



ЖИВОТНОВОДСТВО И ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

Г.Ф.Медведев, доктор ветеринарных наук, профессор

Л.П.Аникевич, аспирантка

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия

УДК 636.22/28.082.453.53

Свойства молочной среды различного состава для разбавления спермы быков

В статье приведены данные исследования физических и биологических свойств двухфракционной молочной среды для разбавления спермы быка.

Основными компонентами среды являются обрат жирностью 0,05-0,08% и гомогенизированные сливки, глицерин и полиген (первый вариант), или же к обрату добавлен раствор фруктозы, глицерин и полиген (второй вариант). Осмотическое давление сред составило соответственно 290 ± 1 и 284 ± 1 миллиосмомолей; рН $6,66 \pm 0,01$ и $6,61 \pm 0,01$.

При разбавлении и замораживании спермы быка в гранулах или соломинах молочная среда обеспечивала выживаемость 30-40% сперматозоидов, сохранение их структуры и биологических свойств. Процент клеток с поврежденной акросомой (среди подвижных) не превышал 7-8. При осеменении такой спермой телок и коров достигнуты более высокие показатели оплодотворения (в среднем 77,5%), чем при осеменении спермой, разбавленной лактозо-желточно-глицериновой средой (62,1%).

Совершенствование технологии разбавления спермы должно быть направлено на достижение высокой оплодотворяющей способности её при минимальном содержании половых клеток в дозе для осеменения.

Применяемая в настоящее время на племпредприятиях лактозо-желточно-глицериновая среда (ЛЖТ) не является подходящей для решения этой задачи. Она рассчитана на одномоментное разбавление спермы и замораживание ее в гранулах. Необходимо разработка биосинтетических сред, состоящих из двух фракций, чтобы можно было производить ступенчатое разбавление спермы, эффективнее обеспечивающее адаптацию сперматозоидов к среде и снижение частоты повреждений их в процессе замораживания и оттаивания.

За рубежом широко используются различные варианты молочных сред. Они обеспечивают восстановление подвижности 50 и более процентов сперматозоидов после оттаивания. Так, именно в молочной среде наблюдались более высокие начальные показатели подвижности сперматозоидов после оттаивания (около 5 баллов, или 47%). В то время как яично-желточно-цитратная масса и трияично-желточная среды обеспечивали меньшие показатели — 44-46% [1]. В этом эксперименте оценка подвижности сперматозоидов, замороженных в молочной среде, производилась авторами после оттаивания в яично-желточно-цитратной среде.

The article provides the results of the research on physical and biological properties of the two components milk extender for dilution of the bull's sperm. The skim milk with fat content of 0,05-0,08%, homogenized cream, glycerin and polygene are the basic components of the first option of the extender, another option requires adding fructose solution, glycerin and polygene. The osmotic pressure of the extenders was 290 ± 1 and 284 ± 1 mOsm; pH $6,66 \pm 0,01$ and $6,61 \pm 0,01$ respectively. When diluting and freezing the bull's sperm in granules or pellets milk extender ensured the viability 30-40% of spermatozoa as well as preservation of their structure and biological properties. The percentage of the cells with damaged acrosoma (among mobile) did not exceed 7-8. Insemination of heifers and cows with such sperm yielded higher results of fertilization (77,5% on average). The insemination with the sperm diluted with lactosa-egg-glycerine extender had 62,1%.

Сохранение подвижности сперматозоидов в среде определяется, в первую очередь, её физико-химическими свойствами — рН и осмотическим давлением. Поскольку плазма сперматозоидов имеет осмотическое давление около 285 миллиосмомолей, то разбавители должны быть равного осмотического давления, то есть изотоническими для сперматозоидов [4, 5].

Клеточная проницаемость сперматозоидов для различных веществ различна. Вещества, сходные по составу с жидкостями тела или природными липидами, такими как яичный желток или молоко, подходят в качестве компонентов для разбавления спермы. Впервые использованная за рубежом среда для разбавления спермы быка, состоящая из равных частей буфера и желтка куриных яиц, была гипертоничной [6, 7]. Применяемые в нашей стране среды для разбавления спермы быка также имеют высокое осмотическое давление.

Сперматозоиды нуждаются в защите от автотоксикации кислыми продуктами метаболизма. В яично-желточной и молочной средах с нейтральным рН способность к движению и оплодотворению яйцеклетки сперматозоиды хорошо сохраняют. Однако уменьшение рН до 6,5 может быть даже полезным. Оптимальное значение рН, вероятно, варьирует от температуры хранения и других компонентов разбавителя [5].

Синтетическая среда любого состава должна иметь оптимальное, разное для разных видов животных осмотическое давление. Чувствительность сперматозоидов к отклонениям осмотического давления от изотонии настолько велика, что по степени их подвижности и выживаемости можно определять молекулярные веса неядовитых веществ или количество кристаллизационной воды в солях.

Среда синтетическая должна поддерживать в большинстве случаев нейтральную реакцию — примерно $pH=6,8-7,2$. Нормальный показатель для молочной среды — $pH 6,5-6,6$ [2].

Для специальных методов сохранения спермы применяют более кислые среды, имеющие pH в пределах между $6,2-6,5$.

Следует отметить, что не всегда показатели начальной подвижности сперматозоидов в оттаянной сперме имеют прямую корреляционную связь с оплодотворяющей способностью спермы. Установлено, что у многих сохраняющих подвижность клеток могут быть повреждены акросома и другие части головки и это отражается отрицательно на оплодотворяющей способности спермы.

Чем выше в сперме содержание таких клеток, тем ниже ее оплодотворяющая способность. Это подтверждено и исследованиями Г.Ф. Медведева, С.О. Турчанова и А.М. Плоткина [3].

Нами были разработаны состав и технология приготовления двухфракционной молочной среды для разбавления спермы быка, отличающейся тем, что компонентами ее являются обрат жирностью $0,05-0,08\%$ и гомогенизированные сливки, глицерин и полиген (*первый вариант*), или же основой среды служили только обрат, к которому добавляли глицерин и полиген (*второй вариант*).

С целью более глубокого изучения свойств таких сред и совершенствования их состава были изучены pH и осмотическое давление.

Для определения осмотического давления использован метод криоскопии. Исследования проведены в лаборатории кафедры физической химии Белорусского государственного университета, а в последующем — в лаборатории кафедры физиологии, биотехнологии и ветеринарии БГСХА. В БГУ исследовали осмотическое давление молочной среды и среды из обрат без глицерина и с глицерином при хранении в течение трех суток. В лаборатории БГСХА этот показатель определяли в молочной среде без и с добав-

лением дистиллированной воды и фруктозы, а также в лактозо-желточно-глицериновой среде при хранении их в течение трех суток. Показатель осмотического давления высчитывали путем деления величины депрессии на $0,00186$, т. е. на одну тысячную величины депрессии молярного раствора не электролита (минус $1,86^\circ C$). Например, точка заморзания минус $0,56^\circ C$, осмотическое давление составит $0,56:0,00186 = 301$ миллиосмомолей.

Величину pH сред определяли потенциометрически на иономере И-130.2М.1 в лаборатории ионометрии кафедры химии БГСХА. Число исследуемых образцов по каждому варианту среды варьировало от 3 до 7.

При проведении лабораторных исследований компоненты для молочных сред приобретали на Горещком молочном предприятии.

В Могилевском племпредприятии (июль-октябрь 2000 г.) были проведены эксперименты по изучению жизнеспособности сперматозоидов в молочных средах в процессе разбавления, замораживания и после оттаивания. Одновременно была изучена частота морфологических повреждений акросом сперматозоидов после оттаивания с использованием методики и критериев [3].

От быков брали обычно 1 или 2 эякулята. Каждый эякулят делили на две или три части (не всегда равные). Одна часть спермы разбавлялась ЛЖГ средой, а одна или две другие части — средой молочной, молочной с добавлением дистиллированной воды, молочной с добавлением фруктозы. При приготовлении среды использовали сливки однократной гомогенизации 20% жирности и обрат жирностью $0,08\%$. Всего было использовано 7 эякулятов от 5 быков.

Для определения оплодотворяющей способности спермы проведены два опыта: в колхозе «Мир» Дрибинского района и учхозе БГСХА на молочном комплексе. Использована сперма, приготовленная на Гомельском племпредприятии в конце 1999 г.

Результаты лабораторных исследований в БГУ на кафедре физической химии и в лабораториях БГСХА по определению осмотического давления и pH сред приведены в таблицах 1-2.

При проведении первых лабораторных исследований в БГУ было отмечено, что точка заморзания молочной среды без глицерина колебалась в пределах минус $0,560-0,575^\circ C$, среды из обрат — минус $0,730-0,720^\circ C$. В средах

Таблица 1. Показатели осмотического давления молочных сред

Среды	Дни исследования		
	1	2	3
	$X \pm m_x$	$X \pm m_x$	$X \pm m_x$
Молочная среда	290 ± 1	$293 \pm 0,4$	318 ± 0
Обрат	389 ± 2	411 ± 6	396 ± 1
Молочная среда с фруктозой (а)	$284 \pm 0,9$	283 ± 6	275
Молочная среда с фруктозой (б)	333		
Молочная среда с дистиллированной водой	265 ± 2	251 ± 6	270 ± 9
Лактозо-желточно-глицериновая	357		

Таблица 2. Показатели рН среды для разбавления спермы быка

Среды	Дни исследования		
	1	2	3
	$X \pm m_x$	$X \pm m_x$	$X \pm m_x$
Молочная среда	6,55 \pm 0,01	6,50 \pm 0,01	6,47 \pm 0,01
Обрат	6,52 \pm 0,01	6,49 \pm 0,02	6,46 \pm 0,01
Молочная среда с фруктозой (а)	6,68 \pm 0,01	6,65 \pm 0,01	6,62 \pm 0,01
Молочная среда с фруктозой (б)	6,61 \pm 0,01	6,58 \pm 0,01	6,56 \pm 0,01
Молочная среда с дистиллированной водой	6,74 \pm 0,01	6,70 \pm 0,01	6,66 \pm 0,01
Лактозо-желточно-глицериновая	6,26 \pm 0,01	6,19 \pm 0,02	6,13 \pm 0,01

сглицерином значения этого показателя были равны соответственно минус 3,500-3,745 °С и минус 4,470-5,270 °С.

Расчеты показали, что при таких значениях величины депрессии, следовательно, и показатели осмотического давления сред, достигали максимального значения или даже были несколько больше, чем требуется по норме. При хранении в течение трех суток осмотическое давление возрастало (табл. 1). После этих исследований в состав молочной среды была включена дистиллированная вода, а затем раствор фруктозы различной концентрации (а, б). Осмотическое давление молочной среды с дистиллированной водой было доведено до минимального показателя (260 миллиосмомолей). Среда такого состава была использована для разбавления спермы двух быков. Однако ни в одном случае не были достигнуты минимальные показатели подвижности сперматозоидов и этот вариант среды был оставлен.

Вместо дистиллированной воды в среду включили раствор фруктозы. Количество воды и фруктозы подобрали так, чтобы довести осмотическое давление до оптимального — 284 миллиосмомолей (вариант "а", табл. 1).

В лактозо-желточно-глицериновой среде осмотическое давление более высокое — 357 миллиосмомолей.

Значение рН свежеприготовленной молочной среды на основе гомогенизированных сливок и обрата в опыте варьировало в пределах от 6,43 до 6,54; молочной среды, приготовленной на основе обрата, — 6,51-6,54. При температуре 5 °С значение рН среды на протяжении двух суток менялось незначительно. Так, на следующие сутки этот показатель молочной среды варьировал от 6,51 до 6,58, ещё через сутки — 6,68-6,70. Значение рН на основе обезжиренного молока также изменялось незначительно. На следующие сутки оно составляло 6,52-6,58, ещё через сутки — 6,69-6,72.

Таблица 3. Результаты замораживания спермы быков в Могилевском племпредприятии

Дата взятия	Среда	Кличка быка	Использовано спермы, мл.	Подвижность, баллов	Концентрация сперматозоидов, млрд. в мл	Степень разбавления	Оценка после 24 ч, баллов
25.07.00	ЛЖГ	Доллар	5	7	1,0	1:3	4*-1**
25.07.00	МС	Доллар	2	7	1,0	1:3	2-ед.
25.07.00	МС ₁	Доллар	5	7	1,0	1:3	1-ед.
25.07.00	ЛЖГ	Плавун	2	7	1,3	1:5,5	4-1
25.07.00	МС	Плавун	1	7	1,3	1:5,5	3-ед.
25.07.00	МС ₁	Плавун	1	7	1,3	1:5,5	2-ед.
16.08.00	ЛЖГ	Тигер	1	7	1,3	1:5,5	4-3
16.08.00	МС ₂	Тигер	2	7	1,3	1:5,5	3-3
16.08.00	ЛЖГ	Мухомор	8	7	1,1	1:4	4-2
16.08.00	МС ₂	Мухомор	2	7	1,1	1:4	3-3
06.09.00	ЛЖГ	Феномен	7	8	1,2	1:6	4-1
06.09.00	МС ₂	Феномен	7	8	1,2	1:6	2-ед.
06.09.00	ЛЖГ	Тигер	5	8	0,9	1:2,5	4-2
06.09.00	МС ₂	Тигер	3	8	0,9	1:2,5	3,5-0

Примечание. * — начальная подвижность сперматозоидов после оттаивания, баллов;

** — подвижность сперматозоидов через 5 часов инкубации при 38 °С, баллов;

МС₁ — молочная среда с дистиллированной водой;

МС₂ — молочная среда с раствором фруктозы.

Таблица 4. Процент сперматозоидов с поврежденной акросомой в сперме быка после оттаивания

Дата	Кличка быка	Среда	Сразу после оттаивания	Спустя 1 ч после оттаивания	Спустя 2 ч после оттаивания
02.08.00	Доллар	ЛЖГ	4	5	6
02.08.00	Доллар	МС	5	5	5
02.08.00	Доллар	МС ₁	4	6	7
02.08.00	Плавун	ЛЖГ	6	7	7
02.08.00	Плавун	МС	7	8	9
02.08.00	Плавун	МС ₁	6	7	9
17.08.00-07.09.00	Тигер, Мухомор, Феномен	МС ₂	4,5 [±] 0,5	5,4 [±] 1,0	6,7 [±] 1,2
17.08.00-07.09.00	Тигер, Мухомор, Феномен	ЛЖГ	4,7 [±] 1,1	6,0 [±] 1,3	7,0 [±] 1,7

Таким образом, испытуемая молочная среда вполне соответствовала стандарту по данному показателю. Хранение среды с момента приготовления до применения желательно ограничивать двумя днями.

В Могилевском племпредприятии проведено три эксперимента, в которых использована сперма 5 быков-производителей. Разбавление спермы проводили молочной базовой средой, а также средой, в состав которой включена фруктоза. В качестве контроля служила сперма, разбавленная лактозо-желточно-глицериновой средой.

Включение в состав молочной среды раствора фруктозы дало возможность в условиях эксперимента после разбавления и замораживания спермы в большинстве случаев достигать удовлетворительной начальной подвижности сперматозоидов в оттаянной сперме, а в ряде случаев и высокой подвижности спустя 5 часов после инкубации при 38 °С (до трех баллов, табл. 3). Однако начальная и конечная оценка подвижности сперматозоидов в молочных средах чаще была несколько ниже, чем в ЛЖГ среде.

Учитывая это, наряду с определением двух общепринятых показателей, нами определена и частота морфологических повреждений подвижных сперматозоидов. Ре-

зультаты исследования спермы в разное время после оттаивания показаны в таблице 4.

Из таблицы 4 видно, что в течение одного часа после оттаивания процент ненормальных сперматозоидов во всех образцах спермы не превышал 7-8. Следовательно, по этому показателю сперму можно было оценить как отличного, и в одном случае — как хорошего качества. Наблюдалась определенная тенденция к более низкой частоте ненормальных сперматозоидов в сперме, разбавленной молочными средами.

Lorton S.P. et al. (1988) в опыте установили, что число сперматозоидов с поврежденной акросомой после оттаивания в желточно-цитратном и трис-желточном разбавителях было выше, чем в молочном, особенно при использовании комбинации антибиотиков из гентамицина, тилозина и линкоспектина.

Для определения оплодотворяющей способности спермы быков, разбавленной молочной и лактозо-желточно-глицериновой средами, в колхозе "Мир" Дрибинского района в январе-феврале 2000 г. был проведен опыт. В опыте использовано 28 телок черно-пестрой породы. У всех у них половой цикл синхронизирован путем одно-

Таблица 5. Результаты осеменения коров спермой, разбавленной лактозо-желточно-глицериновой и молочной средами

Бык-производитель	Осеменено животных	Среда для разбавления спермы					
		МС			ЛЖГ		
		всего	плодотворно		всего	плодотворно	
			n	%		n	%
Учхоз БГСХА							
300047	43	33	24	72,7	10	6	60,0
300053	22	12	9	75,0	10	7	70,0
300034	24	12	8	66,7	10	6	60,0
	89	57	41	71,9	30	19	63,3
Колхоз "Мир"							
300068	30	23	20	87,0	7	4	57,1

кратной или двукратной инъекции простагландина (эстрофана). Осеменение проведено в выявленную половую охоту (в течение двух дней после инъекции) или в фиксированное время (через 76 ч.). В двух случаях учтены результаты повторного осеменения различной спермой и включены в общее число осеменений.

В феврале-сентябре 2000 г. был проведен второй опыт на молочном комплексе учхоза БГСХА Горецкого района. Всего было осеменено 87 коров спермой трех быков. Осеменение проведено в естественную охоту.

Результаты опыта показаны в таблице 5.

В обоих хозяйствах оплодотворяемость после первого осеменения животных была заметно выше в том случае, когда использовалась разбавленная молочной средой сперма. В учхозе БГСХА различия в проценте плодотворных осеменений колебались от 8,6 до 15% в зависимости от быка, а в колхозе "Мир" различие составило 30%. В среднем по двум опытам оплодотворяющая способность спермы, разбавленной молочной средой, была выше на 15,4% по сравнению с разбавленной лактозо-желточно-глицериновой средой. И это несмотря на то, что начальная подвижность сперматозоидов в оттаянной сперме несколько выше была в контрольной сперме.

D.L. Gamer et al. (1990) была изучена выживаемость сперматозоидов в желточно-цитратном разбавителе и в разбавителе из гомогенизированного молока. Оценка подвижности сперматозоидов непосредственно после оттаивания была выше в желточно-цитратном, чем в молочном разбавителе. Однако окончательная оценка после 3-часовой инкубации была выше в молочном разбавителе.

Заключение

Таким образом, результаты изучения физических свойств молочной среды, а также морфологических и биологических свойств сперматозоидов в этой среде показали, что применение ее для разбавления спермы быка может обеспечить необходимые показатели качества оттаянной спермы и показатели оплодотворяемости коров и телок.

Осмотическое давление базовой молочной среды и среды с фруктозой составляло соответственно 290 ± 1 и

284 ± 1 миллиосмомолей, pH $6,66 \pm 0,01$ и $6,61 \pm 0,01$. При разбавлении спермы быка (до 25-30 млн. клеток в 0,2 мл.) и замораживании ее молочная среда обеспечивала выживаемость 30-40% сперматозоидов, сохранение их структуры и биологических свойств. При осеменении такой спермой телок в синхронизированную и коров в естественную охоту достигнуты более высокие показатели оплодотворения, чем при осеменении спермой, разбавленной стандартной средой (в среднем 77%, в контроле 62%).

Литература

1. The artificial insemination and Embryo transfer of dairy and beef cattle (including information pertaining to goats, sheep, horses, swine, and other animals): A handbook and laboratory manual. – Danville. – 1994. – 352 p.

2. Lorton S.P., J.J. Sullivan, B. Bean, M. Kaproth, H. Kelgren and C. Marshall. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 2. Evaluation of seminal quality // Theriogenology. – 1988, vol. 29. – № 3. – P. 593-607.

3. Мелведев Г.Ф., Турчанов С.О., Плоткин А.М. Показатель биологической полноценности оттаянной спермы быков и влияние его на оплодотворяемость коров // Международный аграрный журнал. – 2000. – № 1. – С. 35-37.

4. Rothschild, Lord and H. Barnes. Osmotic pressure of bull semen diluents // Nature (London). – 1954. – V. 173. – P. 636.

5. Steinbach, J., R.H. Foote. Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa // Dairy Science. – 1967. – V. 50. – P. 205-213.

7. Gamer D.L., Johnson L.A., Allen C.H. Flow cytometric comparison of cryopreserved bovine spermatozoa processed in egg-yolk and milk diluents: Proceedings of the eleventh technical conference on artificial insemination and reproduction. NAAB. April 25-26, 1986. – Milwaukee: Wisconsin, 1986. – P. 122-123.

8. Schenk J.L., Allen C.H., Amann R.P. Fertility of bull sperm frozen in test, egg yolk-citrate or homogenized milk: Proceedings of the eleventh technical conference on artificial insemination and reproduction. NAAB. April 25-26, 1986. – Milwaukee: Wisconsin, 1986. – P. 106-107.