

УДК 636.22/.28.082.453.53

Е. Ю. ГУМИНСКАЯ

## СРЕДА ДЛЯ РАЗБАВЛЕНИЯ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия

(Поступила в редакцию 12.01.2005)

В молочном скотоводстве искусственное осеменение является основным методом воспроизведения животных. В последнее десятилетие в странах ЕС и США многие технологические процессы метода доведены до совершенства. Это позволяет эффективно использовать лучших быков-производителей. Благодаря новым разбавителям, технологиям расфасовки и замораживания спермы существенно повышена степень разбавления ее [1—2], обеспечивается и высокое содержание сперматозоидов после оттаивания (до 50% и более). В Республике Беларусь применяется ЛЖГ среда для замораживания спермы в гранулах. Нами разработана среда ЦЖГ (цитратно-лактозо-желточно-глицериновая) среда, обеспечивающая снижение процента поврежденных сперматозоидов в дозе и повышение выживаемости в верхушках рогов матки коров (*in vivo*) [3—4].

Цель работы — разработать двухфракционную среду для разбавления и замораживания спермы быка, обеспечивающую высокие показатели выживаемости сперматозоидов *in vitro* и *in vivo* и повышение оплодотворяемости коров на 7—10%.

**Материалы и методы исследований.** Исследования выполнены в лабораториях кафедры физиологии, биотехнологии и ветеринарии УО «БГСХА», эксперименты проведены на Госплемпредприятии г. Могилева (экс. 1—3, 5—10), на фермах РУП «Учхоз БГСХА» (экс. 4) и СПК «Овсянка» Горецкого района (экс. 11).

В качестве основы среды для разбавления спермы использован цитратный буфер. В состав фракции «А» включены лактоза, желток куриного яйца, широко используемый комплекс антибиотиков: тилозин, гентамицин и линко/спектин; в фракцию «В» дополнительно введен глицерин. Разбавляли сперму фракцией «А» после 5-минутной санации свежеполученной спермы этими антибиотиками. Затем сперму охлаждали в течение 2 ч и разбавляли фракцией «В». Контрольными физико-химическими свойствами, обеспечивающими пригодность среды для разбавления спермы, выбраны осмотическое давление и рН [5—6].

В эксперименте 1 при концентрации цитратного буфера 3,4% вносили в обе фракции желток куриных яиц и полиген (ЦЖГ-1), а при концентрации 2,9% в буфер добавляли и глюкозу (ЦЖГ-2). Содержание глицерина во второй фракции — 14%. В среднем для фракции «А» среды ЦЖГ-1 осмотическое давление составило 298, а ЦЖГ-2 — 353 миллиосмолей; рН — 7,0. Эти варианты среды применили для разбавления спермы быков-производителей черно-пестрой и голштинской пород (3 быка).

В эксперименте 2, который проведен в два срока, использовалась ЦЖГ-1 среда, а при концентрации цитратного буфера 2,9% добавляли лактозу различной степени чистоты (ЦЖГ-2а). Среда с осмотическим давлением 341 миллиосмолей и рН 7,0 была использована для разбавления спермы 6 быков черно-пестрой породы.

В эксперименте 3 также использована среда ЦЖГ-1, а при использовании цитратного буфера 2,9% добавляли фруктозу химически чистую (ЦЖГ-2б). Осмотическое давление 295 миллиосмолей, рН среды 6,9. Эти варианты среды применены для разбавления спермы производителей голштинской и черно-пестрой пород (3 быка).

**Техника проведения экспериментов.** От каждого животного получали дуплетные эякуляты. Сперму оценивали по внешним признакам; густоте, подвижности и концентрации сперматозоидов. Кроме того, определяли процент патологических форм сперматозоидов и с дефектами акросомы по модифицированному методу И. И. Соколовской [7]. Просматривали в пре-

парате 100 сперматозоидов, обладающих прямолинейным поступательным движением, и вычисляли процент клеток с повреждениями акросомы. Бактериологическое исследование проводилось по общепринятому методу.

После оценки качества свежеполученной спермы по основным показателям эякулят делили на две или три части и каждую часть разбавляли одной из трех сред. После предварительного разбавления фракцией «А» сперму выдерживали при температуре 28 °С в течение 5–6 мин. После этого сперму помещали в холодильник на 2 ч. Одновременно охлаждали до 4 °С и фракцию «Б». Разбавление второй фракцией проводили через 2 ч поэтапно в течение 30 мин. Разбавленную сперму замораживали в гранулах.

Во всех опытах после замораживания определяли в оттаянной сперме начальную подвижность и подвижность сперматозоидов после инкубации в течение 5 ч при температуре 38 °С, процент патологических форм сперматозоидов и число их с поврежденной акросомой.

*В эксперименте 4* изучена оплодотворяющая способность спермы 5 быков-производителей, используемых во втором эксперименте. Сперма этих быков была разбавлена ЦЖГ средой с 3,4%-ной концентрацией цитратного буфера без добавления сахаров и 2,9%-ной — с включением лактозы. В СПК «Овсянка» осеменено 109 коров и телок.

*В шести последующих экспериментах* в Могилевском племпредприятии с включением в каждый эксперимент 3 быков-производителей в состав среды с лактозой (ЦЛЖГ) добавляли в фракцию «А» новый комплекс антибиотических веществ. Для этого готовили раствор антибиотиков так, чтобы в 0,02 мл его содержалось 100 мкг тилозина, 500 мкг гентамицина и 300/600 мкг линко/спектина. Это количество добавляли из расчета на каждый миллилитр среды. Кроме того, такое же количество антибиотиков (из расчета на 1 мл) вносили в неразбавленную сперму на 5 мин. После получения спермы определяли качество ее до внесения антибактериальных веществ, после 5-минутной выдержки с антибиотиками, затем после оттаивания замороженной спермы и инкубации ее в течение 5 ч при температуре 38 °С. Разбавленную сперму расфасовывали в соломины.

*В эксперименте 11*, который проведен в СПК «Овсянка» Горецкого района, определена выживаемость сперматозоидов (*in vivo*) в матке коров при осеменении спермой, разбавленной ЛЖГ и ЦЛЖГ средами. Использовано 4 коровы-первотелки: 2 животных осеменяли однократно, а 2 других — 3 раза. Первое осеменение (в эксперименте) проводили в естественную охоту. Повторную охоту вызывали введением 2 мл эстрофана спустя 11–12 дней после предыдущего осеменения. Осеменяли животных поочередно в начале или в конце охоты. Сперматозоиды извлекали из верхушки рога матки через 18 ч. Для извлечения использовали среду Дюльбекко, подогретую до 38 °С в количестве 10 мл. В извлеченной жидкости определяли количество сперматозоидов, подвижность их, а также морфологические свойства.

**Результаты и их обсуждение.** *В трех первых экспериментах* начальная активность сперматозоидов во всех образцах спермы составляла 8,0 баллов, концентрация сперматозоидов в сперме — от 1,3 до 1,5 млн/мл. Процент патологических форм сперматозоидов не превышал 8,0. Причем количество их с первичными дефектами было незначительным — в среднем  $1,0 \pm 0,2\%$  —  $2,8 \pm 0,3\%$ . Таким же было и число клеток с вторичными и несколько больше (в среднем от  $2,7 \pm 0,5\%$  до  $4,2 \pm 0,3\%$ ) с третичными дефектами. Сперматозоидов с повреждениями акросомы во 2 и 3 экспериментах было  $7,6 \pm 1,3$  и  $5,2 \pm 0,7\%$ .

После замораживания и оттаивания показатели качества спермы изменялись в зависимости от используемой среды. При разбавлении спермы ЛЖГ средой во всех экспериментах начальная активность оттаянной спермы оценивалась в 4 балла. Но при использовании ЦЖГ среды с глюкозой или фруктозой сперма после оттаивания была оценена только в 3 балла у одного из трех и у двух из трех быков соответственно.

Наиболее заметные различия отмечены после инкубации спермы в течение 5 ч при температуре 38 °С (выживаемость сперматозоидов *in vitro*). Все образцы спермы, разбавленной ЛЖГ средой, оценивались в 1–3 балла. При разбавлении спермы ЦЖГ средой с глюкозой подвижных сперматозоидов в сперме не обнаруживали. Только в двух образцах спермы, разбавленной ЦЖГ средой с фруктозой, выживали единичные сперматозоиды; в среднем активность для трех образцов спермы составила  $0,3 \pm 0,2$  баллов. Близко к стандарту оценена сперма, разбавленная цитратной средой с лактозой, — в среднем для всех образцов  $0,8 \pm 0,2$  баллов.

Изучение морфологических признаков сперматозоидов показало, что в сперме многих быков процент дефектных клеток после замораживания и оттаивания увеличивался. Однако это увеличение касалось в основном спермы, разбавленной ЛЖГ средой; в экспериментах 2 и 3 оно составило около 3%. В сперме, разбавленной обоими вариантами ЦЖГ среды, процент де-

фектных сперматозоидов во всех 3 экспериментах был значительно ниже, чем в сперме, разбавленной ЛЖГ средой. Причем в эксперименте 2 различия были достоверными ( $P < 0,05$ ).

При изучении частоты повреждений акросомы установлено, что в сперме всех быков в экспериментах 2 и 3 процент аномальных клеток увеличивался независимо от используемой среды для разбавления спермы. Наиболее заметным увеличением было в сперме, разбавленной ЛЖГ средой.

Результаты осеменения коров и телок, полученные в эксперименте 4, указывают на высокую оплодотворяющую способность спермы, разбавленной ЦЛЖГ средой. Из 109 подопытных животных оплодотворено 102. Всего потребовалось 122 осеменения. Общая оплодотворяемость составила 83,6%. Из 87 первично осемененных коров и телок оплодотворилось 73, или 83,9%. Оплодотворяемость телок была выше — 88,8% (коров — 73,3%). При использовании ЦЛЖГ среды оплодотворяемость была выше (90,4%), чем ЦЖГ (77,7%).

В последующих 6 экспериментах использована только ЦЛЖГ среда, причем с новым составом антибиотических веществ и изменением техники санации спермы. Результаты приведены в табл. 1.

Активность свежеполученной спермы оценивалась 8,0 баллами. Но концентрация сперматозоидов в сперме была несколько ниже ( $1,1 \pm 0,1$  млн/мл клеток), чем в первой серии экспериментов. Процент патологических форм сперматозоидов примерно такой же —  $7,3 \pm 0,8\%$ . С первичными дефектами структуры было менее одного процента клеток —  $0,5 \pm 0,1$  и наибольшее число их ( $4,6 \pm 0,5\%$ ) имело третичные повреждения. Сперматозоидов с дефектами акросомы было значительно меньше, чем в сперме быков в первой серии экспериментов —  $3,8 \pm 0,4\%$ .

Таблица 1. Качество свежеполученной и замороженной спермы после разбавления ЦЛЖГ средой с включением комплекса антибиотических веществ

Показатель	Среднее Sx
<i>Свежеполученная сперма</i>	
Подвижность сперматозоидов, баллов	8,0±0,0
Концентрация сперматозоидов, млрд/мл	1,1±0,1
Патологические формы, всего %	7,3±0,8
в т. ч. первичные	0,5±0,1
вторичные	2,1±0,2
третичные	4,6±0,5
Сперматозоидов с поврежденной акросомой, %	3,8±0,4
<i>Замороженная сперма</i>	
Подвижность сперматозоидов, баллов	
ЛЖГ	3,9±0,1
ЦЛЖГ	4,0±0,0
Выживаемость спустя 5 ч, баллов	
ЛЖГ	1,7±0,2
ЦЛЖГ	2,6±0,2
Патологические формы ЛЖГ, всего %	14,2±0,6
в т. ч. первичные	1,5±0,1
вторичные	3,4±0,2
третичные	9,1±0,4
Патологические формы ЦЛЖГ, всего %	10,7±0,7
в т. ч. первичные	1,1±0,1
вторичные	2,7±0,2
третичные	6,9±0,4
Сперматозоидов с поврежденной акросомой, %	
ЛЖГ	8,1±0,6
ЦЛЖГ	6,3±0,3
Бактериологическая обсемененность	
ЛЖГ	отсутствует
ЦЛЖГ	отсутствует

Использование для разбавления 18 этих эякулятов цитратной среды с включением лактозы, наряду с изменением состава санирующих веществ и самой техники санации спермы, а также расфасовка спермы в пайеты способствовали повышению качества замороженной спермы.

Так, если после оттаивания подвижность сперматозоидов при разбавлении ЛЖГ средой составила менее 4 баллов ( $3,9 \pm 0,1$ ), то при разбавлении ЦЛЖГ средой —  $4,0 \pm 0,0$  балла. Выживаемость спустя 5 ч после инкубации при температуре  $38^\circ\text{C}$  при разбавлении стандартной средой  $1,7 \pm 0,2$  баллов, испытываемой средой  $2,6 \pm 0,2$  баллов. Различие по этому показателю достоверно ( $P < 0,05$ ).

Процент патологических форм сперматозоидов в сперме после замораживания и оттаивания в большей мере увеличился при использовании ЛЖГ среды. Особенно заметно было увеличение числа сперматозоидов с третичными повреждениями. Различия между опытными (разбавленными ЦЛЖГ) и контрольными (разбавленными ЛЖГ) образцами спермы по общему проценту патологических форм сперматозоидов, а также по частоте первичных, вторичных и третичных нарушений существенные ( $P < 0,05$ ).

В опытных образцах спермы меньше выявлялось и сперматозоидов с повреждениями акрасомы. Различие также существенное ( $P < 0,05$ ).

Результаты изучения выживаемости сперматозоидов *in vivo* показаны в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Накопление и выживаемость сперматозоидов при осеменении коров спермой, разбавленной ЛЖГ и ЦЛЖГ средами, в начале и в конце охоты

Корова, №	Время осеменения	Среда для разбавления спермы	Введено жидкости, мл	Извлечено жидкости, мл	Число спермиев, млн
167	начало охоты	ЦЛЖГ	10	6,5	—
105	конец охоты	ЦЛЖГ	10	2	<b>0,15*</b>
378	конец охоты	ЦЛЖГ	10	4	3,5
186	начало охоты	ЦЛЖГ	10	7	3,5
378	начало охоты	ЦЛЖГ	10	4	2,0
186	конец охоты	ЦЛЖГ	10	8	<b>4,5*</b>
378	начало охоты	ЛЖГ	10	5	1,5
186	начало охоты	ЛЖГ	10	7	2,5

\* Наличие живых сперматозоидов.

Данные табл. 2 указывают на существенное влияние состояния животного и его половых органов, времени осеменения в течение половой охоты, а также используемой для разбавления спермы среды на накопления сперматозоидов в матке после осеменения и их выживаемость. При введении спермы в конце охоты в промывной жидкости содержалось больше клеток; больше их было и при использовании ЦЛЖГ среды.

**Заключение.** Полученные в экспериментах данные показывают, что применяемая в племпредприятиях республики ЛЖГ среда для разбавления спермы быков не обладает всеми необходимыми для разбавителей свойствами. При сохранении стандартной подвижности сперматозоидов после оттаивания (4 балла) и инкубации в течение 5 ч (1—3 балла), она не в полной мере обеспечивает сохранение структуры сперматозоидов.

Экспериментальные среды на основе цитратного буфера с включением фруктозы или глюкозы, не всегда обеспечивали стандартную активность сперматозоидов после замораживания и оттаивания спермы в гранулах. Лучшие результаты получены при включении в среду лактозы. Однако все варианты цитратной среды уменьшали по сравнению с ЛЖГ средой частоту нарушений макро- и микроструктуры сперматозоидов.

Использование спермы, разбавленной ЦЛЖГ средой, с невысокими показателями лабораторной оценки в практических условиях обеспечивало более высокие, при сравнении с стандартными, показатели оплодотворяемости у первично осемененных коров и телок и у животных, повторивших охоту (в среднем на 23%).

Стабильно высокие показатели качества оттаянной спермы получены при включении в ЦЛЖГ среду комплекса антибиотических веществ и дополнительной санации неразбавленной спермы. При осеменении коров такой спермой увеличивались число накапливаемых в верхушках рогов матки сперматозоидов и продолжительность сохранения подвижности их.

## Литература

1. L o r t o n S. P., S u l l i v a n J. J., B e a n B. et al. Theriogenology. 1988. Vol. 29, N 3. P. 593—607.
2. The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls/ E. M. Stalhammar, L. Janson, J. Phillipson (Uppsala, Sweden). Reproduction nutrition development. RNDEE6. Vol. 34, N 1. P. 37—45.
3. Applied Animal Reproduction / H. Joe Bearden and John W. Fuquay. 1992. P. 114.
4. М и л о в а н о в В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. М., 1962.
5. G a r n e r D. L., J o h n s o n L. A., A l l e n C. H. Flow cytometric comparison of cryopreserved bovine spermatozoa processed in egg-yolk and milk diluents. Uppsala, 1990.
6. S c h e n k J. L., A l l e n C. H., A m a n n R. P. Fertility of bull sperm frozen in test, egg yolk-citrate or homogenized milk. Urbana, 1991.
7. М е д в е д е в Г. Ф., Т у р ч а н о в С. О., П л о т к и н А. М. // Междунар. аграр. журн. 2000, № 1. С. 35—37.

*GUMINSKAYA E. YU.*

### MEDIUM FOR DILUTING OF SPERMS OF BULLS

#### Summary

Lactose-yolk-glycerin medium is used for diluting of sperms of bulls in Government center for artificial insemination. It has developed for freezing of sperm in granules. Two-fractional environments are more effective at packing of sperm into culms. We have developed a medium on a base of citrate buffer and lactose. Sperm diluted with citrate-lactose-yolk-glycerin buffer and cooled in granules or culms had reduced percentage of spermatozoids having damages in the micro- and macro-structure. Use of the sperm for insemination of cows promoted accumulation of greater quantity of spermatozoids in the top layers of horns of uterus and their survival. High level of fertilization has been obtained at insemination of cows and heifers in farms.