



Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»

Международная научно-практическая конференция «Современные технологии в генетике, селекции и воспроизводстве сельскохозяйственных животных», посвященная 85-летию ВНИИГРЖ.
10-11 июня Санкт-Петербург - Пушкин, 2025.

Влияние состава разбавителей на качественные показатели криоконсервированной спермы быков.



Докладчик - **Плешанов Н. В.**
Гл. технолог группы сохранения генофондных пород кур Н.Ц. ВНИИГРЖ.

Исследование выполнено в рамках ГЗ № 124020200127-7

Санкт-Петербург - Пушкин
2025

Криоконсервация мужских половых клеток является важным методом сохранения генофонда сельскохозяйственных животных *ex situ in vitro*.

Данный метод позволяет долговременно хранить сперму самцов и использовать ее в дальнейшем для искусственного осеменения, восстановления пород и популяций, а также генетических исследований.

Важнейшим элементом протокола криоконсервации является - разбавление нативного семени специальными средами-разбавителями перед замораживанием.

Основные цели применения разбавителей:

- Обеспечение выживаемости половых клеток вне организма и сохранение ими высокой оплодотворяющей способности.
- Создание среды, способной защитить сперматозоиды от повреждений в процессе криоконсервации и оттаивания.
- Увеличение объема спермопродукции для последующего аликвотирования на множество спермодоз.



Материалы и методы

В опыте использовали замороженно-оттаянную сперму быков Голштинской породы (n =4) содержащихся в АО “Невское”.

В качестве разбавителей использовали: коммерческую среду **OptiXcell (IMV) (Франция)** и разработанную **экспериментальную среду-разбавитель**.

Семя оценивали по следующим показателям:

- Концентрация сперматозоидов (фотометр , IMV Technologies (Франция)).
- Общая подвижность сперматозоидов после оттаивания (анализ Аргус-CASA.)
- Прогрессивная подвижность сперматозоидов после оттаивания (анализ Аргус-CASA.)

- Оценка клеток после оттаивания проводили при помощи проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter, Inc.) с программным обеспечением CytExpert, Version 2.4.0.28 (Beckman Coulter, Inc.) не менее 10000 событий:
 1. процент спермиев с поврежденными / интактными мембранами (флуорохром - Pi);
 2. процент живых /мертвых клеток подверженных оксидативному стрессу (флуохром - 2',7'-Дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (H2DCFDA)).
 3. доля клеток с высоким митохондриальным потенциалом (флуохром -тетраметилпродамин (TMRE)).

- Оценка морфологических изменений клеток после оттаивания проводили при помощи набора «Диахим-Дифф-Квик» и световой микроскопии (x1000), в каждом образце оценивалось не менее 200 клеток.



Табл. 1. Предварительная оценка качественных показателей (подвижности, жизнеспособности) нативных сперматозоидов быков (n = 9), в зависимости от времени переживаемости в исследуемых средах-разбавителях при +4 °С.

Переживаемость, ч	Среда - разбавитель экспериментальная			Среда - разбавитель OptiXcell – (IMV)		
	Подвижность общая, %	Подвижность прогрессивная, %	% интактных клеток	Подвижность общая, %	Подвижность прогрессивная, %	% интактных клеток
2	82,00 ± 3,11	79,89 ± 2,76	61,67 ± 2,92	82,00 ± 3,11	79,11 ± 2,62	59,44 ± 3,22
72	78,00 ± 3,11	66,44 ± 5,09	61,23 ± 4,92	75,89 ± 3,13	62,56 ± 4,61	55,78 ± 4,63
144	53,67 ± 9,07	41,78 ± 7,65	46,17 ± 2,61	45,56 ± 6,84	35,00 ± 7,71	43,00 ± 3,04

Табл. 2. Оценка качественных показателей замороженно-оттаянной спермы быков (n = 4), при помощи компьютерной системы Аргус-CASA и проточной цитометрии.

Среда-разбавитель	OptiXcell (IMV)	Экспериментальная среда
Подвижность общая, %	72,75 ± 7,65	69,75 ± 7,66
Подвижность прогрессивная, %	57,75 ± 6,16	58,75 ± 6,25
Доля клеток с поврежденной плазматической мембраной, %	48,69 ± 4,04	52,93 ± 4,58
Доля клеток с интактной плазматической мембраной, %	51,31 ± 4,04	47,08 ± 4,58
Живые клетки, подверженные оксидативному стрессу, %	3,21 ± 1,00	4,66 ± 0,95
Мертвые клетки, подверженные оксидативному стрессу, %	1,83 ± 0,45	5,57 ± 1,44
Доля клеток с высоким митохондриальным потенциалом, %	40,30 ± 6,55	40,75 ± 4,39

Табл. 3. Оценка морфологических изменений замороженно-оттаянной спермы быков (n = 4), в исследуемых средах.

Среда-разбавитель	OptiXcell (IMV)	Экспериментальная среда
Нормальные клетки	79,23 ± 2,99	79,91 ± 3,74
Клетки с нарушением головки	1,92 ± 0,27	2,16 ± 0,42
Клетки с изменением акросомы	8,43 ± 1,42	7,88 ± 1,73
Клетки с нарушением шейки	1,18 ± 0,21	1,22 ± 0,37
Клетки с нарушением хвоста	9,22 ± 1,33	8,81 ± 1,54

ВЫВОДЫ

- Применение экспериментальной среды-разбавителя позволяет пролонгировать жизнеспособность сперматозоидов как минимум на 144 часа после получения, давая возможность транспортировать семя в удаленные хозяйства, для дальнейшего искусственного осеменения.
- Использование экспериментальной среды в протоколе замораживание-оттаивание позволяет получать результаты (по качественным показателям сперматозоидов) сопоставимые с результатами западного аналога – OptiXcell (IMV).
- Приготовление и применение экспериментальной среды-разбавителя, в условиях импортозамещения, экономически более выгодно, что может составить конкуренцию современным синтетическим средам.

Благодарю за помощь в работе и подготовке доклада:

- **Никиткину Е. В.** к.б.н, ведущего научного сотрудника лаборатории биологии развития ВНИИГРЖ.
- **Курочкина А. А.** младшего научного сотрудника лаборатории биологии развития ВНИИГРЖ.
- **Турлову Ю. Г.** к.б.н, старшего научного сотрудника лаборатории биологии развития ВНИИГРЖ.
- **Сотрудников АО “Невское”**



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

