

УДК 636.03

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В ВОСПРОИЗВОДСТВЕ**Б.С. Иолчиев, О.Э. Бадмаев, П.М. Кленовицкий, А.В. Таджиева, Н.А. Комбарова***ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская область, п. Дубровицы, Россия*

Одним из главных глобальных проблем человечества является продовольственная безопасность. В решении данной проблемы важнейшую роль играет сельское хозяйство, в частности животноводство. Отрасль является не только одним из основных источников продуктов питания, она также обеспечивает ряд отраслей легкой промышленности сырьем. Увеличивается спрос на белок животного происхождения, при этом сокращаются площади сельхозугодий (1). Решение проблемы требует совершенствования существующих и разработки более эффективных методов разведения сельскохозяйственных животных. Спектр использования методов биотехнологии в животноводстве охватывает воспроизводство, ветеринарию и производство продукции (2). Использование методов биотехнологии позволяет увеличить темп и эффективность селекции. Искусственное осеменение и криоконсервация являются наиболее широко применяемыми биотехнологическими методами, используемыми в животноводстве. Данные методы позволяют осуществить бессрочное сохранение генетического материала и его распространение.

Биологический материал при использовании вспомогательной репродуктивной технологии подвергается различной технологической обработке, что может оказать отрицательное влияние на его качество. Мужская генеративная плазма должна отвечать высоким требованиям, на практике часто требуется проводить процедуру подготовки генеративной плазмы.

Генеративная плазма является разнородной, в ней содержатся клетки, отличающиеся активностью, морфометрическими параметрами, степенью фрагментации ядерной ДНК в хроматине. В популяции не все сперматозоиды имеют прямолинейное поступательное движение, часть клеток бывают мертвыми, неподвижными или имеют непрямолинейное движение. Продукты распада мертвых сперматозоидов оказывают негативное влияние на живые клетки. Разрабатываются различные методы дифференцировки сперматозоидов на две популяции: с прямолинейным прогрессивным движением, с маневренным движением и неподвижные (3,4). Единого мнения об эффективности использования методов и протоколов подготовки генеративной мужской плазмы не существует (5–8).

На современном этапе наиболее часто используемым методом является флотация «swim-up» (всплытие). Метод основан на способности сперматозоидов мигрировать в половых путях, для этого была разработана биологическая жидкость близкая по параметрам цервикальной слизи. Исследования показывают, что каждый из используемых методов для разделения сперматозоидов на различные популяции имеют недостатки и преимущества. Метод «swim-up» является наиболее эффективным для отбора сперматозоидов с нормальной ядерной ДНК (9). Недостатком метода считается то, что с его помощью невозможно отделить микроорганизмы от спермы (10).

Цель – использование метода флотации (swim-up) для улучшения репродуктивных показателей быков-производителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены в лаборатории клеточной инженерии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста». Объектом исследования являлись свежеполученной спермы быков-производителей голштинской породы (n=3). Процедуру «swim-up» выполняли с использованием среды для подготовки сперматозоидов фирмы «ПанЭко».

Для оценки биологической полноценности спермы использовали комплекс методов: активность сперматозоидов и морфологию определяли с помощью программы компьютерной оценки качества спермы CASA (computer-assisted semen analysis) «ArgusSoft»; для оценки морфологии и состояния акрасом сперматозоидов препараты окрашивали с помощью набора «Дифф-Квик»; фрагментацию ядерной ДНК в сперматозоидах изучали с помощью акридин-оранжевого теста (АОТ); для микроскопии использовали микроскоп «Nikon Eclipse Ni», оснащенный камерой «Nikon DS-Qi2» с высоким разрешением (4908½3264) («Nikon», Япония); для статистического анализа полученных данных использовали программу «SPSSv.15.0». Проводили многомерный статистический анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В свежеполученной сперме содержание сперматозоидов с прогрессивно-поступательным движением в среднем составило 76,12±5,3 %, более 13 % сперматозоидов имели непрогрессивное движение, и 10,82±2,1 % были неподвижными (табл. 1). Содержание сперматозоидов с аномальной морфологией в этих образцах в среднем составило 11,34±0,86 %, индекс фрагментации яДНК -8 %.

Таблица 1 Спермограмма быков-производителей в зависимости от процедуры обработки

Показатели	Свежеполученная сперма	Сперма после процедуры «swim up»
Содержание сперматозоидов: прогрессивно-подвижные, %	76,12±5,30	98,43±3,1**
непрогрессивно подвижные, %	13,06±1,02	1,57±0,05**
неподвижные, %	10,82±2,10	-
с патологической морфологией, %	11,34±0,86	5,27±0,12**
с интактными акросомами, %	90,7±5,3	88,3±1,8
Индекс фрагментации яДНК, %	8,5±1,5	4,0±0,5**

В образцах, полученных после процедуры «swim-up», содержание прогрессивно-подвижных сперматозоидов составило 98,43 %, разница между свежеполученной спермой и после процедуры «swim-up» статистически достоверна на уровне (P<0,01). Содержание клеток с патологической морфологией уменьшилось в 2,15 раза ((P<0,01). После процедуры «swim-up» в исследуемых слайдах содержание сперматозоидов с нарушением генетического материала в хроматине составило 4,0 %, что меньше более чем в 2 раза до процедуры «swim-up».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показывают, что использование метода флотации (всплытие живых сперматозоидов) позволяет улучшить фертильности самцов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № РФФИ № 18-016-00128 А

ЛИТЕРАТУРА

1. О.К. Суховольский. Значение биотехнологии в современном животноводстве // Известия СПбГАУ. 2019. № 1.с. 102–107.
2. Мамонтова Т.В., Айбазов А.М., Русакова О.С. Современные тенденции развития мирового и российского рынка биотехнологий в животноводстве // Сборник научных трудов ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. 2014. Т.2. № 7. с. 292–300.
3. Сингина Г.Н., Тарадайник Т.Е., Шедова Е.Н., Данч С.С. Оценка эффективности получения эмбрионов крупного рогатого скота in vitro с использованием спермы, разделенной по полу // Достижения науки и техники АПК Т.29. № 12. 2015 г. – С. 95–97.
4. Volpes A., Sammartano F., Rizzari S., Gullo, Marino A., and Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm pre S.pparation during in vitro fertilization procedures // J Assist Reprod Genet. 2016 Jun; 33(6): 765–77.
5. Barroso G, Chaya M, Bolaños R, Rosado Y, García León F, Ibarrola E. Prognostic value on recovery rates for the application of sperm preparation techniques and their evaluation in sperm function. Ginecol Obstet Mex. 2005; 73 (5):221–228.
6. Brandeis VT, Manuel MT. Effects of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology, and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. J Assist Reprod Genet.1993; 10 (6):409–416.
7. Плосконос М.В., Николаев А.А. Апоптоз и мужская фертильность // Врач. – 2014. – № 3. – С. 23–25.
8. Плосконос М.В. Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека // Клин. лаб. диаг. – 2014. – Т. 59, № 11. – С. 22–25.
9. Воробьева О.А., Воскресенская А.В., Одинцов А.А. и др./ Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? // Пробл. репрод. – 2005. – № 6. – С. 56–62.
10. Tomlinson M.J., Moffatt O., Manicardi G.C. et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception // Hum. Reprod. – 2001. – Vol. 16. – № 10. – P. 2160–2165.