

Разработка технологии длительного хранения спермы +16–+18 °С

Елена Чиботару*, Дарие Григоре**

*Научно-Практический Институт Животноводства и Ветеринарии –
Республика Молдова, Ново-Аненский район, с. Максимовка*

*E-mail: lenuta_mar@yahoo.com, ** darie@mail.ru

Резюме

Целью исследования было исследование препарата PSS, полученного в Институте Микробиологии Академии Наук Республики Молдова, введенного в качестве дополнительного компонента в основную среду для разбавления семенного материала хряка. Полученные экспериментальные данные показали, что введение 7% препарата PSS в основную среду позволило получить положительные результаты качества сохраненного семенного материала при 16–18 °С. После 96 часов инкубации при 16–18 °С подвижность сперматозоидов составила 54,3%.

Впервые была продемонстрирована способность препарата PSS со специфическими и неспецифическими свойствами повышать резистентность консервированных сперматозоидов при 16–18 °С. Изучена средняя скорость сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (VAP), средняя скорость сперматозоидов с колебательными движениями (VSL) и скорость движения сперматозоидов от одной точки к другой (VCL) в процессе сохранения спермы при гипотермических температурах. Предложенная среда для разбавления и сохранения спермы хряка при 16–18 °С, содержит: глюкозу, цитрат натрия, хелатон, сульфат аммония, PSS. Использование предлагаемой среды позволяет более эффективно использовать ценные селекционные качества хряков в системе искусственного осеменения.

Ключевые слова: хряк, сперма, среда, скорость движения, сохранение, гипотермическая температура.

Development of Long-Term Storage Technology for Male Boar Semen at +16–+18 °C.

Elena Cibotaru*, Darie Grigore

*Scientific and Practical Institute of Livestock and Veterinary Medicine – Republic of Moldova,
Novo-Anensk district, Maksimovka village*

*E-mail: lenuta_mar@yahoo.com, darie@mail.ru

Citation: Cibotaru, E., & Grigore, D. (2020). Development of Long-Term Storage Technology for Male Boar Semen at +16–+18 °C. *Zhivotnovadni Nauki*, 57(1), 49-54 (Bg).

Abstract

The our aim of the research was to test the PSS preparation obtained by the Institute of Microbiology of the Sciens Academy from Moldova used as an additional component in dilution medium for boars material semen. The positive results of the research obtained prove us that when we use the PSS

preparation in the dilution medium as an additional component with a concentration of 7%, we obtained a good results in conservation of material semen to the 16–18 °C after 96 hours of conservation with the mobility of the spermatozoons was 54,3%.

For the first time the capacity of PSS preparation was proved the specific and nonspecific ability to grow the resistance of conservation at 16–18 °C. It was studied the speed of movement of the spermatozoons during the concervationof the hypotermale temperature. It propose the dilution medium and conservation to the boar sperm at the 16–18 °C of temperature and that contain: glucose, sodium citrate, helaton, amonium sulphate and PSS. To applying this medium allows to use more efficient the value of boars in the reproduction and in the artificial insemination.

Key words: the boar, sperm, dilution medium, speed of movement, conservation, hypotermal tempreture.

Введение

Одним из важных технологических вопросов в свиноводстве является улучшение воспроизводства стада при использовании искусственного осеменения. Предприятие по производству свинины с целью исключения инбридинга и для улучшения селекционно-племенной работы вместо традиционного завоза хряков используют свежую или транспортированную в охлажденном состоянии сперму выдающихся хряков.

Одной из актуальных проблем зоотехнической науки является повышение эффективности воспроизводства стада путем максимального использования высокоценных производителей, что имеет большое значение для обеспечения дальнейшего прогресса в животноводстве. Важное направление улучшения племенных и продуктивных качеств животных это применение метода искусственного осеменения. Одним из определяющих факторов результативности искусственного осеменения является совершенствование методов по консервации и хранению спермы (Ershina, 2011).

Актуальной проблемой является также и особенности сперматозоидов хряка при их хранении вне организма которые реагируют на термодинамические процессы, а следовательно, на формировании защитных реакций и адаптивных свойств (Narizhny, 2001).

В связи с этим перспективна разработка более эффективной среды для краткосроч-

ного хранения спермы хряков с применением биологически активных веществ и других криопротекторов.

Скорость движения сперматозоидов характерный признак всех видов животных и оценка делается разными методами. Установлено, что подвижность сперматозоидов нормальная, если они проходят поля зрения счетной камеры 0,06 мл за 0,9 секунд. Отклонение от нормальных форм движения сперматозоидов часто встречаются и это зависит от влияния разных факторов, таких как функционального или морфологического характера. (Zăhan, 2017). Как отмечает автор, оценка подвижности сперматозоидов компьютерными программами считаются более современной и более эффективной по сравнению с традиционными методами оценка качества спермы. Компьютерная оценка подвижности сперматозоидов была использована при исследовании спермы хряков (Holt et. al., 1977), баранов (Martiner and Maswell, 1999), жеребцов (Kovaket al, 2008).

Однако наиболее важные биологические свойства сперматозоидов, а именно скорость продвижения сперматозоидов остаются актуальными. Вот почему при детальном изучение качества разбавителей наряду с исследованием методом биоконтроля, должен применяться и более функциональные методы проверки действия испытуемых разбавителей на биологические свойства сперматозоидов, таких как скорость их движения который коррелирует с оплодотворяющей способностью.

Материал и методы исследований

В своих исследованиях мы взяли за основу ГХЦС среду. Необходимо было выявить оптимальную концентрацию препарата PSS вводимого как дополнительный компонент в основную среду и продолжительный выдержки спермы при 16–18 °С, а также определить физическое состояние половых клеток в этих условиях хранения.

Исследование провели на полученную сперму хряков породы Ландрас. После глазомерной оценки каждый эякулят делили на 11 частей и разбавляли средой ГХЦС, содержащей от 1 до 10% препарата PSS, разработанного институтом Микробиологии и Биотехнологии Академии Наук Республики Молдова. Разбавленную сперму сохраняли при температуре 16–18 °С. Подвижность сперматозоидов определяли через каждые 24 часа.

Данные показатели определяли с помощью программой CEROS.

- VAP – измерение общие пути проеденный сперматозоидов за определенный отрезок времени.

- VSL – прямолинейный путь пройденный сперматозоидам с одной до другой за определенный период наблюдения.

- VCL – общий путь пройденный головкой сперматозоида за период наблюдение.

Результаты исследований

В эксперименте проверялось влияние препарата PSS на биологические свойства сперматозоидов в процессе их хранения при 16–18 °С.

Данные по изучению действие препарата PSS вводимый как дополнительный компонент в состав основной среды представлены в таблица 1.

Результаты исследований показывают, что препарат PSS, вводимый в основную сре-

Таблица 1. Подвижность сперматозоидов в зависимости от концентрации препарата, %

Table 1. Mobility of spermatozoa depending on the concentration of the drug, %

PSS %	1 дней / days		2 дней / days		3 дней / days		4 дней / days	
	Подвижность, % / Mobility, %	Прямолинейно-поступательные движения, % / Straightline artranslational, %	Подвижность, % / Mobility, %	Прямолинейно-поступательные движения, % / Straightline artranslational, %	Подвижность, % / Mobility, %	Прямолинейно-поступательные движения, % / Straightline artranslational, %	Подвижность, % / Mobility, %	Прямолинейно-поступательные движения, % / Straightline artranslational, %
1	84,5 ± 5,5	42,8 ± 7,9	75,0 ± 2,8	29,8 ± 2,4	73,3 ± 10,3	28,8 ± 7,3	45,3 ± 18,5	14,8 ± 6,7
2	87,0 ± 5,6	45,0 ± 6,1	79,3 ± 8,7	36,0 ± 8,9	66,0 ± 9,0	22,5 ± 6,1	49,8 ± 17,6	16,5 ± 6,0
3	85,8 ± 5,1	44,3 ± 6,4	81,0 ± 6,1	33,5 ± 5,8	71,3 ± 9,7	27,3 ± 7,1	33,3 ± 20,0	10,5 ± 6,5
4	83,8 ± 6,0	41,5 ± 4,9	78,8 ± 7,1	32,3 ± 6,2	70,0 ± 9,0	24,5 ± 4,3	39,0 ± 19,2	14,8 ± 8,2
5	89,3 ± 3,3	45,5 ± 3,0	78,8 ± 8,8	35,8 ± 6,8	73,5 ± 8,9	29,8 ± 6,2	44,3 ± 20,6	16,0 ± 8,4
6	87,3 ± 1,7	43,0 ± 1,9	73,0 ± 7,6	34,5 ± 4,9	73,3 ± 9,7	31,5 ± 6,0	52,5 ± 18,6	20,0 ± 7,8
7	85,3 ± 3,2	47,0 ± 4,6	81,5 ± 3,0	37,5 ± 1,2	77,0 ± 9,1	32,0 ± 6,4	54,3 ± 15,4	18,3 ± 7,4
8	83,0 ± 3,5	39,8 ± 5,5	78,3 ± 6,8	38,8 ± 4,6	62,5 ± 10,7	21,3 ± 7,1	23,8 ± 18,5	9,8 ± 7,3
9	92,3 ± 1,7	47,8 ± 1,7	78,0 ± 9,7	27,8 ± 6,4	73,3 ± 8,9	31,3 ± 6,2	45,3 ± 10,4	12,3 ± 4,8
10	86,8 ± 2,4	41,8 ± 4,4	78,3 ± 8,5	33,3 ± 7,7	64,5 ± 8,9	25,3 ± 5,6	41,3 ± 16,3	14,3 ± 6,3

ду (ГХЦС), не является токсичным для сперматозоидов в пределах изучаемых концентраций. Подвижность сперматозоидов после разбавления во все исследованные среды соответствовал в среднем от 83,0% когда в среду вводили 8% препарата PSS и 92,3% когда в среду добавляли 9%.

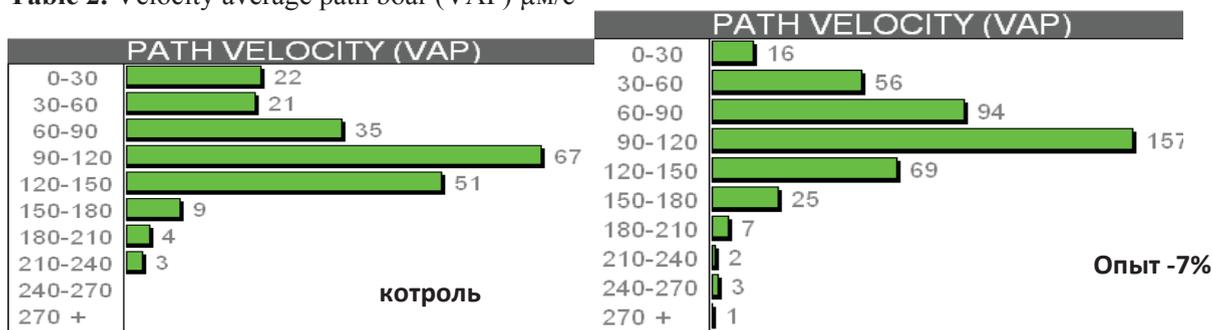
В процессе хранения спермы при 16–18 °С подвижность сперматозоидов изменялась. Лучшие результаты по подвижности были получены, когда в основную среду вводили 7% препарата PSS. После 96 часов хранения спермы, подвижность составила 54,3%. Аналогичные изменения происходили и с количеством сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением. Если сразу после разбавления количество сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением была в среднем 40% во всех испытываемых средах, то в процессе хранения разбавленной спермы этот показатель сокращался. Результаты были полу-

чены выше когда в основную среду вводили 7% препарата PSS. Через 96 часов хранения количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в этом препарате составило 18,3%.

При измерении скорости движения сперматозоидов, программа CEROS определяла среднюю дистанцию, пройденную сперматозоидами за определенный отрезок времени – VAP. Показатели по измерению VAP представлены в таблице 2.

Представленные данные в таблице 2 показывают, что общий путь, пройденный сперматозоидом за определенный отрезок времени сразу после разбавления спермы во всех испытываемых средах практически не изменился, а в процессе исследований по определению качества спермы немного изменился. Наиболее высокие результаты были получены тогда, когда в состав основного разбавителя вводили 7% препарата PSS. Общий путь пройденных сперматозоидов после 96

Таблица 2. Средняя скорость движения сперматозоидов хряка (VAP), $\mu\text{m}/\text{c}$
Table 2. Velocity average path boar (VAP) $\mu\text{m}/\text{c}$



Концентрация PSS / Concentration of PSS	24 h	48 h	72 h	96 h
1	98,1 ± 1,5	85,1 ± 7,6	72,1 ± 7,6	47,7 ± 16,7
2	108,7 ± 9,5	89,8 ± 9,2	74,4 ± 10,0	54,3 ± 18,5
3	95,6 ± 7,1	83,2 ± 12,7	79,3 ± 8,8	29,3 ± 17,2
4	90,0 ± 3,2	81,7 ± 8,2	77,8 ± 11,7	45,5 ± 17,2
5	104,6 ± 9,1	76,1 ± 9,0	77,2 ± 9,7	50,2 ± 17,6
6	98,7 ± 1,6	82,3 ± 4,1	82,6 ± 7,2	49,0 ± 16,9
7	96,8 ± 5,4	80,0 ± 6,0	85,4 ± 12,6	65,2 ± 11,9
8	94,8 ± 5,8	85,4 ± 6,1	67,9 ± 10,6	34,1 ± 19,7
9	99,0 ± 6,6	76,3 ± 9,1	85,3 ± 8,2	55,2 ± 12,0
10	97,1 ± 2,6	79,4 ± 10,8	70,4 ± 7,4	47,9 ± 16,1

часов хранение спермы составил $65,2 \pm 11,9$ $\mu\text{m}/\text{s}$.

При измерении скорости движения сперматозоидов программой CEROS, измеряется и прямолинейный путь пройденных сперматозоидами с одной точки до другой за определенный период наблюдения. Это самый низкий цифровой показатель по сравнению с остальными измерениями, которые проводит программа CEROS.

Данные представлены в таблице 3.

Измеряя прямолинейный путь, пройденный сперматозоидами с одной точки до другой за определенное время, установили, что как и при изучении средней скорости движения сперматозоидов лучшие результаты получены когда в основную среду водили 7% препарата PSS. Через 96 часов хранения спермы при 16–18 °C скорость движения сперматозоидов составила $33,8 \pm 5,5$ $\mu\text{m}/\text{s}$.

Данные по изучению общего пути пройденного головка сперматозоида VCL за период наблюдения представлены в таблице 4.

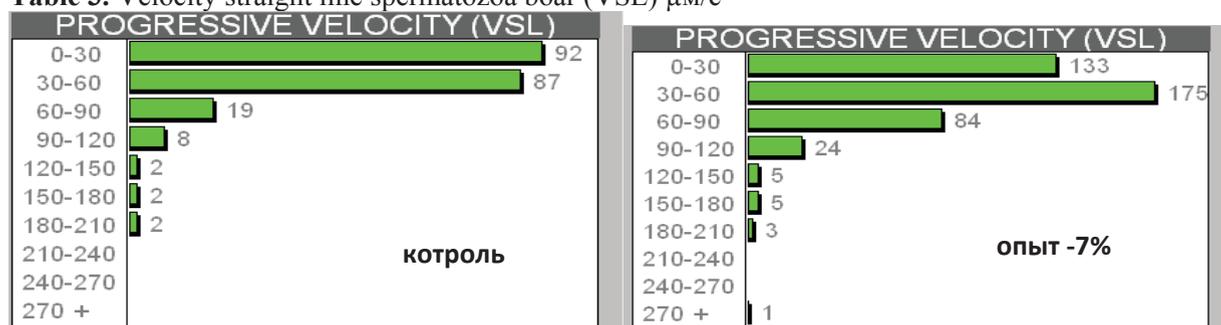
Полученные данные показывают, что это самый большой цифровой показатель по сравнению с остальными измерениями. Также было установлено как и в двух выше описанных исследованиях, что лучшие результаты получали тогда, когда в основной разбавитель включали 7% препарата PSS. Общий путь, пройденный сперматозоидами в этой варианте опыта, составил $115,2 \pm 22,2$ $\mu\text{m}/\text{s}$.

Не смотря на то что, программа CEROS проводит множество исследований по определению качества спермы, в последнее время в литературе возникают споры насчет того, могут ли показатели CEROS быть использованы для прогнозирования оплодотворяющей способности сперматозоидов.

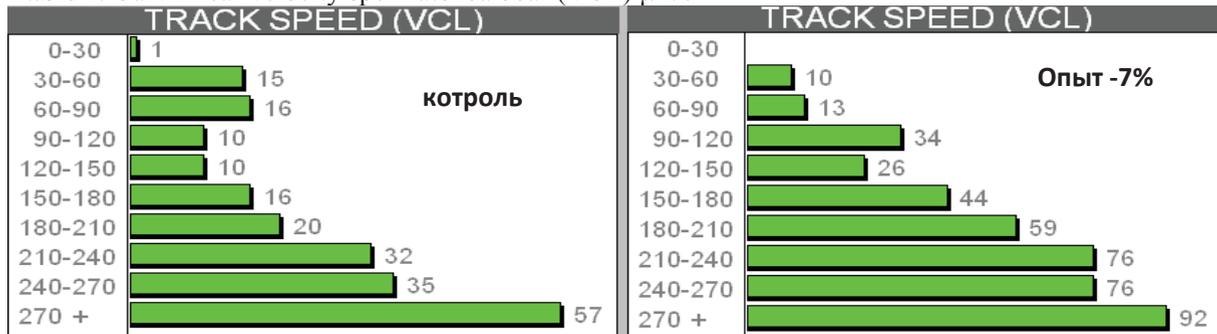
Выводы

Впервые изучена возможность использование препарата PSS, вещество со специфическими и неспецифическими действиями

Таблица 3. Прямолинейно-поступательное движение сперматозоидов хряка (VSL), $\mu\text{m}/\text{s}$
Table 3. Velocity straight line spermatozoa boar (VSL) $\mu\text{m}/\text{s}$



Концентрация PSS / Concentration of PSS	24 h	48 h	72 h	96 h
1	$51,4 \pm 3,7$	$44,6 \pm 6,5$	$36,6 \pm 3,8$	$33,5 \pm 15,3$
2	$59,1 \pm 6,1$	$48,0 \pm 5,7$	$37,8 \pm 5,7$	$27,9 \pm 9,5$
3	$50,4 \pm 6,0$	$44,5 \pm 5,1$	$39,9 \pm 5,5$	$15,7 \pm 9,3$
4	$47,6 \pm 2,9$	$43,0 \pm 4,2$	$37,6 \pm 4,0$	$25,0 \pm 9,1$
5	$56,2 \pm 4,0$	$41,7 \pm 4,1$	$40,9 \pm 4,9$	$25,6 \pm 9,3$
6	$53,7 \pm 0,5$	$44,4 \pm 1,7$	$41,3 \pm 3,8$	$26,4 \pm 9,1$
7	$52,5 \pm 1,9$	$44,5 \pm 2,3$	$44,7 \pm 6,2$	$33,8 \pm 5,5$
8	$52,4 \pm 2,9$	$48,3 \pm 2,7$	$36,0 \pm 6,3$	$18,4 \pm 10,6$
9	$54,5 \pm 2,6$	$41,8 \pm 3,3$	$43,2 \pm 2,8$	$29,3 \pm 3,7$
10	$51,6 \pm 2,8$	$42,8 \pm 5,5$	$36,8 \pm 3,4$	$25,4 \pm 8,7$

Таблица 4. Общият път, пройденный сперматозоидами (VCL), $\mu\text{m}/\text{s}$ **Table 4.** Curvilinear velocity spermatozoa boar (VCL) $\mu\text{m}/\text{s}$ 

Концентрация PSS / Concentration of PSS	24 h	48 h	72 h	96 h
1	186,1 ± 8,1	150,1 ± 10,1	115,4 ± 32,1	82,7 ± 28,5
2	191,2 ± 10,5	159,3 ± 15,3	131,7 ± 17,1	96,7 ± 32,4
3	178,8 ± 10,9	147,2 ± 23,1	139,8 ± 14,4	52,3 ± 30,2
4	167,2 ± 10,9	144,2 ± 15,3	143,8 ± 18,8	84,9 ± 30,3
5	191,3 ± 12,6	138,1 ± 14,2	139,3 ± 15,5	87,1 ± 30,7
6	179,7 ± 7,1	148,0 ± 12,3	155,9 ± 14,9	85,8 ± 28,9
7	185,9 ± 13,8	144,6 ± 12,6	155,6 ± 21,0	115,2 ± 22,2
8	176,8 ± 8,6	152,8 ± 10,5	123,2 ± 18,3	57,0 ± 32,9
9	187,4 ± 10,9	134,9 ± 18,7	157,6 ± 15,3	97,7 ± 20,3
10	179,2 ± 6,6	145,8 ± 20,5	131,1 ± 12,3	83,6 ± 28,1

для повышения биологических способностей сперматозоидов, вводимого как дополнительного компонента в состав ГХЦС среды.

Литература

Arhipovets, A. I. (1970). Sperm production of boars of large white breed, depending on the growth. *Physiology and biochemistry of farm animals*. Kiev. 1970. Issue 12, p. 32-37. (RU)

Epishina, T. M. (2007). Perfection of ways to increase the reproductive qualities of pigs and sheep. 06.02.07. The dissertation author's abstract on competition of a scientific degree of the doctor of biological sciences. Moscow. (RU).

Holt, W. V., & North, R. D. (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *Reproduction*, 91(2), 451-461. (RO)

Kavak, A., Johannisson, A., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., Aidnik, M., & Einarsson, S. (2003). Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal reproduction science*, 76(3-4), 205-216. (RO)

Kovar, A., Johannisson, A., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., Aidnik, M., & Einarsson, S. (2003). (RO)

Mortimer, S. T., & Maxwell, W. M. C. (1999). Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(1), 25-30. (RO)

Narizhny, A. T. (2001) Experience in the long-distance transportation and use of frozen boar seed. Genetics, selection and reproduction. *Agricultural animals*. 2001-issue 1, p. 170-174. (RU)