina, A. I. Moroz // Genetics and animal breeding. – 2022. – No. 4. – P. 108-113.
6. Pronina, N.Yu. Study of biological indicators of sperm of Tatarstan type bulls during its cryopreservation, storage and use at the main breeding enterprise “elite” of Tatarstan / N.Yu. Pronina, N.M. Vasilevsky, B.G. Pronin // Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after. N.E. Bauman. - 2015. - No. 221. - P. 175-181.
7. Sleptsov, V.V. Ways to increase the economic efficiency

- cy of milk production // Epoch of Science. 2017. No. 9.
8. Studentsov, V.S. Obstetrics, gynecology and biotechnology of animal reproduction: a textbook for universities / A. P. Studentsov, V. S. Shipilov, V. Ya. Nikitin [and others]. — 12th ed., revised. - St. Petersburg: Lan, 2022. - 548 p.
9. Ansari M.S. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm / M.S. Ansari, B.A. Rakha, S. Akhter, M. Ashiq // Theriogenology. – 2016. – Vol. 85. – №3. – P. 528-532
10. Chaudhari D.V. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen / D.V. Chaudhari, A.J. Dhami, K.K. Hadiya, J. A. Patel // Veterinary World. – 2015. – Vol. 8. – №2. – P. 239-244
11. Salman A. Extension of the equilibration period up to 24 h maintains the post-thawing quality of Holstein bull semen frozen with OPTIXcell® / A. Salman, E. Fernández-Alegre, R. Francisco-Vázquez, R. Gómez-Martín // Animal Reproduction Science. – 2023. – Vol. 250. – P. 1-11

УДК 636.2.082.

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2023.4.76

РАННЕЕ ОСЕМЕНЕНИЕ ТЕЛОК

Падерина Роза Васильевна¹, канд. с.-х. наук, доц., orcid.org/0000-0001-9579-0364
Виноградова Наталия Дмитриевна², канд. с.-х. наук, доц., orcid.org/0000-0002-8030-4877
¹*Вятский государственный агротехнологический университет, Россия*
²*Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия*

РЕФЕРАТ

В последние годы, увеличивается потребление молока и молочной продукции, соответственно возрастает необходимость в повышении продуктивности животных и производства молока. Одним из способов достижения этой цели, как считают специалисты, является раннее осеменение телок. В условиях конкретной технологии производства необходимо устанавливать оптимальные, наиболее выгодные сроки начального полового использования телок.

Нами были проведены исследования, целью которых явилось изучение продуктивных качеств телок, осемененных в возрасте 12 мес. в сравнении с животными более поздних сроков осеменения.

Анализ данных изменения живой массы в процессе роста показал, что телки 1-й группы росли интенсивно во все возрастные периоды, опережая сверстниц по живой массе. Изучение показателей молочной продуктивности показало, что за 305 дней 1-й лактации и за всю лактацию животные 1-й группы (раннее осеменение) уступали только животным 2-й групп по количеству молока, но отличались высокой жирномолочностью (3,93%). Удой на 1 дойный день у животных 1-й группы был ниже на 0,4-0,8 кг. По результатам 2-й лактации различий в продуктивности между животными разных групп не выявлено.

Анализ данных о продолжительности использования молочных коров разного возраста осеменения показал, что в сложившихся условиях кормления, содержания и использования животных в исследуемом хозяйстве коровы с ранним сроком осеменения (12,0 мес.) использовались дольше других - 1,4 лактации. Размеры тела первотелок, а именно ширина в крестце, была оценена у животных 1-й группы на 3 балла, что хуже, чем у первотелок других групп.

Ключевые слова: телки, возраст осеменения, живая масса, молочная продуктивность, продолжительность продуктивного использования, ширина таза в крестце.

ВВЕДЕНИЕ

Молочная продуктивность является одним из ключевых показателей эффективности производства молока в животноводстве. В связи с ростом потребления молочной продукции, увеличивается необходимость в повышении продуктивности животных. Одним из способов достижения этой цели является раннее осеменение телок. [1,2,3,4,5]

Слишком раннее первое оплодотворение телок приводит к задержке, отставанию их в росте и развитии, к трудным родам, приплод рождается слабый, мелкий, организм телок ослабляется, сокращается длительность их хозяйственного использования. Задержка с первым оплодотворением приводит к недополучению телят и продук-

ции от коров, возрастают затраты на выращивание, возникает трудность последующих их оплодотворений. Поэтому в каждом конкретном случае необходимо устанавливать оптимальные, наиболее выгодные сроки начального полового использования телок. [1,2]

Организация воспроизводства стада – это один из элементов технологии производства молока [2]. Организация воспроизводства стада в молочном скотоводстве базируется на биологических особенностях крупного рогатого скота, которые мы должны учитывать при ведении отрасли. Еще недавно оптимальным возрастом 1 осеменения телок считался возраст 16-18 месяцев (при достижении живой массы 70-75% от живой массы взрослой коровы). [2,3,5]. Исполь-