АКУШЕРСТВО, ГИНЕКОЛОГИЯ

УДК: 636.082.453.53.2:636.39.082.31
DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.353

КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ КОЗЛОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Корочкина Е.А. [1]* – канд. ветеринар. наук, доц. кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID 0000-0002-7011-4594); **Трифонова А.В.**[2] – канд. биол. наук, директор по науке; **Финагеев Е.Ю.**[1] – канд. ветеринар. наук, асс. кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий; **Главацкая Д.Е.**[1] – студ.; **Пушкина В.С.**[1] – студ.

[1] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»
[2] ООО «ЦитоГенТест»

*e.kora@mail.ru

Ключевые слова: *сперма, козлы-производители, протокол криоконсервации, искусственное осеменение.*
Keywords: *sperm, breedinggoats, cryopreservationprotocol, artificialinsemenation.*

Финансирование: *РНФ № 23-26-00157 «Влияние МСК из жировой ткани и костного мозга мелких жвачных животных на качественные показатели их сперматозоидов до и после криоконсервации» (соглашение № 23-26-00157 от 13.01.2023).*

Поступила: 07.10.2023 **Принята к публикации: 17.11.2023**
Опубликована онлайн: 08.12.2023

РЕФЕРАТ. В настоящее время искусственное осеменение, как одна из разновидностей вспомогательных репродуктивных технологий, имеет масштабное использование в молочном и мясном скотоводстве. Чего нельзя сказать о таком перспективном направлении сельскохозяйственной отрасли как козоводство. Одним из сдерживающих факторов является негативное влияние низких температур на морфофункциональные характеристики сперматозоидов козлов -производителей. Целью настоящих исследований явилась апробация протокола криоконсервации спермы козлов-производителей с модификацией предподготовки и проведением последующей оценки качественных показателей спермы до и после ее глубокой заморозки. Была проведена комплексная оценка качества спермы (объем, концентрация, морфология, подвижность) козлов (n=10) по общепринятым методикам и протоколам. Оценка качественных показателей спермы включала в себя пять этапов: после взятия спермы, два часа после охлаждения, после оттаивания: 0 часов, 1 и 2 часа. Исходя из полученных результатов, сперматозоиды козлов-производителей имеют низкую криорезистентность. После криоконсервации (0, 1 и 2 часа после оттаивания) происходит увеличение количества сперматозоидов с повреждением хвоста на 7,5% ($p \leq 0,05$), 15,5% и 21,8% ($p \leq 0,01$), а также снижение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов в 1,4; 1,6 и 2,5 раз ($p \leq 0,01$) по сравнению с результатами оценки 0 часов после взятия. Использование протокола глубокой двухфазовой заморозки спермы позволяет сохранить жизнеспособность сперматозоидов с прогрессивностью движений, равной

54,2±5,1 % и количеством морфологически нормальных сперматозоидов, равным 64,1±1,9%. При этом предподготовка спермы к процессу криоконсервации (текущий протокол) включает в себя центрифугирование (режим:7000 об/мин в течение 15 минут), удаление семенной плазмы, разбавление 1:4 (разбавитель OptiXcell), охлаждение (4 часа при температуре 4℃); протокол криоконсервации спермы: 1. погружение гоблетов с пайетами 4 см над жидким азотом на 7 минут; 2. полное погружение в жидкий азот.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

В настоящее время одной из ведущих, экономически прибыльных отраслей России является сельское хозяйство (данные Росстата, данные группы компаний «РосБизнесКонсалтинг»). Проводя анализ экономической эффективности сельскохозяйственного сектора, нужно отметить, что достаточно перспективным и экономически состоятельным направлением является козоводство. Как известно, козы - полипродуктивные животные, разведение и выращивание которых способствует получению высокоценного молока и ценных сортов сыра (брынза, рокфор, сулугуни и т.д.), диетического мяса, шкур. Кроме того, данный вид животного активно используется при разработке лекарственных препаратов в гуманной медицине (GTCBiotherapeutics, Pharmathene (США)). По данным Росстата, за последние 5 лет объем надоя козьего молока увеличился с 2.8 тыс. т. до 3.9 тыс. т. Вместе с тем, общее поголовье коз на территории России имеет тенденцию к снижению, а именно, в период с 2019 по 2021 годы было зафиксировано уменьшение поголовья данных животных с 1.96 до 1.8 млн голов. Причинами данного сокращения являются отсутствие отечественного генофонда высокоценных козлов-производителей, использование только естественного осеменения, высокая вероятность инбридинга и, как следствие, рождение слабого потомства. В связи с этим актуальным является формирование племенного ядра и организация искусственного осеменения коз с помощью криоконсервации спермы козлов-производителей. Согласно многочисленным исследованиям, технология криоконсервации спермы в значительной степени способствует сохранению генетического материала, увеличивает срок использования спермы и облегчает ее транспортировку, что является экономически выгодным. Однако, принимая во внимание сущность процесса криоконсервации, нужно отметить, что сперматозоиды козлов обладают низкой степенью криорезистентности, что, вероятно, связано с выраженными липидными изменениями в плазматической мембране [1, 5, 6]. Кроме того, проводя анализ результатов научно-практических исследований в области криоконсервации спермы козлов, на сегодняшний день существует достаточно небольшое количество протоколов глубокой заморозки спермы данного вида мелких жвачных животных [6, 8]. В связи с этим, целью настоящих исследований является апробация протокола криоконсервации спермы козлов-производителей с модификацией предподготовки и проведением последующей оценки качественных показателей спермы до и после ее глубокой заморозки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования были проведены в научно-образовательной лаборатории по трансплантации эмбрионов животных на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины». Были проведены взятие и исследование спермы козлов зааненской и чешской пород в возрасте 1-2,5 лет. Всего было взято 10 образцов (n=10). Отбор проб был произведен с помощью искусственной вагины модели IMV (Франция) согласно ГОСТ32222–2013 [3].

Оценка спермы состояла из макро- и микроскопического исследований. При макроскопической оценке проводили исследование объема, запаха и цвета спермы, при микроскопической - определение

концентрации, исследование морфологии и подвижности.

Исследование проводилось с помощью микроскопа Levenhuk MED 45T. Для подсчета концентрации сперматозоидов использовалась камера Горяева [2]. Оценка морфологии и подвижности сперматозоидов проводилась с использованием программы Аргус-CASA. Полученные образцы были разведены в соотношении 1:100. Оценка аликвоты спермы производилась под увеличением 10х10 с использованием камеры Маклера. При оценке подвижности учитывались следующие кинематические параметры подвижности: 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 по Романовскому-Гимзе с предварительной фиксацией мазков (фиксатор: триарилметан, растворенный в метиловом спирте, 7 минут). Экспозиция мазка в красителе составила 20 минут. Далее была проведена микроскопия (увеличение с использованием иммерсионного объектива100х10, иммерсионное масло). Перед криоконсервацией спермы была проведена ее предподготовка, которая включала в себя: центрифугирование (режим: 7000 об/мин в течение 15 минут) [7], разбавление и охлаждение. Так как сперма козлов содержит фермент фосфолипазу А, одним из важных этапов успешного проведения криоконсервации является удаление семенной плазмы [7]. В связи с этим, было проведено центрифугирование спермы с последующим удалением семенной плазмы (12% от общего объема спермы) и добавления разбавителя OptiXcell (IMV, Франция). Состав данной синтетической среды включал в себя сахара, минеральные соли, буфер, антиоксиданты, глицерин, фосфолипиды, антибиотики (гентамицин, тилозин, линкомицин и спектиномицин). Сперму разбавляли в соотношении 1:4 (0,2 мл – сперма, 0,270 мл – разбавитель, 0,530 мл – бидистиллированная вода), далее - охлаждали при температуре + 4°С в течение двух часов для стабилизации взаимодействия между спермой и средой [4, 8]. После чего производили ручную упаковку разбавленной спермы при помощи микропипетки (Minitube) и пайет объемом 0,25 мл при температуре + 4°С. Протокол заморозки образцов спермы состоял из двух этапов: 1 - соломинки помещали в гоблеты и далее - стаканы 4 см над жидким азотом на 7 минут; 2 - полное погружение в жидкий азот для дальнейшего хранения [10].

Оттаивание спермы производилось при температуре +37°С в течение 30 секунд [8]. С целью изучения влияния разбавителя OptiXcell на жизнеспособность сперматозоидов после глубокой заморозки была проведена инкубация и оценка качества спермы при температуре 38°С в течение 2 часов после ее оттаивания [9]. Оценка качественных показателей спермы включала в себя пять этапов: после взятия спермы, два часа после охлаждения, после оттаивания: 0 часов, 1 и 2 часа. Оттаивание с последующей оценкой производили через 7 дней после глубокой заморозки.

Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и Medstatistic «Медицинская Статистика» с вычислением показателей вариационного ряда и t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Согласно результатам комплексной оценки качества, сперма козлов была желтого цвета, имела специфический запах, объем в среднем составлял 0.67±0.07 мл, концентрация – 6.01±7.86 млрд.

Результаты оценки качественных показателей сперматозоидов козлов-производителей до и после криоконсервации отражены на рисунках 1-3, таблице 1.

После разбавления спермы козлов-

производителей синтетической средой OptiXcell в разведении 1: 4 и двухчасового охлаждения были зафиксированы некоторые изменения в морфофункциональной структуре сперматозоидов, в частности - повышение процента прогрессивно двигающихся сперматозоидов на 2,45%, незначительное снижение количества непрогрессивно двигающихся сперматозоидов (без подтверждения статистически значимых различий). При проведении анализа двигательной способности сперматозоидов козлов как на подготовительном этапе к глубокой заморозке, так и после оттаивания, примечательным является самый низкий процент неподвижных сперматозоидов после охлаждения, равный 5,25 %. Можно предположить, что причиной данного явления послужил эффективный состав синтетического разбавителя в аспекте сохранения клеточной мембраны сперматозоидов на этапе охлаждения (2 часа при температуре 4°С).

Результаты морфологической оценки сперматозоидов козлов до и после криоконсервации отражены на рис. 1.

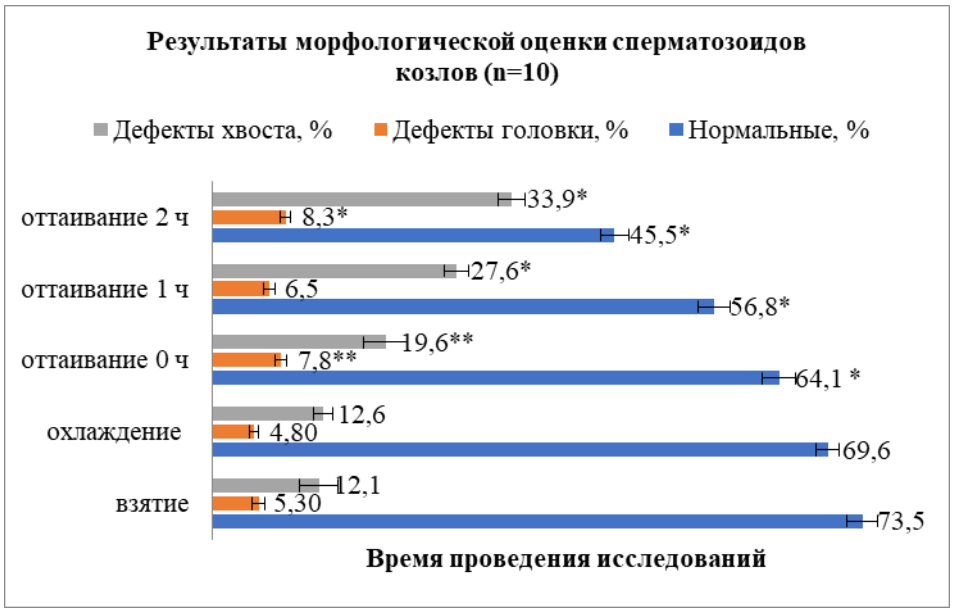

Рисунок 1 – Морфологические показатели сперматозоидов козлов до и после криоконсервации (M±m, n=10).

*Примечание: * - p≤0,01, ** - p≤0,05 (достоверно по сравнению с результатами 0 часов после взятия спермы)*

В ходе анализа морфологических показателей сперматозоидов, достоверные различия были зафиксированы среди количества морфологически нормальных сперматозоидов, а также сперматозоидов с дефектами в структуре головки и хвостовой части. Было установлено закономерное снижение количества морфологически нормальных сперматозоидов после криоконсервации на 9,4; 16,7 и 28 % 0, 1 и 2 часа после оттаивания (p≤0,01) по сравнению с результатами оценки 0 часов после взятия. Наблюдалось статистически значимое увеличение количества сперматозоидов с повреждением головки на 2,5% (p≤0,05) и 3,0% (p≤0,01) 0 и 2 часа после оттаивания, а также количества сперматозоидов с повреждением хвоста на 7,5% (p≤0,05), 15,5% и 21,8% (p≤0,01) 0, 1 и 2 часа после оттаивания, соответственно, по сравнению с результатами оценки 0 часов после взятия. Таким обра-

зом, после криоконсервации спермы наблюдается значительное снижение количества нормальных сперматозоидов и увеличение сперматозоидов с дефектами хвостовой части, что отражается на их двигательной способности (рис.2,3).

Согласно данным рис. 2, достоверное снижение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов было зафиксировано после оттаивания (0,1 и 2 часа) аликвоты спермы в 1,4; 1,6 и 2,5 раз ($p \leq 0,01$), соответственно. Данная тенденция наблюдалась также при анализе количества непрогрессивно двигающихся сперматозоидов, в частности, сокращение их количества в 4,2; 8,5 и 17,6 раз ($p \leq 0,01$), соответственно. После криоконсервации (оттаивание 0, 1 и 2 часа) было зарегистрировано значительное увеличение количества неподвижных сперматозоидов в 4,20; 5,03 и 6,80 ($p \leq 0,01$) раз. Полученные данные подтверждают низкую криорезистентность сперматозоидов козлов-производителей.

Как известно, подвижность сперматозоидов определяется совокупностью кинематических параметров, достоверность которых определяется такими факторами, как глубина счетной камеры, оптимальная скорость передачи кадра, время загрузки, анализа и т.д. Выраженное снижение значений данных показателей отмечалось после оттаивания спермы, при этом достоверные различия были зарегистрированы среди значений VSL (скорость прямолинейного движения головки), VCL (средняя скорость движения сперматозоидов по реальной траектории), VAP (средняя скорость движения головки по усредненной траектории) (рис.3).

Рисунок 2 – Результаты оценки подвижности сперматозоидов козлов до и после криоконсервации (M±m, n=10).

*Примечание: * - p<0,01 (достоверно по сравнению с результатами 0 часов после взятия спермы)*

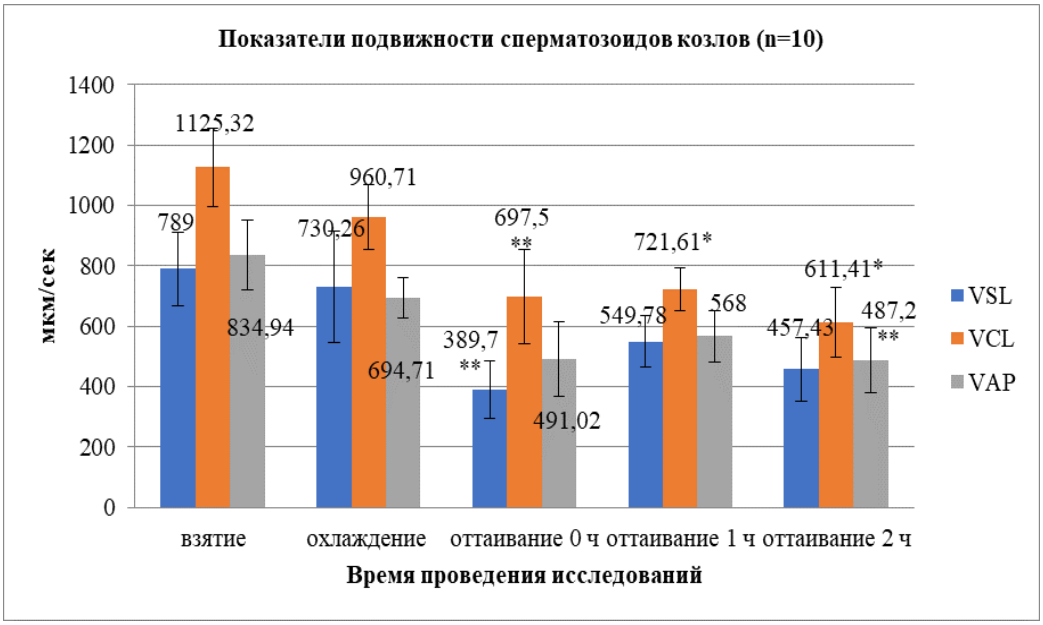

Рисунок 3 – Результаты оценки скорости движения сперматозоидов козлов до и после криоконсервации (M±m, n=10).

*Примечание: * - p<0,01, ** - p≤0,05 (достоверно по сравнению с результатами 0 часов после взятия спермы)*

Так, снижение скорости прямолинейного движения головки отмечалось при оценке аликвоты сразу же после оттаивания, при этом разница значений с данными 0 часов после взятия спермы составила 2,02 раза (p≤0,05). Кроме того, было зафиксировано достоверное снижение средней скорости движения головки сперматозоидов по усредненной траектории в 1,7 раза (p≤0,05) 2 часа после оттаивания по сравнению с результатами 0 часов после взятия. Что касается средней скорости движения сперматозоидов по реальной траектории, то значение данного показателя было достоверно снижено в 1,6 (p≤0,05); 1,5 (p≤0,01) и 1,8 (p≤0,01 раз 0,1 и 2 часа после оттаивания по сравнению с результатами исследований, проведенных после взятия спермы.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Анализ полученных данных позволяет констатировать низкую криорезистентность сперматозоидов козлов-производителей и актуальность усовершенствования существующих протоколов криоконсервации спермы данного вида животных. В частности, после криоконсервации (0, 1 и 2 часа после оттаивания) происходит снижение количества морфологически нормальных сперматозоидов на 9,4; 16,7 и 28 % (p≤0,01) увеличение количества сперматозоидов с повреждением хвоста на 7,5% (p≤0,05), 15,5% и 21,8% (p≤0,01), а также снижение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов в 1,4; 1,6 и 2,5 раз (p≤0,01) по сравнению с результатами оценки 0 часов после взятия.

Исходя из проведенных исследований, использование протокола глубокой двухфазовой заморозки спермы позволяет сохранить жизнеспособность сперматозоидов с прогрессивностью движений, равной 54,2±5,1 % и количеством морфологически нормальных сперматозоидов, равным 64,1±1,9%. При этом, предподготовка спермы к процессу криоконсервации (текущий протокол) включает в себя

центрифугирование спермы (режим:7000 об/мин в течение 15 минут), удаление семенной плазмы, разбавление 1:4 (разбавитель OptiXcell), охлаждение (2 часа при температуре 4℃); протокол криоконсервации спермы: 1. погружение гоблетов с пайетами 4 см над жидким азотом на 7 минут; 2. полное погружение в жидкий азот. Стоит отметить, актуальность разработки наиболее эффективных сред или их составных компонентов с целью повышения эффективности использования криоконсервированной спермы для искусственного осеменения коз.

SPERM QUALITY INDICATORS OF BREEDING GOATS BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION

Korochkina E.A.[1]* – PhD. In Veterinary science, Associate Professor, Department of Genetic and Reproductive Technologies; **Trifonova A.V.**[2] – PhD in biological science, the director of science; **Finageev E.Y.**[1] – PhD. In Veterinary sciences, Assistant, Department of Genetic and Reproductive Technologies; **Glavatskaya D.E.** [1] – student; **Pushkina V.S.**[1] – student.

[1] St. Petersburg state academy of veterinary medicine

[2] LTD CitoGenTest

*e.kora@mail.ru

Financing: *Russian Science Foundation №. 23-26-00157 "The influence of MSCs from adipose tissue and bone marrow of small ruminants on the quality indicators of their sperm before and after cryopreservation" (agreement №. 23-26-00157 dated 01/13/2023).*

ABSTRACT

Currently, artificial insemination, as one of the types of assisted reproductive technologies, is widely used in dairy and beef cattle breeding. The same cannot be said about such a promising direction in the agricultural industry as goat breeding. One of the limiting factors is the negative impact of low temperature on the morphofunctional characteristics of sperm of breeding goats. The purpose of this research was to test a protocol of sperm cryopreservation of stud goats with modification of pre-preparation and subsequent assessment of the quality indicators of sperm before and after its deep freezing. A comprehensive assessment of sperm quality (volume, concentration, morphology, motility) of goats (n=10) was carried out using generally accepted methods and protocols. The assessment of sperm quality indicators included five stages: after sperm collection, two hours after cooling, after thawing: 0 hours, 1 and 2 hours. According on the obtained results, the sperm of breeding goats ha low cryoresistance. After cryopreservation (0, 1 and 2 hours after thawing), there is an increase in the number of sperm with tail damage by 7.5% ($p \leq 0.05$), 15.5% and 21.8% ($p \leq 0.01$), and also a decrease in the number of progressively moving sperm by 1.4; 1.6 and 2.5 times ($p \leq 0.01$) compared with the results of the assessment 0 hours after collection. The use of a deep two-phase sperm freezing protocol allows maintaining the viability of sperm with a progression of movements equal to 54.2±5.1% and a number of morphologically normal sperm equal to 64.1±1.9%. In this case, the pre-preparation of sperm for the cryopreservation process (current protocol) includes sperm centrifugation (mode: 7000 rpm for 15 minutes), removal of seminal plasma, dilution 1:4 (OptiXcell diluent), cooling (4 hours at 4℃); sperm cryopreservation protocol: 1. immersion of goblets with paillettes 4 cm above liquid nitrogen for 7 minutes; 2. complete immersion in liquid nitrogen.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Айбазов, М. М. Качественные показатели спермы козла, сохраняемой при температуре тающего льда / М. М. Айбазов, Т. В. Мамонтова, М. С. Сеитов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2018. – № 3 (71). – С. 200-203.

2. Баженова, Н.Б. Оценка качества спермы животных / Н. Б. Баженова, К.В. Племяшов. – СПб.: «Издательство СПбГАВМ», 2007. – 22 с.

3. ГОСТ 32222–2013.Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. –

Веден 2015-01-27. – М.: Стандарт информ, 2018. – 10 с.
4. Корочкина, Е.А. Качество спермы баранов до и после криоконсервации / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, Д. Е. Главацкая, В. С. Пушкина // Ветеринария. – 2023. – № 8. – С. 34-38.
5. Dorado, J.Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination/J. Dorado, I. Rodríguez, M. Hidalgo// Theriogenology, Vol. 68, Issue 2.-2007.-P. 168-177.
6. Evans, G. Artifical Insemination of Sheep and Goats / G. Evans, W. M. Maxwell, S. Salamon // Butterworth Pty Limited; Tennant Creek, Australia: 1987.
7. Himsikha C. Effect of Centrifugation Regime on Cryopreservation of Beetal Buck Semen / C. Himsikha, S. Sinha, D. Borpujari, B. C. Deka // Indian Journal of Animal Research. – 2023. - 57(2). – P. 178-183.
8. Mook, J.L. Effect of egg yolk level, washing and extended pre-freeze equilibration on postthaw motility of buck semen / Mook, J.L. Wildeus, S. // Southern Section American Society of Animal Science Annual Meeting. Dallas, TX. – 2008.
9. Treulen F. Impactofpostthawsupplementationofsemenextenderwithantioxidantsonthequalityandfunctionvariablesofstallionspermatozoa / F. Treulen, L. Agulia, M.E. Arias, I A. Jofre, R. Felmer // Animal Reproduction Science. - 2019, Vol. 201. - P.71-83.
10. Xu, B. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation / Xu B., Wang R., Wang Z., Liu H. et. al. // Front Vet Sci.-2022. P. 1-11.

REFERENCES

1. Aibazov, M. M. Qualitative indicators of goat sperm stored at the temperature of melting ice / M. M. Aibazov, T. V. Mamontova, M. S. Seitov // News of the Orenburg State Agrarian University. – 2018. – №. 3(71). – P. 200-203.
2. Bazhenova, N.B. Assessing the quality of animal sperm / N.B. Bazhenova, K.V. Plemyashov. – St. Petersburg: "SPbGAVM Publishing House", 2007. – 22 P.
3. GOST 32222–2013. Means of reproduction. Sperm. Sampling methods. – Veden 2015-01-27. – M.: Standard Inform, 2018. – 10 P.
4. Korochkina, E.A. The quality of ram sperm before and after cryopreservation / E. A. Korochkina, E. Yu. Finageev, D. E. Glavatskaya, V. S. Pushkina // Veterinary Medicine. – 2023. – No. 8. – P. 34-38.
5. Dorado, J.Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination/J. Dorado, I. Rodríguez, M. Hidalgo// Theriogenology, Vol. 68, Issue 2.-2007.-P. 168-177.
6. Evans, G. Artifical Insemination of Sheep and Goats / G. Evans, W. M. Maxwell, S. Salamon // Butterworth Pty Limited; Tennant Creek, Australia: 1987.
7. Himsikha C. Effect of Centrifugation Regime on Cryopreservation of Beetal Buck Semen / C. Himsikha, S. Sinha, D. Borpujari, B. C. Deka // Indian Journal of Animal Research. – 2023. - 57(2). – P. 178-183.
8. Mook, J.L. Effect of egg yolk level, washing and extended pre-freeze equilibration on postthaw motility of buck semen / Mook, J.L. Wildeus, S. // Southern Section American Society of Animal Science Annual Meeting. Dallas, TX. – 2008.
9. Treulen F. Impactofpostthawsupplementationofsemenextenderwithantioxidantsonthequalityandfunctionvariablesofstallionspermatozoa / F. Treulen, L. Agulia, M.E. Arias, I A. Jofre, R. Felmer // Animal Reproduction Science. - 2019, Vol. 201. - P.71-83.
10. Xu, B. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation / Xu B., Wang R., Wang Z., Liu H. et. al. // Front Vet Sci.-2022. P. 1-11.