

Н. В. Плешанов, О. И. Станишевская

Криоустойчивость спермы петухов в зависимости от содержания в ней липидов

Аннотация. В статье приводятся результаты исследований по степени криоустойчивости спермы петухов в зависимости от содержания в ней липидов (триглицеридов); рассматривается индивидуальная и межпородная изменчивость этих показателей.

Ключевые слова: птицеводство, искусственное осеменение, сперма, липиды, криоконсервация.

Авторы:

Плешанов Н. В. — аспирант отдела генетики и разведения с.-х. птиц ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601; e-mail: klaus-90@list.ru;

Станишевская О. И. — доктор биологических наук, зав. отделом генетики и разведения с.-х. птиц ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601; e-mail:olgastan@list.ru.

Введение.

Сохранение генетического разнообразия сельскохозяйственной птицы — одна из важнейших задач птицеводства на современном этапе его развития. Перевод птицеводства на промышленную основу с использованием ограниченного числа специализированных пород и линий для производства яиц и мяса птицы стал причиной резкого сокращения пород и породных групп мясо — яичного и яично-мясного направления продуктивности птицы, или ранее созданных путем межпородного скрещивания, а также местных популяций и декоративных пород. Сократилась не только численность, но и прекратилась племенная работа с ними, несмотря на то, что многие породы представляют определенную ценность по ряду хозяйственно — полезных признаков, которые могут быть использованы в селекции в будущем (повышенная жизнеспособность и резистентность к различным заболеваниям, крепость костяка и др.) [1, 2].

Поддержание генетического разнообразия сельскохозяйственной птицы находится под угрозой не только в России. Эта проблема мирового масштаба. Достаточно сказать, что за последние 100 лет, по данным FAO [3], только в Европе исчезло 39 пород птиц, а 481 порода находится в состоянии риска исчезновения.

Консервация *ex situ* является важным механизмом, чтобы избежать необратимых потерь пород и генов, как для воссоздания породы, так и для страхования ресурсов от санитарных катастроф, для поддержания разведения в малых популяциях и для сохранения генетического разнообразия (генов, свойств, пород) в селекционных программах. *Ex situ* консервация может быть проведена

посредством сохранения в живом виде (в малочисленных генофондных популяциях) и путем криоконсервации (в жидком азоте) [2].

На сегодняшний день замороженную сперму местных пород сохраняют только в некоторых странах Азии и Европы. Сохранение *in vitro* местных пород и недавно созданных мясо-яичных пород и линий, использование которых приостановлено, должно получить высокий приоритет в мире. Распространение в 2005/2006 гг. высоко патогенного птичьего гриппа (H5N1) показывает пример угрозы, которой во всем мире подвергаются виды с высокой плотностью содержания.

Для того, чтобы защитить генетическое разнообразие от непредвиденных угроз, необходимо, чтобы страны имели свои собственные или паевые генобанки, содержащие материал местных пород и линий. Потребность в координации между странами диктуется необходимостью сохранения трансграничных пород [2, 3, 4].

Консервация *in vitro* является важным дополнением к сохранению *in vivo*, или в некоторых случаях может представлять единственный способ сохранения породы.

При криоконсервации генетических ресурсов в птицеводстве возможно практическое использование лишь мужских зрелых половых клеток (сперматозоидов), так как методы криоконсервации половых зародышевых клеток, сперматогоний находятся в стадии разработки, а криоконсервация яйцеклеток проблематична. Поэтому изучение биологических механизмов, обуславливающих результативность осеменения при использовании деконсервированной спермы, является актуальным [3, 5].

История криоконсервации спермы насчитывает почти 100 лет, но лишь в 1941 году Shaffner и др.

удалось получить оплодотворенные яйца кур от замороженной спермы, при этом цыплят получено не было.

Толчком к развитию методов криоконсервации спермы послужило создание в 1949 году Polge et al первого разбавителя, содержащего криопротектор. Дальнейшие многочисленные исследования Lake, Stewart (1978), Sexton (1980) позволили разработать методы криоконсервации спермы петухов, а затем и индюков, селезней, гусаков и цесарей. Однако, широкого практического применения в то время криоконсервация не имела.

Новая волна интереса к методам криоконсервации спермы домашних птиц возникла в 1992 г. в связи с ратификацией международного соглашения по сохранению генетических ресурсов (Рио-де-Жанейро, Бразилия), предусматривающего, в том числе, и создание криобанков в Европе и Северной Америке.

В связи с этим возникает необходимость научно-обоснованного расчета норм сохранения биологического материала (доз спермы) того или иного вида птицы или породы [2, 3, 5].

Число сохраняемых доз спермы является функцией числа доз, необходимых для получения 1 потомка, ожидаемой продолжительности продуктивной жизни повторно оплодотворяемых плодовых самок, и числа самок и самцов, желательного для восстановления популяции. Для получения животных, несущих 95% генов породы, сохраняемой в виде замороженного семени, необходимо 5 поколений возвратных скрещиваний.

Должно сохраняться достаточное количество семени для того, чтобы обеспечить требуемое число поколений возвратных скрещиваний. У птиц самки несут ZW гетерохромосомы (самцы ZZ), поэтому гены, локализованные в W- хромосоме, не могут быть переданы стандартной процедурой криосохранения семени. Не смотря на эти ограничения, метод следует рассматривать, как основной в сохранении генетических ресурсов птиц из-за доступности этой перспективной и надежной технологии и легкости ее применения [3, 5].

Определенным препятствием на пути сохранения генетических ресурсов методом криоконсервации спермы является значительная индивидуальная и межпородная изменчивость криоустойчивости семени. Результаты искусственного осеменения криоконсервированной спермой существенно варьируют между породами и внутри пород в пределах 10–90% [3,6]. Этот факт следует учитывать при расчете доз, закладываемых на хранение, особенно, если речь идет об индивидуальных эякулятах, при использовании которых показатели

оплодотворенности ниже даже при применении свежеполученной спермы [2,5,7,8].

Различия в криотолерантности в значительной степени генетически обусловлены, хотя, вероятно, не следует сбрасывать со счетов и такие факторы, как возраст самцов и кормление (содержание в рационе липидов, их жирнокислотный состав, наличие антиоксидантов и пр.), поскольку установлено их влияние на биохимические показатели свежеполученной спермы и ее оплодотворяющую способность, что, в свою очередь, является важным критерием пригодности к криоконсервации [5,7,9].

Проблема прогнозирования криоустойчивости эякулятов актуальна не только в птицеводстве. Над ее решением работают специалисты в области разведения других видов сельскохозяйственных животных и даже в области репродукции человека, поскольку необходимо оптимизировать затраты и финансовые расходы на криоконсервацию. Разработано большое число тестов по реакции спермы на температурный шок, на изменение осмотического давления и пр. [10,11]. Однако ни один из них не дает уверенного прогноза.

Единственное, в чем сходятся мнения всех исследователей, причиной потери оплодотворяющей способности спермы после глубокого замораживания и оттаивания является комплекс физиологических и биохимических изменений, связанных с нарушением мембранной структуры спермиев. Наиболее повреждаемыми элементами являются цитоплазматическая мембрана, мембрана митохондрий и акросома спермиев [5, 6, 12].

Относительно специфики метаболизма спермы самцов птиц и его изменений при глубоком замораживании в литературе имеются ограниченные сведения. Распространение же закономерностей, свойственных сперме млекопитающих, на сперму птиц вряд ли допустимо, так как строение воспроизводительных органов, сперматогенез и структура спермиев самцов птиц имеет ряд отличительных особенностей [12]. В частности, птичий сперматозоид – это клетка, которая содержит очень мало цитоплазмы, и имеет, пропорционально, очень большую поверхность цитоплазматической мембраны. Он содержит, также, значительное число митохондрий, число которых варьируется от 20 до 60 [5].

Регрессивное развитие придатка семенника у птиц и отсутствие добавочных половых желез привело к преимущественному сосредоточению липидов в самих спермиях [9, 13]. Содержание липидов в различных эякулятах составляет от 75 до 289 мг% [13].

По мнению Blesbois [5], среди прочих факторов, влияющих на поведение мембран спермиев птиц при процедуре «замораживание-оттаивание», основными являются содержание липидов и их состав, в частности, соотношение холестерин/фосфолипиды. Не следует также забывать, что липиды семени являются не только структурными элементами, но и одним из источников их энергии движения.

Для семени петуха свойственны как дыхание, так и гликолиз. Сперматозоиды петуха могут расходовать при дыхании липиды — до 30% от начального уровня за 1 час при $t^0 = 38^{\circ}\text{C}$. Между начальным содержанием липидов в сперме и ее оплодотворяющей способностью найдена положительная связь ($r = +0,53$). Уровень расхода липидов связан с оплодотворяющей способностью семени отрицательной зависимостью ($r = -0,44$) [14].

Таким образом, с определенной степенью уверенности можно утверждать, что изменчивость в содержании липидов в сперме и их состав являются причинами индивидуальных и межпородных различий в криотолерантности эякулятов птиц.

Цель наших поисковых исследований — оценить степень влияния содержания липидов (триглицеридов) в сперме петухов на криоустойчивость индивидуальных эякулятов с учетом породной принадлежности для разработки методов прогнозирования оплодотворяющей способности деконсервированной спермы и расчета числа необходимых доз при создании криобанка для сохранения генетических ресурсов птиц.

Условия, материалы и методы исследований.

Опыт проведен на петухах в возрасте 34 недель жизни следующих пород: Пушкинская ($n = 6$), Род айланд красный ($n = 5$), Брама светлая ($n = 5$), Кохинхин голубой ($n = 5$), Китайская шелковая ($n = 3$) и на курах породы Род айланд красный ($n = 45$) по следующей схеме (рис.1).

Определение триглицеридов в свежеполученной сперме проведено с помощью диагностических наборов ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» энзиматическим колориметрическим методом.

Криоконсервация и деконсервация спермы петухов, а также искусственное осеменение кур проведены по методике, изложенной в книге К. В. Целютина и Б. К. Тура [15].

Анализ и обсуждение результатов. Отмечена большая **индивидуальная изменчивость** во всех породах по:

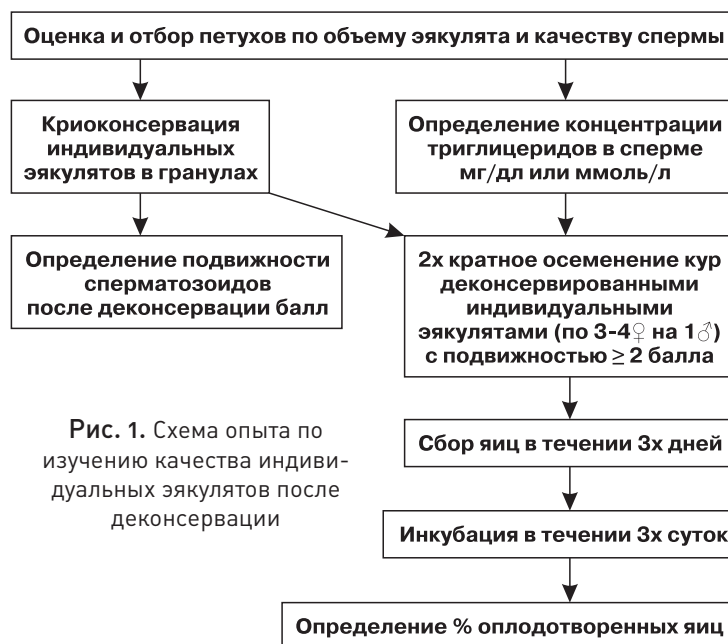


Рис. 1. Схема опыта по изучению качества индивидуальных эякулятов после деконсервации

- содержанию триглицеридов в сперме петухов от 1,92 до 14,9 мг/дл. Коэффициент изменчивости в среднем составил 46,6%
- активности сперматозоидов после деконсервации (от 1 до 8 баллов)
- оплодотворенности яиц спермой петухов — от 0 до 100%.

При этом **межпородные различия** по содержанию триглицеридов в сперме были не столь значительны и не достигали уровня достоверных статистических различий.

Для осеменения была отобрана сперма 17 петухов с подвижностью после деконсервации ≥ 2 балла, (средний балл по активности был на уровне 3,66). Оплодотворенность яиц — 45,5%.

Выявлены межпородные различия по активности сперматозоидов после деконсервации. Лучшие показатели — у петухов пород Пушкинская и Брама (5,0 и 3,85 балл). Самые низкие — у петухов пород Китайская шелковая и Кохинхин голубой (1,7 и 1,2 балла), при среднем по всем изученным породам — 3,10 балла.

Процент оплодотворенных яиц по породам различается значительно — от 16,6% (от петухов породы Китайская шелковая), до 65-75% (от петухов пород Пушкинская и Кохинхин голубой) (табл. 1). Между содержанием триглицеридов в свежеполученной сперме, подвижностью сперматозоидов после деконсервации и оплодотворяющей способностью спермы существует криволинейная связь, некий оптимум, когда показатели качества спермы наилучшие.

Отбор петухов с оптимальным содержанием триглицеридов в сперме на уровне 5,0–9,9 мг/дл

Таблица 1. Показатели качества индивидуальных эякулятов и оплодотворенности яиц с учетом породной принадлежности

Порода	Возраст петухов нед.	Число петухов	Содержание триглицеридов в сперме мг/дл	Активность сперматозоидов после деконсервации балл.	Получено яиц шт.	% оплодотворенных яиц
Брама*	34	5 3	7,6 ± 1,3 7,3	3,85 5,6	11	45,4
Китайская Шелковая*	34	3 1	10,1 ± 8,2 12,5	1,7 2	6	16,6
Кохинхин*	34	5 1	6,4 ± 1,9 7,2	1,2 2,5	3	75
Пушкинская*	34	5 4	9,0 ± 2,4 10,4	5 5,87	15	20
Род-айланд*	34	5 3	7,2 ± 3,0 9,6	2,85 3,91	21	57,1

*в том числе для использования в осеменении

Таблица 2. Влияние концентрации триглицеридов в свежеполученной сперме на показатели качества спермы после деконсервации

Показатели	Концентрация триглицеридов в свежеполученной сперме (мг/дл)		
	≤ 4,9	5,0 – 9,9	≥ 10,0
	≤ M±0,67 σ	M±0,67 σ	≥ M±0,67 σ
Число петухов	9	14	9
Подвижность, балл	1,58 ^a ±0,26	4,2 ^{dc} ±0,61	2,91 ^c ±0,53
% петухов с рекомендуемой подвижностью спермы ≥ 4 балла	0	60	9
% оплодотворенных яиц	35,7	60,0	35,2

(M±0,67 σ) для целей криоконсервации позволяет получить показатели оплодотворенности яиц в среднем 60 % (табл. 2); из них 70% петухов будут иметь значительно более высокие показатели от 66 до 100% оплодотворенных яиц (табл. 2).

Заключение. Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о значительных индивидуальных и межпородных различиях в криорезистентности спермы петухов: активности сперматозоидов после деконсервации и оплодотворяю-

щей способности деконсервированной спермы. Этот факт следует учитывать при расчете доз спермы, закладываемой в генофондное хранилище от той или иной породы.

Наилучшие показатели оплодотворенности яиц при использовании индивидуальных деконсервированных эякулятов получены от петухов, сперма которых содержала липиды (триглицериды) на уровне 5,0–9,9 мг/дл (M±0,67 σ). Вероятно, этот уровень и является оптимальным.

Литература

1. Криоконсервация мужских половых клеток как метод сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы / В. И. Фисинин [и др.] // Достижения науки и техники АПК. — 2012. — № 8. — С. 65–68.
2. Тагиров М. Т., Артеменко А. Б., Терещенко А. В. Сохранение генофонда птиц путем криоконсервации / М. Т. Тагиров, А. Б. Артеменко, А. В. Терещенко. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://tagirov-m.narod.ru/Geenpool.htm>
3. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства М.: Ф.А.О. ВИЖ РАСХН пер. с английского, 2010. 513 с.
4. Barna J. Commercial poultry production and conservation techniques on old, local poultry breeds in Hungary / Barna J., Patakiné Vörkonyi E., et al. // Proceedings of the XXVI International Poultry Symposium PB WPSA. / Poland, 2014. P. 20.
5. Blesbois E. Current status in avian semen cryopreservation // World's Poultry Science Journal. — 2007. — Vol. 63, № 2. — P. 213–222.
6. Мороз Л. Г. Исследование механизмов неодинаковой устойчивости спермы хряков к замораживанию / Л. Г. Мороз, И. Ш. Шапиев, Н. В. Корбан // Криоконсервация гамет и эмбрионов. Сборник научных трудов ВНИИГРЖ: сб. научн. тр. / Л, 1983. С 48–54.

7. Bellagamba F. Cryopreservation of poultry semen: a review / F. Bellagamba, S. Cerolini, L.G. Cavallini // *World's Poultry Science Journal*. — 1993. Vol. 49, № 2. — P. 157–166.
8. Schramm G.-P. Effect of deep freezing preservation of cock semen on fertility, hatchability and egg production traits in chickens / Schramm G.-P. // *Proceedings of the 11th European Poultry Conference Germany*. / Bremen, 2012. P. 82–83.
9. Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review / S. Cerolini [et al.] // *World's Poultry Science Journal*. — 2003. Vol. 59, № 1. — P. 65–75.
10. Корбан Н. В. Технологические приемы, повышающие эффективность метода криоконсервации спермы хряков / Н. В. Корбан, В. М. Прокопцев, Р. М. Рустенова и др. Криоконсервация гамет и эмбрионов. Сборник научных трудов ВНИИГРЖ: сб. научн. тр. / Л, 1983. С 30–48.
11. Корнев В. И., Калинина Е. А, Лукин В. А. Криоконсервация сперматозоидов человека / В. И. Корнев, Е. А. Калинина, В. А. Лукин. [Электронный ресурс] // Русский медицинский сервер. Журнал «Проблемы репродукции». — 2000. — № 1. — Режим доступа: <http://www.rusmedserv.com/problreprod/2000g/1/>
12. Воронина М. С. Изменение некоторые биохимических показателей спермы петухов при криоконсервации / М. С. Воронина // Криоконсервация гамет и эмбрионов сельскохозяйственных животных. Сборник научных трудов ВНИИГРЖ: сб. научн. тр. / Л, 1983. С 18–30.
13. Мамзина Е. А. Энергетические процессы в семени птиц / Е.А. Мамзина, В. В. Комарова // Биологические основы размножения и искусственного осеменения сельскохозяйственных животных. Сборник научных трудов Пушкинской научно-исследовательской лаборатории разведения сельскохозяйственных животных Вып. XII том 2.: сб. научн. тр. / Пушкин, 1968. С — 44–53.
14. Мамзина Е. А. Углеводно-липидный метаболизм и оплодотворяющая способность семени петухов / Е. А. Мамзина, В. В. Комарова, Т. П. Сторожилова // Биологические основы размножения и искусственного осеменения сельскохозяйственных животных. Сборник научных трудов Пушкинской научно-исследовательской лаборатории разведения сельскохозяйственных животных Вып. XII том 2.: сб. научн. тр. / Пушкин, 1968. С — 54–58.
15. Целютин К. В. Искусственное осеменение и криоконсервация спермы (петухи, индюки, гусаки, селезни) / К. В. Целютин, Б. К. Тур. Санкт-Петербург — Пушкин.: Павел ВОГ, 2013. 85 с.

Pleshanov N. V., Stanishevskaya O. I.

Cryotolerance of cocks sperm depending on lipid content

Abstract. *This paper presents the results of study of cocks sperm cryotolerance depending on lipids content (triglycerides); individual and interbreed variability of this parameter have been evaluated and described.*

Keywords: Poultry breeding, artificial insemination, sperm, lipids, cryopreservation.

Authors:

Pleshanov Nikolai Vyacheslavovich — Post graduate student of the Department of Poultry Genetics and Breeding for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601; e-mail: klaus-90@list.ru;

Stanishevskaya Olga Igorevna — Dr. Habil. (Biology), Head of the Department of Scientist of the Department of Poultry Genetics and Breeding for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601; e-mail: olgastan@list.ru.