

УДК 636.082.12:573.6.086.83

*Е. М. ТОЙШИБЕКОВ, М. ТОЙШИБЕКОВ, Г. А. ВАЛИЕВА,  
С. М. АСКАРОВ, Д. А. ТОКТАБЕКОВ, Б. Б. МОЛЖИГИТОВ*

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ХРЯКОВ

(ТОО «Институт экспериментальной биологии им. Ф. М. Мухамедгалиева»)

В наших исследованиях объектом исследований являются хряки семиреченской и крупной белой пород. Исследования по изучению криорезистентности семени хрячков, достигших половой зрелости, показывали, что наиболее оптимальный возраст хряков для использования в качестве доноров сперматозоидов для криоконсервации являются 24 и 36 месяцев.

Казахстан, являющийся крупным производителем зерновых и кормовых культур, располагает огромной возможностью производства кормов, что позволяет вести свиноводство на промышленной основе. Республика, будучи многонациональной и поликонфессиональной страной, должна создать многообразие продуктов животноводства, в том числе и свиноводства. Научные основы развития свиноводства в стране разработаны коллективом Института экспериментальной биологии созданием в стране единственной отечественной семиреченской породы свиней на основе гибридизации домашних и диких форм. В республике получило широкое распространение разведение свиней крупной белой породы, которые отличаются высокими сальными качествами, тогда как по показателям мясных качеств отечественная семиреченская порода значительно превосходят животных завозных пород. Эти животные в силу присутствия в их геноме генов диких кабанов отличаются высокой приспособленностью к условиям юго-востока Казахстана и способны потреблять как подножные, так и специально приготовленные корма. По данным С. У. Калдыбаева [1], одного из авторов породы, свиньи семиреченской породы отличаются более высокой оплатой корма мясом.

Известно, что свиньи имеют множество хозяйствственно-полезных и биологических признаков, которые ученые - селекционеры стараются сохранить на высоком уровне как у каждого животного, так и у породы в целом. Становится очевидным, что значительно легче совершенствовать отдельные признаки у популяций, линий и семейств, составляющих генетическую структуру отдельных пород [2].

Следовательно, данная порода, поголовье которой в настоящее время сильно сократилось,

а племенные хозяйства по их разведению ликвидированы, нуждается в разработке и осуществлении мер по их сохранению. Важнейшим инструментом достижения этих целей является разработка методов длительного хранения гермоплазмы этих ценных животных с целью совершенствования и расширения их генетической структуры.

**Методы исследований:** Сбор спермы проводили с использованием чучела свиноматки в искусственную вагину с использованием электроэякулятора. Для анализа сперматозоидов использовали компьютерную систему анализа подвижности сперматозоидов CASA Hamilton Thorn IVOS (Hamilton Thorn, USA).

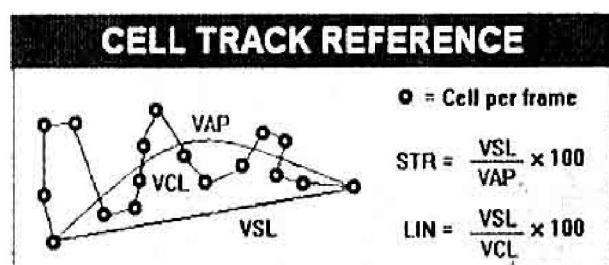
Основные параметры исследований сперматозоидов:

- 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

Соотношения клеточного трека. Несмотря на то, что данное окно напрямую не влияет на исследование, оно представляет графический обзор трех измерительных параметров скорости (VSL, VAP и VCL), и как они используются для подсчета прямолинейности средней траектории движения сперматозоидов STRAIGHTNESS и линейности криволинейной траектории движения сперматозоидов LINEARITY (рисунок).



Соотношения клеточного трека

#### Tris-F-EDTA:

Охлаждающий разбавитель (Cooling Extender) 100 мл. pH 7,0

1.	Tris	0,06 г
2.	Фруктоза	5 г
3.	Глюкоза	0,5 г
4.	EDTA	0,125 г
5.	Желток яйца	20 мл

Замораживающий разбавитель (Freezing Extender)

1.	Глицерин	7%
----	----------	----

#### ГЖ-глюкоза:

Охлаждающий разбавитель (Cooling Extender) 100 мл. pH 7,0

1.	Глюкоза	0,8 г
2.	Желток яйца	20 мл

Замораживающий разбавитель (Freezing Extender)

1.	Глицерин	7%
----	----------	----

Перед разбавлением среду обязательно проверяли на пригодность методом смешивания капель (сперма-среда), подвижность спермиев после разбавления должна быть не ниже, чем до смешивания спермы со средой.

Разбавление спермы проводили двухступенчатое, конечное разбавление семени криопротектором доводили до 200 млн.кл./мл. Разбав-

часть собранного образца разбавляли раствором и помещали в одноразовые камеры, в которых распределение слоя не превышало 10 мкм, это обусловлено тем, что исходя из нее, рассчитывалась концентрация сперматозоидов в объеме эякулята, что в дальнейшем позволяло проводить равнное разбавление спермы криопротектором.

Изучение этих параметров необходимо для оценки качества спермы, так как в дальнейших исследованиях использовались только те образцы семени, которые соответствовали требованиям:

- концентрация сперматозоидов не менее 2,5 млрд./мл.;
- концентрация подвижных сперматозоидов не менее 2 млрд./мл.;
- *STR* прямолинейность средней траектории движения сперматозоидов не менее 70%.
- *LIN* линейность не менее 70 %.

В экспериментах использовали два криопротектора: Tris-F-EDTA и ГЖ-глюкоза.

ленную сперму расфасовывали с помощью вакуумной камеры в силиконовые соломинки вместимостью 0,5 мл (CryoBioSystem, France). После расфасовки спермы открытые концы соломин герметизировали с помощью специального клея и раскладывали в штатив - рамку, которую ставили в холодильник на 2 часа для постепенного охлаждения до 5°C.

Замораживание проводили в трёх различных режимах:

1. Замораживание в парах азота на высоте 4 см от уровня жидкого азота.
2. Замораживание в парах азота на высоте 5 см от уровня жидкого азота.
3. Замораживание в парах азота на высоте 6 см от уровня жидкого азота.

Оттаивание замороженных образцов проводили в водяной бане при температуре 50 °C в течение 5 мин, затем образцы помещали в CASA-анализатор для изучения параметров подвижности и выявления относительного количества подвижных сперматозоидов и сперматозоидов с прогрессивной подвижностью.

**Результаты исследований.** При проведении эксперимента по изучению оплодотворяющей способности замороженно-оттаянных сперматозоидов хряков было выявлено, что относительное количество подвижных сперматозоидов после замораживания-оттаивания при использовании криопротектора Tris-F-EDTA составило 17% и относительное количество сперматозоидов с прогрессивной подвижностью составило 5%. А при использовании криопротектора ГЖ-глюкоза относительное количество подвижных сперматозоидов после замораживания-оттаивания составило 21% и относительное количество сперматозоидов с прогрессивной подвижностью составило 7%.

Замороженно-оттаянную сперму использовали для искусственного осеменения свиноматок в количестве 6 голов. В ходе опороса были получены 5 поросят после осеменения свиноматок замороженно-оттаянными сперматозоидами при использовании криопротектора Tris-F-EDTA, что составило 16% от теоретически возможного количества поросят в опоросах. При использовании спермы, замороженной с использованием криопротектора ГЖ-глюкоза, были получены 7 поросят, что составило 23,3% от теоретически возможного количества поросят в опоросах.

Таким образом, использование криопротектора Tris-F-EDTA и режима замораживания в парах азота на высоте 6 см от уровня жидкого азота является более эффективным по сравнению с использованием криопротектора ГЖ-глюкоза. В дальнейшем планируется проведение исследований различных криопротекторов и разных режимов замораживания для выявления наиболее эффективного способа криоконсервации спермы хряков.

В результате исследований по изучению свежеполученных образцов семени хряков 12-месячного и 24-месячного возраста были получены следующие данные. У хрячков 12-месячного возраста объем эякулята соответствовал 150-180 мл. Средняя скорость слаженного продвижения головки сперматозоидов (*VAP*) составила  $54,67 \pm 2,37$  мкм/сек; скорость прямолинейного продвижения (*VSL*) составила  $40,12 \pm 1,69$  мкм/сек; скорость движения сперматозоидов по кривой индивидуальных треков (*VCL*) составила  $101,85 \pm 3,45$  мкм/сек; среднее отклонение головки (*ALH*) составило  $7,91 \pm 1,19$  мкм; частота колебательных движений (*BCF*) составила  $26,75 \pm 1,49$  Hz; прямолинейность траектории *STR* составила  $71,41 \pm 1,82\%$ ; линейность криволинейной траектории (*LIN*) составила  $37,12 \pm 1,54\%$ ; удлинение головки составило  $38,65 \pm 3,62\%$  и средняя площадь головок составила  $4,97 \pm 2,59$  мкм<sup>2</sup>.

При изучении CASA-параметров свежеполученных образцов семени хряков 24-месячного возраста были получены следующие данные. Объем эякулята соответствовал 210-230 мл. Средняя скорость слаженного продвижения головки сперматозоидов (*VAP*) составила  $63,87 \pm 2,31$  мкм/сек; скорость прямолинейного продвижения (*VSL*) составила  $45,67 \pm 2,47$  мкм/сек; скорость движения сперматозоидов по кривой индивидуальных треков (*VCL*) составила  $115,73 \pm 3,79$  мкм/сек; среднее отклонение головки (*ALH*) составило  $6,86 \pm 2,48$  мкм; частота колебательных движений (*BCF*) составила  $31,73 \pm 1,43$  Hz; прямолинейность траектории *STR* составила  $70,96 \pm 1,27\%$ ; линейность криволинейной траектории (*LIN*) составила  $39,85 \pm 2,27\%$ ; удлинение головки составило  $40,68 \pm 1,15\%$  и средняя площадь головок составила  $5,63 \pm 1,24$  мкм<sup>2</sup>.

При изучении CASA-параметров свежеполученных образцов семени хряков 30-35 месячного возраста были получены следующие данные. Объем эякулята соответствовал 200-250 мл. Средняя скорость слаженного продвижения головки сперматозоидов (*VAP*) составила  $64,00 \pm 1,40$  мкм/сек; скорость прямолинейного продвижения (*VSL*) составила  $45,48 \pm 0,71$  мкм/сек; скорость движения сперматозоидов по кривой индивидуальных треков (*VCL*) составила  $118,98 \pm 3,51$  мкм/сек; среднее отклонение

головки (*ALH*) составило  $6,50 \pm 0,20$  мкм; частота колебательных движений (*BCF*) составила  $31,50 \pm 0,32$  Hz; прямолинейность траектории *STR* составила  $71,25 \pm 0,85\%$ ; линейность криволинейной траектории (*LIN*) составила  $40,25 \pm 1,38\%$ ; удлинение головки составило  $41,00 \pm 0,91\%$  и средняя площадь головок составила  $5,25 \pm 0,12$  мкм<sup>2</sup>.

В ходе проведения сравнения CASA-параметров сперматозоидов хряков разных возрастов было выявлено, что по изучаемым параметрам сперматозоиды хряков 12-ти месячного, хряков 24-х месячного и хряков 36-ти месячного возрастов возраста не отличаются.

При изучении подвижности было выявлено следующее: относительное количество подвижных сперматозоидов в эякулятах хряков 12-ти месячного возраста составило  $76,62 \pm 3,49\%$ ; относительное количество подвижных сперматозоидов с прогрессивной подвижностью в эякулятах составило  $39,72 \pm 5,87\%$ . При анализе сперматозоидов после разбивки по классам было выявлено, что относительное количество быстрых сперматозоидов составило  $42,75 \pm 1,53\%$ ; относительное количество сперматозоидов со средней скоростью движения  $29,56 \pm 1,42\%$ ; относительное количество сперматозоидов с медленной скоростью движения  $9,15 \pm 1,23\%$  и относительное количество неподвижных сперматозоидов  $14,16 \pm 1,59\%$ .

При изучении подвижности было выявлено следующее: относительное количество подвижных сперматозоидов в эякулятах хряков 24-месячного возраста составило  $86,25 \pm 0,25\%$ ; относительное количество подвижных сперматозоидов с прогрессивной подвижностью в эякулятах составило  $43,15 \pm 1,0\%$ . При анализе сперматозоидов после разбивки по классам было выявлено, что относительное количество быстрых сперматозоидов составило  $48,75 \pm 0,75\%$ ; относительное количество сперматозоидов со средней скоростью движения  $30,75 \pm 1,75\%$ ; относительное количество сперматозоидов с медленной скоростью движения  $8,00 \pm 1,0\%$  и относительное количество неподвижных сперматозоидов  $12,50 \pm 1,50\%$ .

При изучении CASA-параметров сперматозоидов хряков 36-ти месячного возраста было выявлено следующее: относительное количество подвижных сперматозоидов в эякулятах составило  $86,50 \pm 0,65\%$ ; относительное количество подвижных сперматозоидов с прогрессивной

подвижностью в эякулятах составило  $43,50 \pm 0,65\%$ . При анализе сперматозоидов после разбивки по классам было выявлено, что относительное количество быстрых сперматозоидов составило  $47,50 \pm 1,04\%$ ; относительное количество сперматозоидов со средней скоростью движения  $30,50 \pm 1,55\%$ ; относительное количество сперматозоидов с медленной скоростью движения  $7,50 \pm 0,65\%$  и относительное количество неподвижных сперматозоидов  $12,56 \pm 1,85\%$ .

Анализ результатов параметров свежеполученных сперматозоидов в эякулятах хряков семиреченской породы разных возрастов выявил, что у хряков 12-месячного возраста относительное количество подвижных сперматозоидов и сперматозоидов с прогрессивной подвижностью меньше, чем хряков 24-х и 36-месячных возрастов. Достоверность различия по методу Стьюдента-Фишера составила  $P > 0,95$ . По спермопродуктивности и качеству сперматозоидов у исследованных 24-х и 36-ти месячных хряков достоверных отличий не выявлено.

CASA-анализ сперматозоидов хряков разных возрастов выявил, что использование хряков 12-ти, 24-х и 36-ти месячного возраста в качестве доноров спермы для дальнейших исследований по криоконсервации сперматозоидов является возможным и целесообразным.

На основании результатов исследований по изучению количественных и качественных показателей семени хряков разных возрастов было выявлено, что сперматозоиды хряков 12-ти, 24-х и 36-месячных хряков по изученным показателям являются нормальными и продуцируются в достаточном объеме для успешного оплодотворения. Далее было изучена криорезистентность семени хряков разных возрастов, при которой было выявлено, что наиболее оптимальными сочетаниями *криопротектор/режим замораживания* для криоконсервации сперматозоидов 12-месячных хряков является сочетание *ГЖ-глюкоза/4 см*, при котором наблюдались следующие показатели: относительное количество подвижных сперматозоидов составило – 25% и относительное количество сперматозоидов с прогрессивной подвижностью составило – 7%.

При изучении CASA-параметров заморожено-оттаянных сперматозоидов 24-месячных хряков наибольшее относительное количество подвижных сперматозоидов составило - 29% и

относительное количество сперматозоидов с прогрессивной подвижностью – 11% при использовании сочетания ГЖ-глюкоза/4 см.

Далее была изучена криорезистентность сперматозоидов 36-месячных хряков, которая выявила наиболее оптимальное для криосохранения сочетание ГЖ-глюкоза/4 см, после которого относительное количество подвижных сперматозоидов составило 29% и сперматозоидов с прогрессивной подвижностью - 12%. А также положительную эффективность применения сочетания Tris-F-EDTA/4 см, после которого относительное количество подвижных сперматозоидов составило 24% и сперматозоидов с прогрессивной подвижностью - 9%.

Таким образом, исследования по изучению криорезистентности семени хрячков, достигших половой зрелости, что наиболее оптимальный возраст хряков для использования в качестве доноров сперматозоидов для криоконсервации являются 24 и 36 месяцев. Наиболее оптимальными сочетаниями для криоконсервации сперматозоидов хряков являются ГЖ-глюкоза/4 см.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Калдыбаев С.У., Дьяченко О.В. и др. Генотипические и биологические особенности новой популяции семиреченских свиней специализированной продуктивности // Мат. межд. научно-практ. конф., посв. проблемам животноводства. Алматы: Госагроуниверситет, 2004 (19-20 мая).
2. Аскаров С.М., Дьяченко О.В., Калдыбаев С.У., Тойшибеков Е.М. Изучение белков сыворотки крови эмбрионов и новорожденных семиреченских свиней темнобурой популяции и крупной белой породы // Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. Алматы, 2005. № 1. С. 49.

## Резюме

Біздің тәжірибемізде зерттеу нысаны Жетісу және ірі ақ шошқа тұқымдары болды. Жыныстық жетілген доныздардың үркіттерінің криорезистенттілігін зерттеңде криоконсервациялау үшін сперматозоид беретін донор ретінде доныздардың тиімді жасы 24 пен 36 айлықтар екенін көрсетті.

## Summary

The objects of our research are boars of Semirechenskaya and large white pig breeds. Research of cryoresistance of boar semen showed that the most optimal age of boar for semen being collected for cryopreservation were 24 and 36 months.