



Международная научно-практическая конференция,
посвященной 95-летию ВНИИ коневодства и 75-летию
со дня рождения академика В. В. Калашникова
«АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ КОНЕВОДСТВА И
ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ИННОВАЦИОННЫХ МЕТОДОВ»



Совершенствование протокола криоконсервации спермы жеребцов

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки, проект №124020200127-7

В.н.с., к.б.н. ВНИИГРЖ Никиткина Е.В.

Цель работы была провести оценку качества спермы жеребцов при центрифугировании и криоконсервации при использовании разбавителей с различным составом.

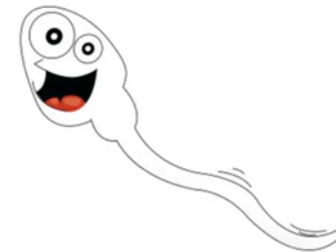
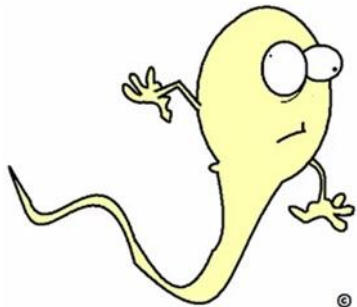
Материалы и методы:

Сперму от 9 жеребцов в возрасте от 9 до 21 года получали с использованием искусственной вагины Hannover (Minitube, Германия) на кобыл в охоте или фантом. От каждого жеребца сперма была получена не менее двух раз, всего было получено 31 эякулят, проанализировано 27 эякулятов. В анализ включены эякуляты с такими характеристиками: объем эякулята не менее 30 мл, концентрация сперматозоидов не менее 150 млн/мл, общая подвижность не менее 70%, прогрессивная подвижность не менее 60%. Для анализа влияния разбавителя на качество спермы при центрифугировании, охлаждении и замораживании каждый эякулят был разделен на 2 части и каждая часть разведена разбавителем в пропорции 1:2. Использовано 2 разбавителя для центрифугирования: Лактозо-хелато-цитрат-желточный (ЛХЦЖ) и опытный (на основе лактозы и глюкозы и раствора солей магния, натрия и калия). Для криоконсервации спермы в оба раствора добавляли 20% свежеприготовленного яичного желтка, 3% глицерина и 0,4 мг/мл гентамицина.

Разбавленную сперму центрифугировали при 600 g 8 минут, удаляли супернатант и разбавляли опытным или ЛЦХЖ до концентрации 200 млн/мл. Заполняли 0,5 мл соломинки и закупоривали шариками. Проводили эквilibрацию спермы при 4°C не менее 2-х часов и замораживали 10 мин при -110°C. Далее опускали в жидкий азот.

Материалы и методы:

Объем эякулята определяли мерным стаканом. Концентрацию и прогрессивную подвижность сперматозоидов определяли с помощью Аргус-CASA (АргусСофт, Россия) - методика «Подвижность» и микроскопа Motiс BA 410 (Motiс, Китай). Морфологию сперматозоида изучали, используя набор для дифференцированного окрашивания биопрепаратов Дифф-Квик («АБРИС+», Россия), с помощью Аргус-CASA, - методика МОРФОЛОГИЯ и микроскопа Motiс BA 410. Целостность мембран определяли при помощи окрашивания образцов красителем нигрозин-эозин (Диаэм, Россия) и микроскопа Motiс BA 410. Дыхание сперматозоидов определяли на приборе Эксперт-001 с помощью амперометрического датчика для измерения скорости клеточного дыхания. Функциональное состояние энергетической системы оценивали по реакции дыхания на добавление разобщителя дыхания и фосфорилирования – 2,4 динитрофенола (2,4-ДНФ) . Для анализа фрагментации ДНК в сперме мы использовали тест дисперсии хроматина спермы (SCD). Для теста SCD использовался набор GoldCyto DNA (Гуанчжоу, Китай). Всего было измерено 100 сперматозоидов на образец с помощью CASA (ArgusSoft-модуль фрагментации ДНК).



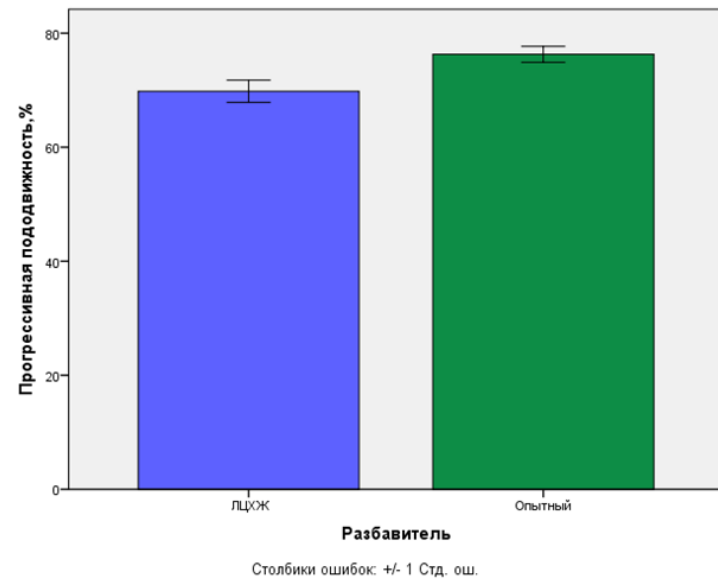
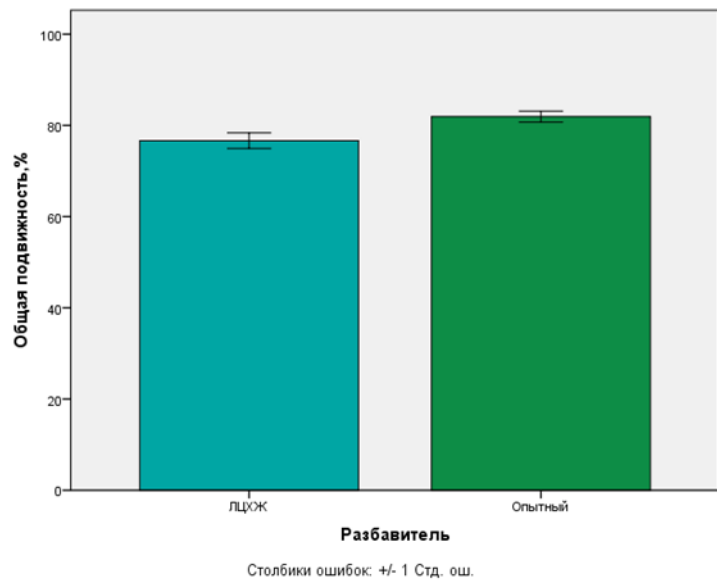


Рис. 1. Общая и прогрессивная подвижность сперматозоидов при центрифугировании в разных разбавителях

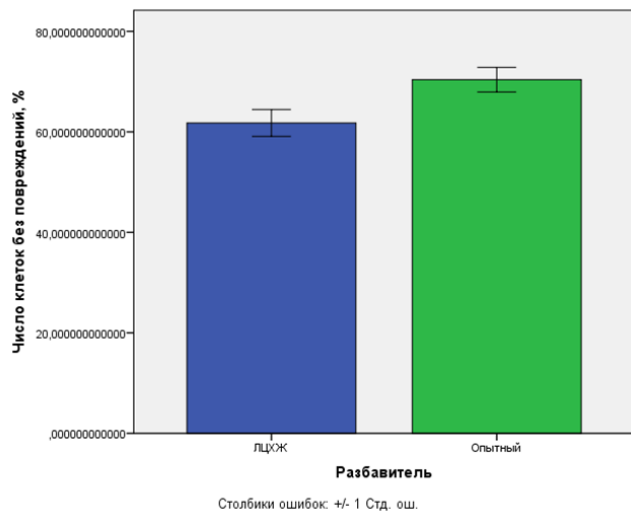


Рис. 2. Число клеток без повреждений при центрифугировании в разных разбавителях

Все исследуемые показатели качества спермы (общая и прогрессивная подвижность, морфология, включая акросому, фрагментация ДНК и сопряженность дыхания и фосфорилирования) значительно не изменились после центрифугирования, что свидетельствует о допустимом режиме – 600g 8 минут. Наши исследования показали достоверные различия ($P < 0,05$) по оценке подвижности и числу клеток без повреждений после центрифугирования в разных разбавителях (рис. 1-2).

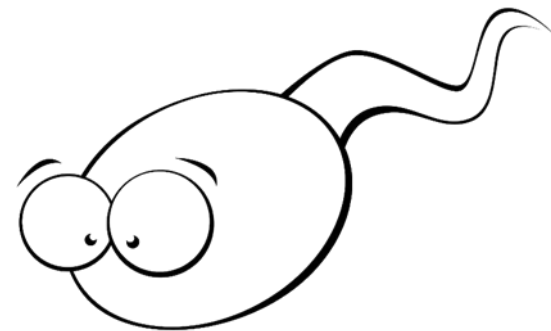
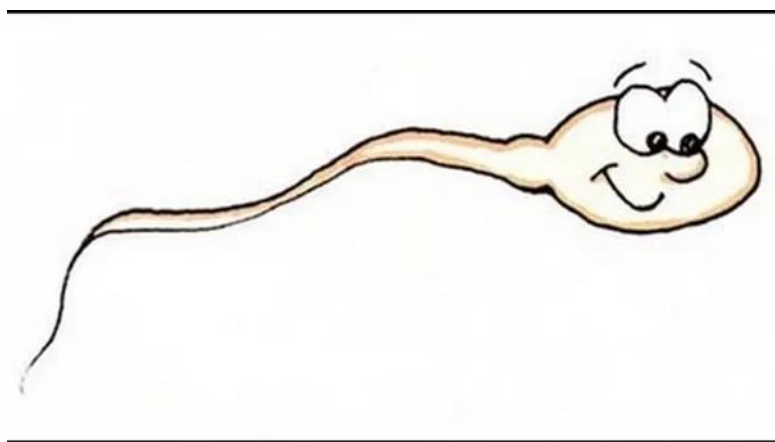
Таблица 1. Показатели жизнеспособности в образцах спермы жеребцов после оттаивания

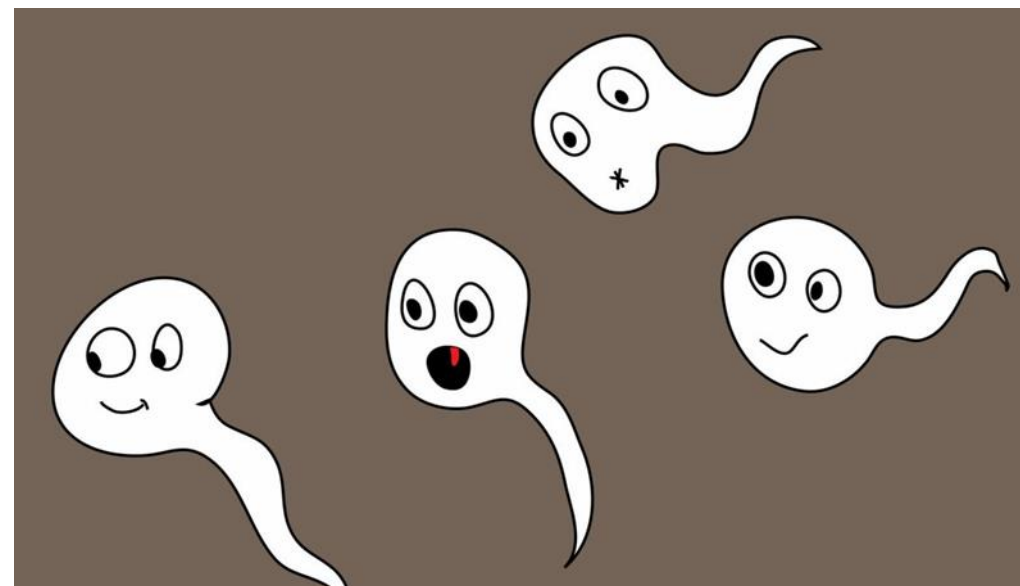
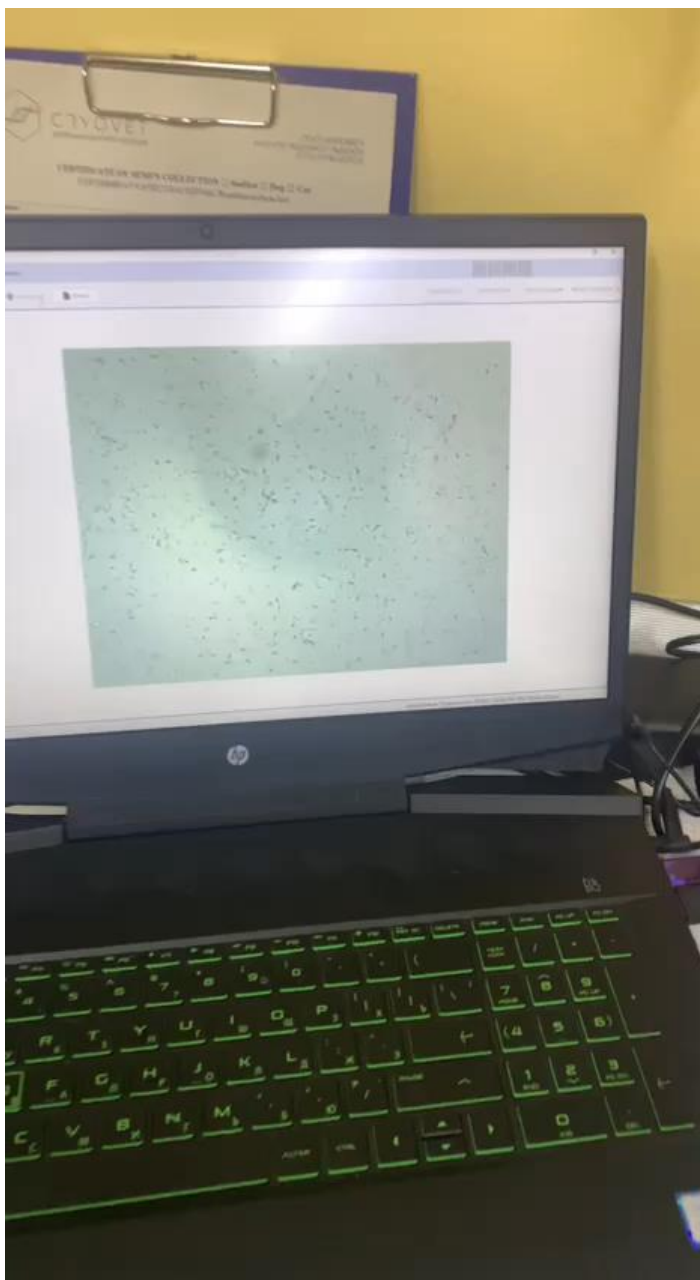
Показатель качества	Разбавитель	
	Опытный	ЛХЦЖ
Общая подвижность, %	44,5 ± 1,74 ^a	34,6 ± 0,78 ^b
Прогрессивная подвижность, %	38,3 ± 2,17 ^a	30,4 ± 1,23 ^b
Сперматозоиды нормальной морфологии, %	68,4 ± 2,10 ^c	59,4 ± 1,52 ^d
Сперматозоиды с повреждениями хвоста, %	20,5 ± 0,67 ^a	26,5 ± 0,79 ^b
Сперматозоиды с поврежденной акросомой, %	11,1 ± 0,67 ^a	13,2 ± 1,12 ^b
Стимуляция дыхания 2,4 ДНФ, раз	2,16 ± 0,07 ^c	1,82 ± 0,04 ^d
Сперматозоиды с поврежденной ДНК, %	27,6 ± 6,19	28,3 ± 4,45

^{ab}P<0,05; ^{cd}P<0,01

Выводы:

Таким образом, наблюдалось влияние разбавителя на качество спермы жеребцов при центрифугировании и криоконсервации. Использование опытного разбавителя лучше сохраняло подвижность, морфологию сперматозоидов и сопряженность дыхания и фосфорилирования (2,4 ДНФ тест) при выбранном протоколе криоконсервации спермы по сравнению с разбавителем ЛЦХЖ. Для выяснения сохранения оплодотворяющей способности необходимо провести искусственное осеменение кобыл спермой, замороженной с использованием разных разбавителей. Совершенствование состава разбавителя (например, замена сахаров на фруктозу или введение антиоксидантов) также является задачей дальнейшего исследования.





Спасибо за внимание



Харбин М (Ходар –Баядерка)