



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 достижения в
разведении и селекции айрширского скота**», посвященная.
2-5 сентября Санкт-Петербург - Пушкин, 2025.

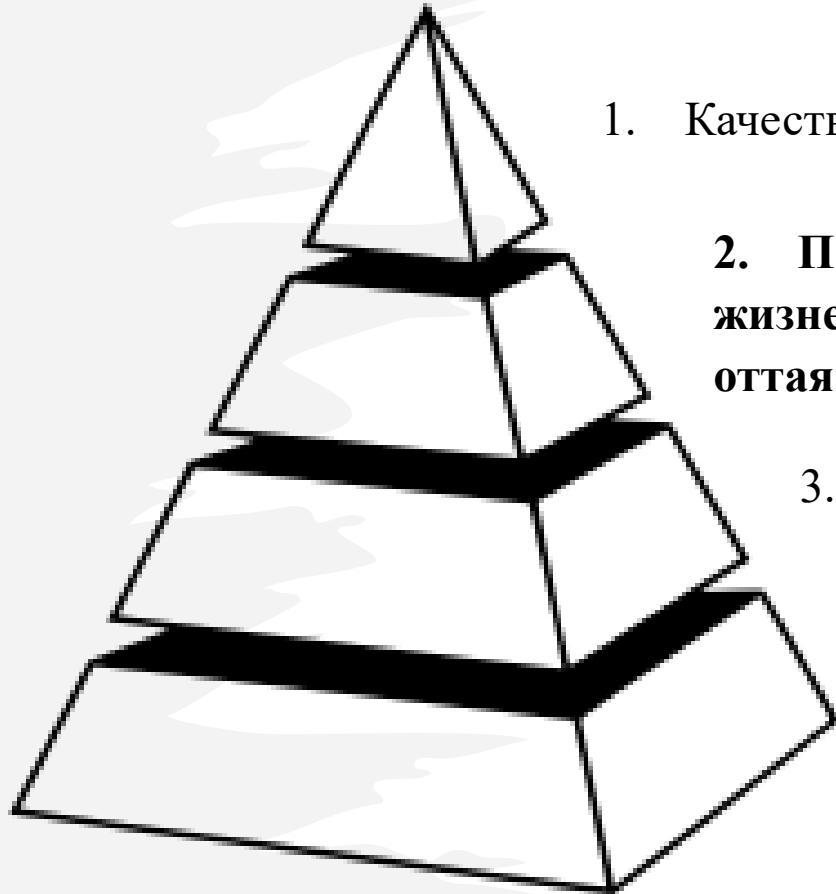
Перспективы использования сред-разбавителей для сохранения спермы быков.

Докладчик - **Плешанов Н. В.**
Гл. технолог Н.Ц. ВНИИГРЖ,
техник лаборатории популяционной генетики и
разведения животных ВНИИГРЖ.

Исследование выполнено в рамках ГЗ № 124020200127-7

Санкт-Петербург - Пушкин
2025

Фертильность спермодоз зависит от:



1. Качества репродуктивных клеток (свежеполученного эякулята);
2. Подбора оптимальной среды-разбавителя (для сохранения жизнеспособности сперматозоидов в нативной и замороженно-оттаянной сперме);
3. Использования оптимального протокола замораживания/оттаивания;
4. Подбора криопротектора для целей криоконсервации.

Основные цели применения разбавителей:

- Обеспечение выживаемости половых клеток вне организма и сохранение ими высокой оплодотворяющей способности.
- Восстановление энергетических ресурсов и уменьшение влияния продуктов распада сахаров (молочной кислоты и др.) на репродуктивные клетки.
- Создание среды, способной защитить сперматозоиды от повреждений в процессе криоконсервации и оттаивания.
- Увеличение объема спермопродукции для последующего аликвотирования на множество спермодоз.



Применение сред-разбавителей для хранения спермы:

В охлажденном виде



- Сохранение морфо-функциональной полноценности репродуктивных клеток длительное время с возможностью транспортировки семени на дальние расстояния, не прибегая к криоконсервации.
- Получение высокого процента жизнеспособных сперматозоидов, по сравнению с заморожено-оттаянным семенем, как следствие – высокий уровень продуктивных осеменений.
- Использование генетического материала быков особо ценных, редких и исчезающих пород крупного рогатого скота, с низкой криорезистентностью семени, для искусственного осеменения и восстановления поголовья.



- Ограниченный срок хранения и постепенное снижение полноценности и фертильности сперматозоидов, по сравнению со стабильностью низкотемпературной консервации клеток.

В криоконсервированном виде



- Долговременное хранения спермы быков с возможностью использования ее в дальнейшем для искусственного осеменения, восстановления пород и популяций, а также генетических исследований.
- Составление криобанков спермы от лучших самцов-производителей.



- Обратимые и необратимые изменения в сперматозоидах, ввиду влияния на них сверхнизких температур (-196 °C), снижение процента жизнеспособных клеток.
- Сужение генетического разнообразия за счет отбраковки особей с низкой криорезистентностью спермы.

Материалы и методы

В опыте использовали нативную сперму быков **Черно-пестрой** (n =6) и **Айрширской** (n =3) породы, а также 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**.

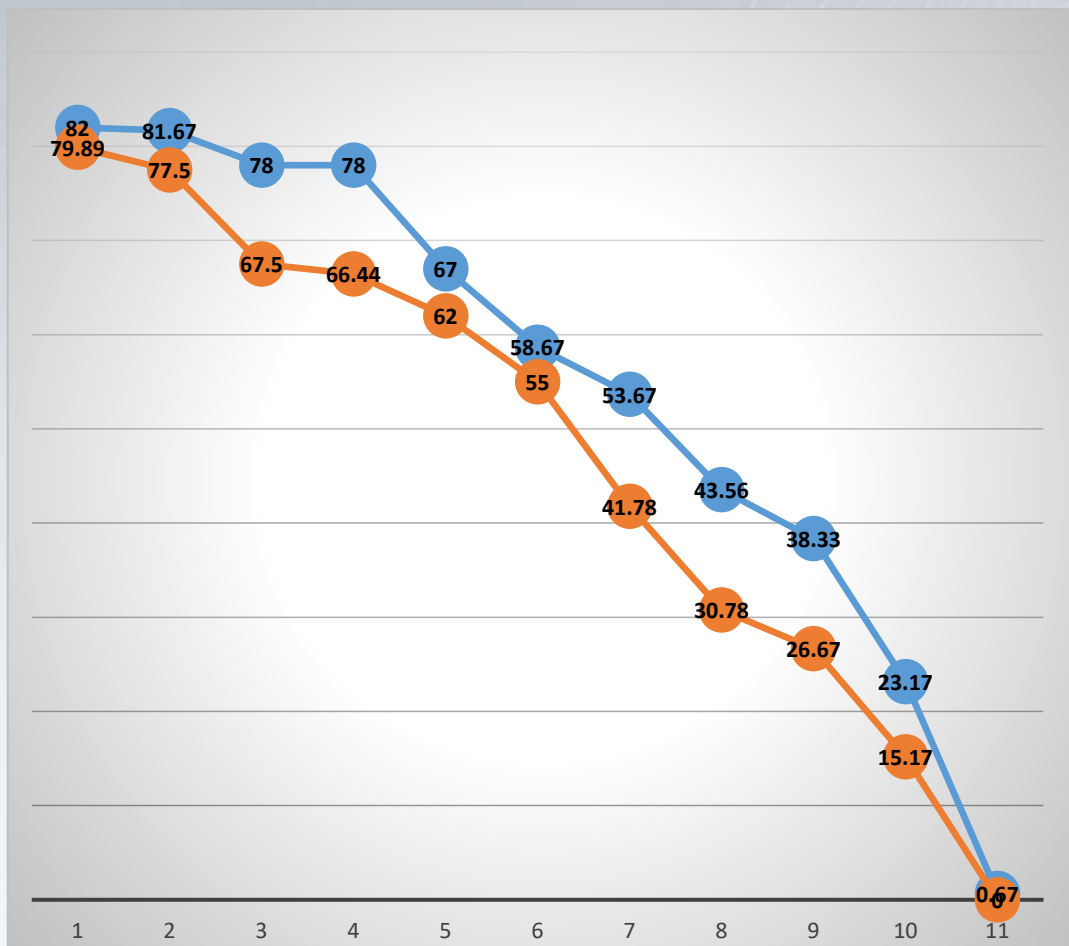
Семя оценивали по следующим показателям:

- Концентрация сперматозоидов (фотометр , IMV Technologies (Франция)).
- Общая подвижность сперматозоидов после оттаивания (анализ Аргус-CASA.)
- Прогрессивная подвижность сперматозоидов после оттаивания (анализ Аргус-CASA.)
- Переживаемость клеток оценивали по распределенному часовому графику, сперму выдерживали при фиксированной температуре (+4°C).
- Жизнеспособность сперматозоидов оценивали окрашиванием образцов эозином, (анализ Аргус-CASA.) в каждом образце оценивалось не менее 200 клеток.
- Оценка клеток после оттаивания проводили при помощи проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter, Inc.) с программным обеспечением CytExpert, Version 2.4.0.28 (Beckman Coulter, Inc.) не менее 10000 событий:
 1. процент спермиев с поврежденными 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 -тетраметилродамин (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.

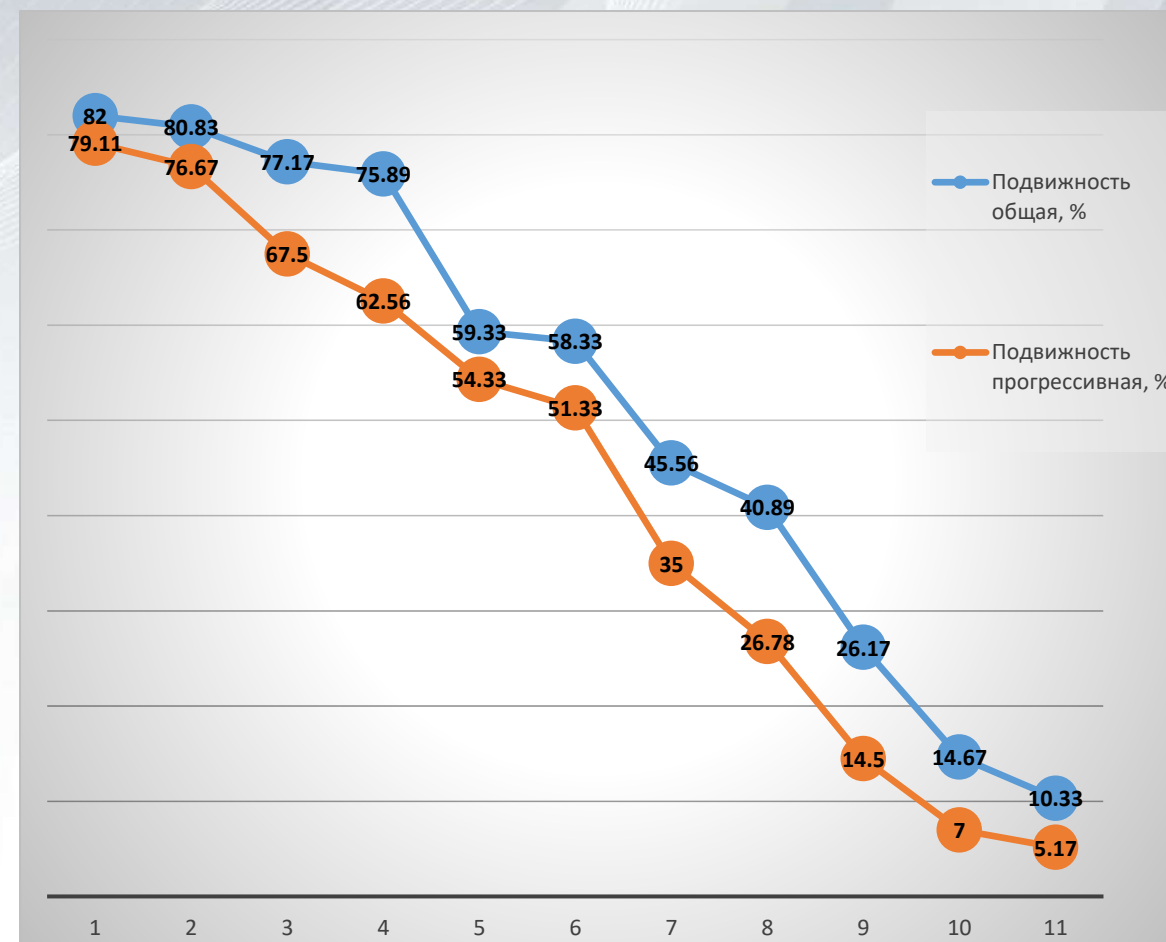


Рис 1. Качественные показатели спермы быков (n = 9), в зависимости от времени переживаемости в исследуемых средах-разбавителях при +4°C.

Среда - разбавитель экспериментальная



Среда - разбавитель OptiXcell – (IMV)



Первое измерение через 2 часа после разбавления, второе измерение через 24 часа, последующие измерения через каждые 24 часа.(до 240 часов при $t = +4^{\circ}\text{C}$)

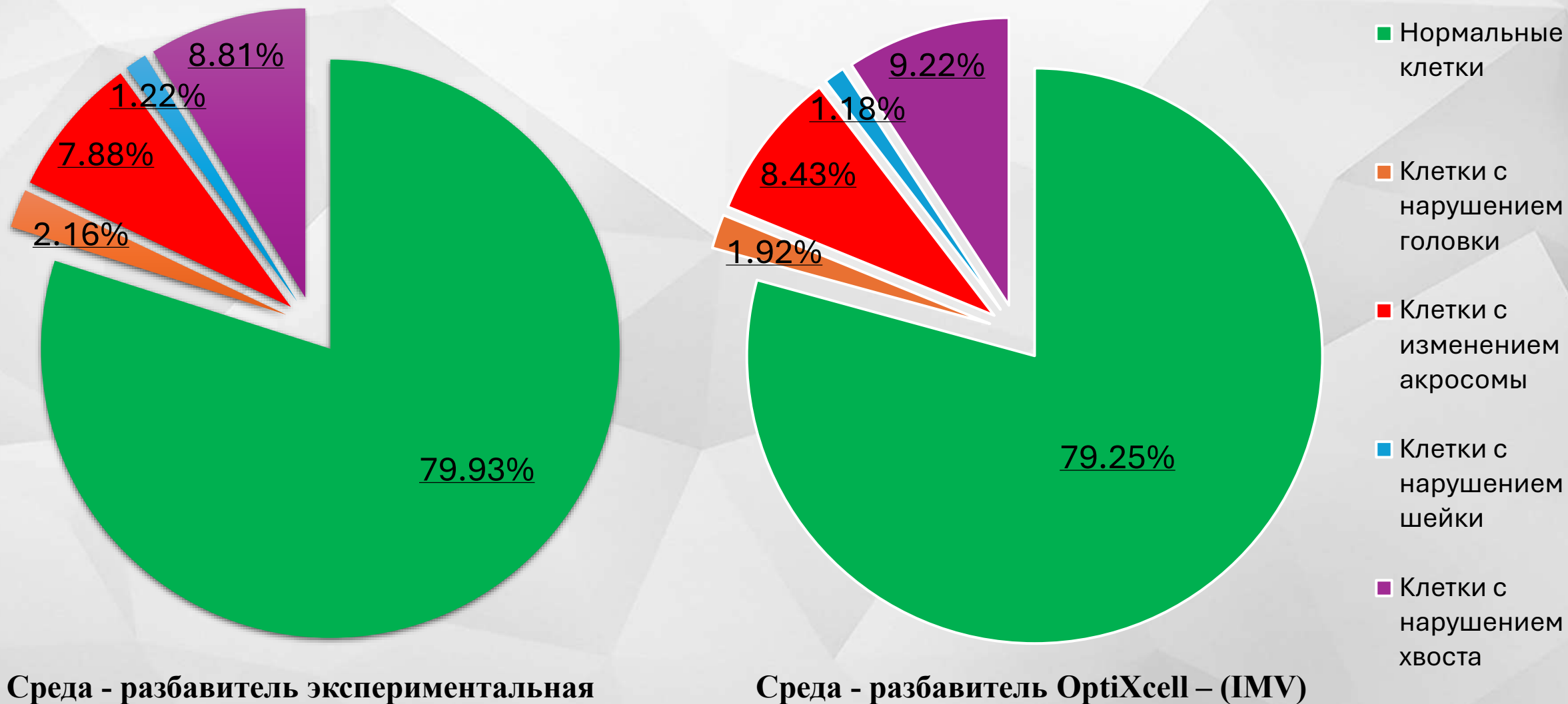
Табл. 1. Оценка качественных показателей (подвижности, жизнеспособности) нативных сперматозоидов быков (n = 9), в зависимости от времени переживаемости в исследуемых средах-разбавителях при +4 °С.

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-оттаяной спермы быков (n = 4), при помощи компьютерной системы Аргус-CASA и проточной цитометрии.

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

Рис. 2. Морфологические изменения замороженно-оттаянных сперматозоидов быков (n = 4), в исследуемых средах.



ВЫВОДЫ

- Полученные данные указывают на универсальность экспериментальной среды, с возможностью использования ее, как для хранения спермы в охлажденном виде (при 4 °C) до 144 часов с высокой прогрессивной подвижностью сперматозоидов ($41,78 \pm 7,65$), так и для целей криоконсервации ($58,75 \pm 6,25$).
- Использование экспериментальной среды в протоколе замораживание-оттаивание позволяет получать результаты (по морфофункциональным показателям сперматозоидов) сопоставимые с результатами западного аналога – OptiXcell (IMV).

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!

