

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 2, Number 38 (2017), 254 – 259

Sayed Ajmal Quraishi¹, Ye. M. Toishibekov¹, D. K. Osbanov², D. Ye. Toishybek¹

¹Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan,

²F. M. Mukhamedgaliyev institute of experimental biology, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: toishibekov@yandex.ru

**THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS
OF UNPENETRABLE CRYOPROTECTANT
WITHIN CRYOPROTECTORS ON CASA-PARAMETERS
OF FROZEN-THAWED RAM'S SEMEN**

Abstract. Study of the effect of different concentrations of unpenetrable cryoprotectant for ram semen CASA-parameters showed high viability level of frozen-thawed ram semen after cryoconservation and the optimal concentration was 1,5M glucose and slow freezing (programme freezer Kryoplaner-330).

Keywords: rams, spermatozoa, cryoprotectants, freezing.

УДК 57.086. 13; 57: 536.483

Сайд Аджмал Курайши¹, Е. М. Тойшибеков¹, Д. К. Осбанов², Д. Е. Тойшыбек¹

¹Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан,

²ТОО «Институт экспериментальной биологии им. Ф. М. Мухамедгалиева», Алматы, Казахстан

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ
НЕПЕНЕТРИРУЮЩЕГО КРИОПРОТЕКТАНТА
В СОСТАВЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА CASA-ПАРАМЕТРЫ
ЗАМОРОЖЕНО-ОТТАЯННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ БАРАНОВ**

Аннотация. Проведены исследования по изучению влияния наиболее оптимальных концентраций глюкозы при применении уравновешенного замораживания с использованием программного замораживателя Kryoplaner-330.

Ключевые слова: бараны, сперматозоиды, криопротектанты, замораживание.

Введение. Использование замороженной спермы для искусственного оплодотворения создает ряд преимуществ, но для применения в широкой практике эти процедуры должны быть простыми, и результаты должны быть, по крайней мере, сравнимыми с результатами, которые достигаются при естественном оплодотворении. Эти условия в основном достигнуты для спермы крупного рогатого скота, и показатели оплодотворения замороженной спермой соответствует показателям оплодотворения свежей спермой при естественном оплодотворении. Однако результаты оплодотворения замороженной спермой баранов, хряков и жеребцов сильно отличаются от показателей оплодотворения свежей спермой при естественном оплодотворении.

Ситуация в овцеводстве характеризуется тем, что основано на искусственном цервикальном осеменении с получением низкого уровня оплодотворения по отношению к естественному осеменению. Проведенные многочисленные исследования привели к оптимизации разбавления спермы и методов замораживания и размораживания спермы различных видов животных [1-4].

Исследования за последние 50 лет показали, что приблизительно 50% сперматозоидов выживают после процесса замораживания, выживаемость устанавливали по следующим параметрам: подвижность сперматозоидов и целостность мембран. При этом было выявлено, что существует видовые различия сперматозоидов по биофизическим параметрам: площадь поверхности, объем клеток и мембранная проницаемость воды. Эти биофизические параметры использовались в расчете теоретической модели для оптимизации режимов замораживания сперматозоидов. Как известно, для выявления выживаемости сперматозоидов после замораживания-оттаивания не применяют теоретические методы расчетов как концентрации криопротекторов, так и режимов замораживания, а применяется эмпирический метод путем подбора сочетания криопротектор/режим замораживания. Данный подход обусловлен тем, что размер сперматозоида настолько мал, что применение теоретической модели в настоящее время трудно выполнимо. Применение эмпирического подхода для эффективной криоконсервации сперматозоидов показал, что при использовании различных криопротектантов в составе криопротекторов для замораживания сперматозоидов даже при применении одного режима замораживания, эффективность различных концентраций некоторых криопротектантов. В связи с этим нами были проведены исследования по изучению влияния наиболее оптимальных концентраций глюкозы при применении уравновешенного замораживания с использованием программного замораживателя KryoPlaner-330.

Методы исследований. Образцы спермы собирали с применением электроэякулятора [5]. Для получения новых научных данных о качестве спермы впервые в РК использована система IVOS (интегрированная визуально-оптическая система анализа спермы).

Изучение CASA-параметров сперматозоидов. Качество сперматозоидов изучали с использованием компьютерного автоматизированного анализа сперматозоидов (CASA Hamilton Thome Motility Analyzer, Beverly, MA). Образцы изучаемой спермы разбавляли раствором на основе Tris буфера в соотношении 1:3 (образец спермы: раствор) и разбавленный образец в объеме 5 μ л помещали в стандартизированную камеру (Spectrum Technologies, Healdsburg, CA) и проводили анализ по методике P.Purdy and J.K.Graham [6]. При этом изучались следующие показатели:

Концентрация сперматозоидов, млн./мл; *Концентрация подвижных сперматозоидов*, млн./мл; *Концентрация прогрессивных сперматозоидов*, млн, мл. ; *VAP* Скорость продвижения головки – средняя скорость сглаженного клеточного пути в мкм/сек.; *VSL* Скорость прямолинейного продвижения - средняя скорость, измеряемая прямыми линиями от начала до конца трека; *VCL* Скорость движения сперматозоидов по кривой индивидуальных треков - средняя скорость, измеряемая выше фактического двухточечного трека следования клетки; *STR* Прямолинейность средней траектории движения сперматозоидов - среднее значение пропорции VSL/VAP. STR измеряет расстояние клеточного пути от прямой линии; *LIN* Линейность криволинейной траектории движения сперматозоидов - среднее значение пропорции VSL/VCL. LIN измеряет расстояние клеточного пути от прямой линии; *Elongation (%)* – удлинение головки; *Area (mm)* – площадь головок.

Изучение влияния различных концентраций глюкозы в составе криопротекторов на CASA-параметры свежеполученных сперматозоидов баранов. Для изучения CASA-параметров свежеполученных образцов семени баранов в растворах с различной концентрацией глюкозы: 0,015M; 0,028M; 0,05M; 0,1M и 0,125M.

Изучение влияния различных концентраций глюкозы в составе криопротекторов на CASA-параметры заморожено-оттаянных сперматозоидов баранов. Для изучения влияния концентрации глюкозы в составе криопротекторов (Tris, лимонная кислота, глицерин и желток яйца) на CASA-параметры заморожено-оттаянных сперматозоидов баранов использовали растворы с различной концентрацией глюкозы (0,015M; 0,028M; 0,05M; 0,1M и 0,125M), а в качестве контроля использовали параметры свежеполученных образцов сперматозоидов без замораживания.

Криоконсервация сперматозоидов баранов. Для криоконсервации спермы применяли режим замораживания NAGP (National Center for Genetic Resource Preservation, Fort Collins, ARS, USDA): от температуры 5°C до -5°C замораживали со скоростью 4°C/мин, от -5°C до -110°C со скоростью 25°C/мин, от -110°C до -140°C со скоростью 35°C/мин. Замораживание проводили с применением программного замораживателя KryoPlaner-330 (UK). Затем соломинки погружали в жидкий азот

для хранения. Оттаивали сперму быстро. Соломинки с замороженным семенем помещали в водяную баню при температуре 38-40°C.

Результаты исследований и обсуждение. Влияние глюкозы и ее различных концентраций на CASA-параметры сперматозоидов баранов. Как известно, все новые криопротекторы, используемые для замораживания спермы, должны быть проверены перед практическим применением. Поэтому для проверки эффективности этих криопротекторов необходимы исследования спермы *invitro*.

В ходе эксперимента по изучению влияния глюкозы и ее различных концентраций на CASA-параметры сперматозоидов баранов было выявлено, что наиболее оптимальной концентрацией для разбавления семени баранов является использование 0,100M раствор глюкозы (рисунок 1).

В ходе изучения параметра линейности движения сперматозоидов (LIN) было выявлено, что при использовании глюкозы и ее различных концентраций линейность движения сперматозоидов сохраняется при использовании 0,015M и 0,030M растворов глюкозы (рисунок 2).

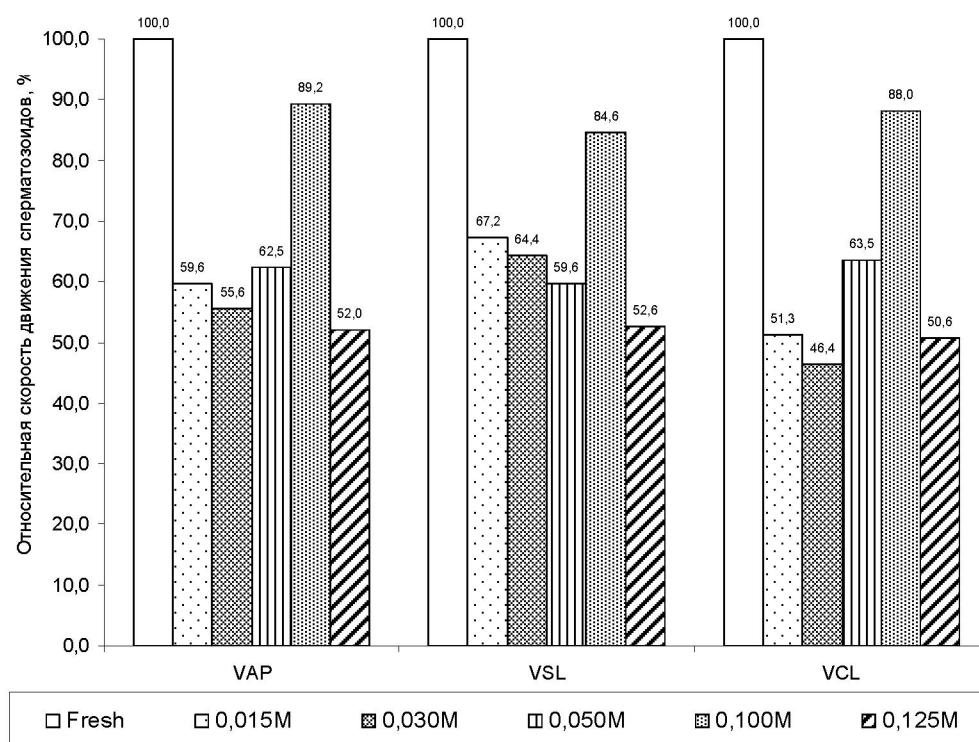


Рисунок 1 – Влияние различных концентраций глюкозы на относительную скорость движения сперматозоидов баранов

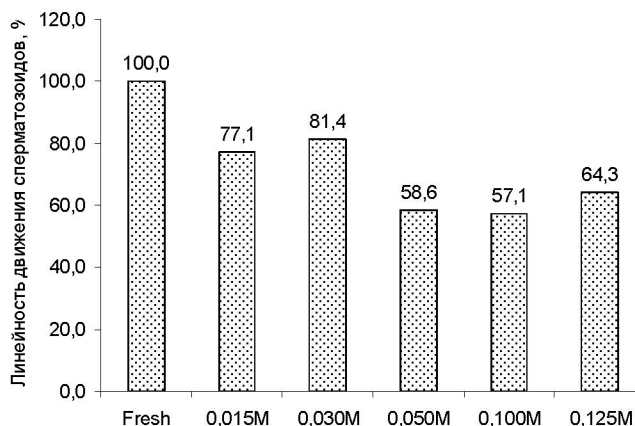


Рисунок 2 – Влияние различных концентраций глюкозы на линейность движения сперматозоидов баранов

Изучен параметр удлинённость головок сперматозоидов, который можно отнести к морфологическим параметрам сперматозоидов, при использовании различных концентраций глюкозы. Выявлено, что наиболее оптимальными концентрациями для разбавления сперматозоидов баранов являются 0,015M, 0,030M, 0,050M и 0,125M растворы глюкозы (рисунок 3).

Также было проведено исследование влияние различных концентраций глюкозы на среднюю площадь головок сперматозоидов баранов, в ходе которого было выявлено, что наиболее оптимальными концентрациями глюкозы для разбавления сперматозоидов баранов являются 0,015M, 0,030M и 0,050M растворы глюкозы (рисунок 4).

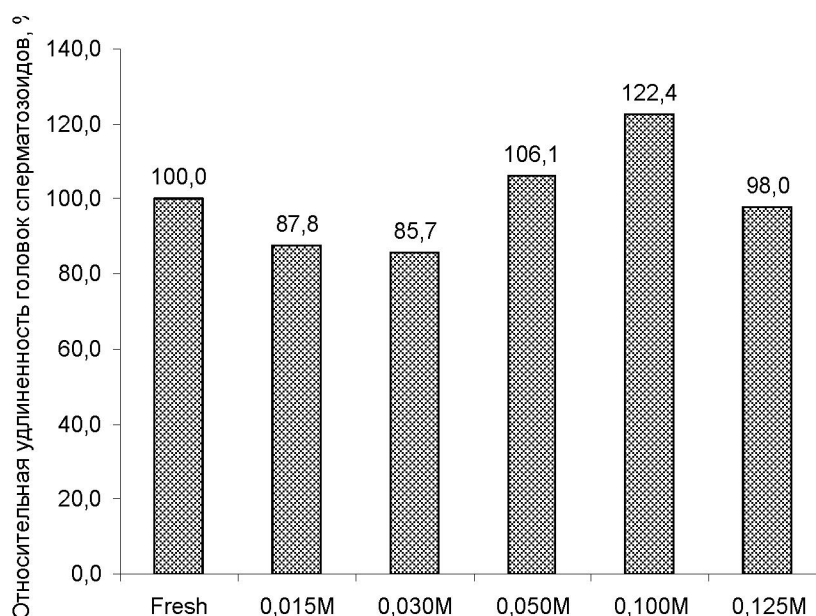


Рисунок 3 – Влияние различных концентраций глюкозы на удлинённость головок сперматозоидов баранов

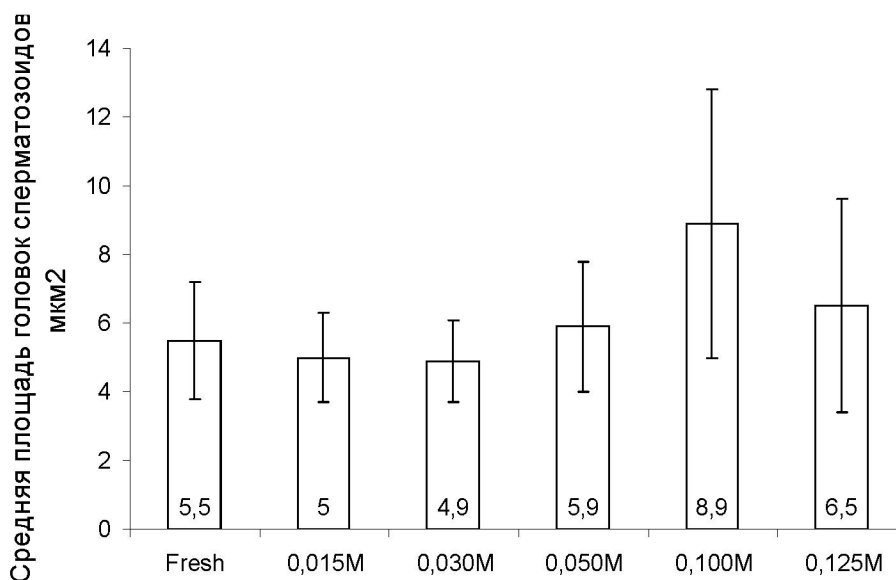


Рисунок 4 – Влияние различных концентраций глюкозы на среднюю площадь головок сперматозоидов баранов

Изучено влияние различных концентраций глюкозы на относительное количество подвижных сперматозоидов и сперматозоидов с прогрессивной подвижностью, которое показало, что наиболее оптимальными является использование 0,050M и 0,100M растворов глюкозы (рисунок 5).

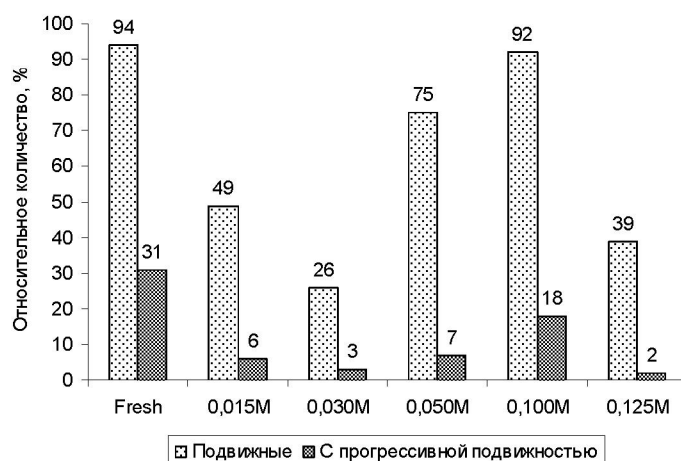


Рисунок 5 – Влияние различных концентраций глюкозы на относительное количество подвижных сперматозоидов и сперматозоидов с прогрессивной подвижностью

Влияние различных концентраций глюкозы в составе криопротекторов на CASA-параметры заморожено-оттаянных сперматозоидов баранов. Важнейшим качественным показателем спермы баранов является количество подвижных сперматозоидов. Экспериментально установлено, что при использовании 0,015M раствора глюкозы процент подвижных сперматозоидов составил 57% и процент сперматозоидов с прогрессивной подвижностью составил 22% (рисунок 6).

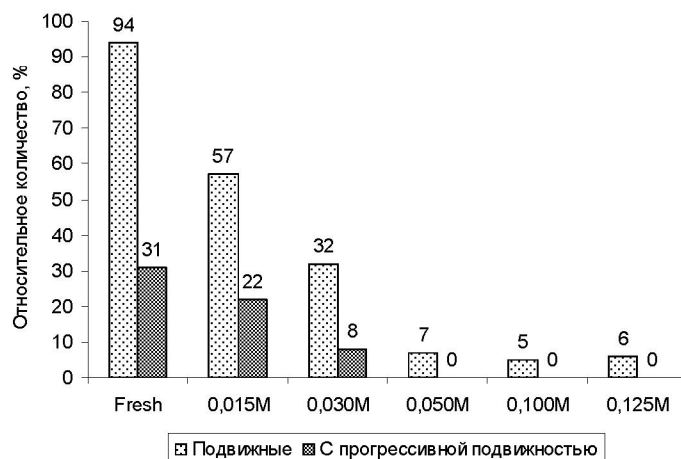


Рисунок 6 – Влияние различных концентраций глюкозы на относительное количество подвижных сперматозоидов баранов (%) и относительное количество сперматозоидов с прогрессивной подвижностью (%) после замораживания-оттаивания

Эти показатели были максимальными при использовании различных концентраций глюкозы в качестве компонента криопротектора.

Таким образом, в ходе проведения исследований по изучению влияния различных концентраций глюкозы на CASA-параметры сперматозоидов баранов было выявлено, что концентрация 0,015M глюкозы в составе криопротекторов является наиболее оптимальной для криосохранения сперматозоидов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Curry M.R., Millar J.D., Watson P.F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations // *Biology of Reproduction*. – 1994. - Vol. 51. – P. 1014-1021.
- [2] Watson P.F. Artificial insemination and the preservation of semen // In Marshall's *Physiology of Reproduction*. – 1990. – Vol. 2. – P. 747-869.

- [3] Pickett B.W., Amann R.P. Cryopreservation of Semen // In Equine Reproduction Eds A.O. McKinnon and J.L. Voss. Lea & Febiger, Philadelphia, P.A. – 1993. – P. 769-789.
- [4] Salamon S., Maxwell W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination // Animal Reproduction Science. – 1995. – Vol. 37. – P. 185-249.
- [5] Evans G., W. M. C. Maxwell. Frozen storage of semen // In: Salamon's artificial insemination of sheep and goats, Butterworths, Wellington, 1987. – P. 85-92.
- [6] Purdy P.H., Graham J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm // Cryobiology. – 2004. – P. 36-45.

REFERENCES

- [1] Curry M.R., Millar J.D., Watson P.F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations // Biology of Reproduction. 1994. Vol. 51. P. 1014-1021.
- [2] Watson P.F. Artificial insemination and the preservation of semen // In Marshall's Physiology of Reproduction. 1990. Vol. 2. P. 747-869.
- [3] Pickett B.W., Amann R.P. Cryopreservation of Semen // In Equine Reproduction Eds A.O. McKinnon and J.L. Voss. Lea & Febiger, Philadelphia, P.A. – 1993. P. 769-789.
- [4] Salamon S., Maxwell W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination // Animal Reproduction Science. 1995. Vol. 37. P. 185-249.
- [5] Evans G., W. M. C. Maxwell. Frozen storage of semen. In: Salamon's artificial insemination of sheep and goats, Butterworths, Wellington, 1987. P. 85-92.
- [6] Purdy P.H., Graham J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm // Cryobiology. 2004. P. 36-45.

Сайд Аджмал Курайши¹, Е. М. Тойшибеков¹, Д. К. Осбанов², Д. Е. Тойшыбек¹

¹Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан.

²Ф. М. Мұхамедғалиев атындағы эксперименталды биология институты, Алматы, Қазақстан

КРИОПРОТЕКТОР ҚҰРАМЫНДАҒЫ КРИОПРОТЕКТАНТАРДЫҢ ӘРТҮРЛІ КОНЦЕНТРАЦИЯЛАРЫНЫҢ МҰЗДАТЫЛҒАН ҚОШҚАР ШӘУЕТІНІҢ CASA-ПАРАМЕТРЛЕРІНЕ ӘСЕРІ

Аннотация. KryoPlaner-330 программалық мұздату кезіндегі криопротектор құрамындағы криопротектанттардың оптималды концентрациясы қошқар шәуетінің CASA-параметрлері зерттелінді.

Түйін сөздер: қошқар, шәует, криопротектанттар, мұздату.