

27. Мاستицкий, С. Э. Визуализация данных с помощью ggplot2 / С. Э. Мاستицкий. – Москва : ДМК Пресс, 2017. – 222 с.

28. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca L.*) / O. Linhart [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2003. – Vol. 19. – P. 177-181.

29. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish / E. Rurangwa [et al.] // Aquaculture. – 2004. – Vol. 234. – P. 1-28.

30. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) Sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation / S. Mohammad [et al.] // Reviews in Fish Biology and Fisheries. – 2012. – Vol. 22. – P. 861-886.

Поступила 5.03.2018 г.

УДК 636.4:612.621.5

Д.М. БОГДАНОВИЧ, Т.Н. БРОВКО, И.Н. ШЕВЦОВ,
О.И. ГЛИВАНСКАЯ, Н.А. ГРОДНИКОВА

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ ПОЛНОЦЕННОСТЬ И САНИТАРНОЕ КАЧЕСТВО СПЕРМЫ ХРЯКОВ

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

В эякулятах с добавлением rhLF в количестве 10 и 15 мг/литр разбавителя наиболее стабильны значения физико-химических показателей (рН и осмоса), минимальна степень дистальных цитоплазматических капель, отсутствуют условно-патогенные и патогенные микроорганизмы. Кроме того, установлены более высокие показатели подвижности половых гамет хряков за 24, 48 и 72 часа хранения.

Ключевые слова: антибиотики, морфология, осмос, патологические формы, подвижность, рекомбинантный лактоферрин человека, санация, сперма, хряки-производители.

D.M. BOGDANOVICH, T.N. BROVKO, I.N. SHEVTSOV, O.I. GLIVANSKAYA,
N.A. GRODNIKOVA

EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN ON BIOLOGICAL FULL VALUE AND SANITARY QUALITY OF BOARS' SEMEN

RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus on Animal Husbandry»

The physical and chemical parameters (pH and osmosis) are the most stable, the degree of distal cytoplasmic drops is minimal, and the conditionally pathogenic and pathogenic microorganisms are absent in ejaculates with rhLF added in the amount of 10 and 15 mg/liter of the diluent. In addition, higher rates of mobility of boars' gamete for 24, 48 and 72 hours of storage were determined.

Key words: antibiotics, morphology, osmosis, pathological forms, mobility, recombinant human lactoferrin, sanitation, semen, producing boars.

Введение. Искусственное осеменение в свиноводстве является основным методом воспроизводства животных и селекционно-генетической работы. Его эффективность в значительной степени зависит от санитарного качества спермы производителей [1, 2]. Одним из факторов, определяющих её биологическую ценность, является загрязнённость условно-патогенной и непатогенной микрофлорой, попадающей из мочеполовых путей производителей или во время взятия, исследования и хранения эякулятов [3].

Известно, что число микроорганизмов в семени хряков колеблется от нескольких тысяч до нескольких миллионов в 1 см³. Уровень бакобсеменённости ниже 50 тыс. бакт./ 1 см³ считается слабым, выше 150 тыс./ 1 см³ – сильным. В то же время есть мнение, что в сперме хряков не должно содержаться каких-либо болезнетворных микроорганизмов. Увеличенное количество микроорганизмов в эякулятах может деструктивно влиять на качество спермы, в том числе на подвижность и выживаемость, за счёт выделяемых ими токсинов и продуктов метаболизма. Вирусные и бактериальные патогенные факторы, имеющиеся в семени хряка, могут быть ответственны за потерю пренатальных поросят. Так, по некоторым данным, около 30-40 % зародышей гибнет в течение первых 4 недель в результате воспалительных процессов в матке, затрудняющих их имплантацию [4]. В сперме обнаруживаются такие возбудители, как: *Brucella suis*, *Leptospira* spp., *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., вирус Ауески и др. [5]. Они выделяют продукты своей жизнедеятельности и токсины, которые снижают выживаемость и оплодотворяющую способность спермиев. Кроме того, в эякулятах могут содержаться возбудители инфекционных болезней. У заражённых хряков наблюдается уменьшение количества эякулята, снижение подвижности спермиев. Продукты жизнедеятельности микроорганизмов также негативно воздействуют на клетки мембран акросом, что ослабляет их акросомную реакцию [6]. Морфологические изменения спермиев могут продолжаться до 13 недель с момента заражения [4, 7].

В связи с этим подтверждается потребность проведения на станциях и пунктах искусственного осеменения обязательной проверки спермы на бакобсеменённость и использование различных видов антибиотиков в качестве обязательного компонента сред для разбавления свежеполученных эякулятов, при этом санирующие препараты должны не только обладать широким спектром действия, но и отрицательно не влиять на качество спермы [1, 2, 4].

Поиск безопасных веществ подобного назначения и методов их применения – актуальнейшая проблема животноводства, так как повышение продуктивности животных и, соответственно, получение конкурентоспособной продукции диктуется всевозрастающей экономической необходимостью, а с другой стороны, произведённая про-

дукция должна обладать безупречными экологическими характеристиками [8].

Одним из таких веществ является белок женского молока – лактоферрин. Основной его особенностью является способность специфически связывать ионы железа и некоторых других переходных металлов. К функциям, в основе которых предположительно лежит комплексобразующая способность лактоферрина, относят бактериостатическое, бактерицидное, фунгицидное, детоксицирующее действие [9].

Лактоферрин проявляет антибактериальную активность по отношению к грамположительным, грамотрицательным бактериям и к некоторым актиномицетам посредством связывания ионов железа, лишая бактерии жизненно важного микроэлемента, ингибируя рост микроорганизмов и экспрессию вирулентных факторов [10].

Предполагаемый механизм фунгицидного действия связан с нарушением целостности клеточной стенки, что обусловлено прямым воздействием белка с клеточной поверхностью *Candida*. Кроме того, лактоферрин проявляет фунгицидную активность, стимулируя иммунные механизмы защиты [9].

Описаны механизмы противовоспалительного действия лактоферрина, заключающиеся в подавлении транскрипционных факторов. Данный белок связывает свободное железо, накопленное в поражённых тканях, и катализирует образование токсичных гидроксильных радикалов, оказывая, таким образом, противовоспалительную функцию [11]. В этой связи представляет особый научный и практический интерес изыскание и апробация новых способов санации спермы в технологии искусственного осеменения свиней, поэтому **целью наших исследований** явилось изучение возможности использования рекомбинантного лактоферрина человека для санации спермы при разбавлении эякулятов хряков-производителей.

Материал и методика исследований. Исследования были проведены в ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области на клинически здоровых хряках-производителях породы йоркшир в возрасте 18-24 мес., а также в лаборатории воспроизводства, трансплантации эмбрионов и трансгенеза животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Получение, оценка и разбавление спермопродукции проводилось согласно «Инструкции по искусственному осеменению свиней» [8].

В качестве разбавителя использовалась стандартная ГХЦС-среда, биологически активного вещества – рекомбинантный лактоферрин человека (rhLF), полученный из молока коз-продуцентов rhLF, содержащихся на Биотехнологическом научно-экспериментальном производстве по трансгенезу животных (д. Будагово) Минской области. Оценка

спермы проводилась на компьютерном спермоанализаторе «Spermvision» (Minitube) по следующим показателям: подвижность, балл; проксимальные цитоплазматические капли, %; дистальные цитоплазматические капли, %; аномалия хвоста, %.

Физико-химические показатели спермы изучались с применением рН-метра Hanna (Италия) и осмометра Fiske-210 (USA).

Каждый разбавленный без применения антибиотика эякулят делился на 5 равных частей (по 100 мл). При этом одна часть являлась контрольной с добавлением гентомицина из расчёта 40 мг на 1 литр разбавителя, остальные – опытными, в которые был введён рекомбинантный лактоферрин человека из расчёта 5, 10, 15 и 25 мг на 1 литр разбавителя. Оценка качества эякулята проводилась в течение 72 часов хранения при температуре 16-18 °С.

Санитрующие свойства определяли по следующим показателям: коли-титр, мл; общее микробное число – количество микробных тел в 1 мл спермы; наличие патогенных грибов.

Определение общего микробного числа (ОМЧ) микроорганизмов в 1 мл спермы проводили по следующей методике. Разбавленную сперму помещали на 2 % мясопептонный агар. Затем высевали из среды стерильной градуированной пипеткой в количестве 1,0 см³ в чашки Петри из расчёта не менее трёх чашек на каждое разведение и равномерно распределяли по всей поверхности агара покачиванием чашек. Приготовленную посуду с посевами устанавливали в термостат при температуре 37±0,5 °С и инкубировали в течение 48 часов, после чего проводили подсчёт колоний, выросших на поверхности агара, и определяли число микробных тел в 1 дозе (микробное число).

Определение коли-титра проводили по следующей методике. Разбавленные эякуляты в количестве 1,0 см³ вносили в пробирку со средой Булара. Посевы выдерживали в термостате при температуре 44-45 °С в течение 24 часов и проводили оценку для установления бродильного титра. К группе кишечной палочки относятся все разновидности кишечной палочки, способные ферментировать жидкую среду, содержащую глюкозу и маннит, с выделением кислоты и газа в течение 24 часов инкубации при температуре 44–45 °С. При отсутствии помутнения среды газообразования реакцию считали отрицательной. Изменение же цвета среды (пожелтение, помутнение) и газообразование указывали на наличие в среде микроорганизмов из группы кишечной палочки. В этом случае реакцию считали положительной. Определяли коли-титр по наименьшему объёму исследуемого материала, в котором обнаружена одна кишечная палочка.

При исследовании на наличие грибов чашки с посевами спермы на мясопептонном агаре после подсчёта количества микробных тел оставляли при комнатной температуре на 8-10 суток в месте, защи-

щенном от прямых солнечных лучей. По истечении этого срока чашки с посевами проверяли на наличие в них роста грибов.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Результаты исследований отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Подвижность спермиев при различных концентрациях ЛФ

Группы	Количество эякулятов	Подвижность при хранении, балл		
		24 ч.	48 ч.	72 ч.
Контроль	30	5,67±0,23	5,33±0,18	4,33±0,09
I опытная	30	6,33±0,09*	5,67±0,23	5,67±0,09***
II опытная	30	8,0±0,15***	7,33±0,09***	6,0±0,15***
III опытная	30	7,6±0,09***	6,33±0,23**	5,67±0,18***
IV опытная	30	6,67±0,09***	6,0±0,11**	6,0±0,0***

Примечание: здесь и далее * - P<0,05, 0,02; ** - P<0,01; *** - P<0,001.

Анализируя данные таблицы 1, можно выявить отрицательную динамику двигательной активности половых гамет хряков во всех группах. Так, за 72 часа хранения в эякулятах контрольной группы отмечено снижение подвижности на 1,34 балла, в I опытной группе – на 0,66 балла, во II – на 2,0 балла, в III – на 1,93, в IV – на 0,67 балла. В то же время, лучшие значения показателя подвижности за 24, 48 и 72 часа хранения установлены в пробах II и III опытных групп – 8,0; 7,33; 6,0 и 7,6; 6,33 и 5,67 балла соответственно. Самая низкая двигательная активность половых гамет определена в контроле – 5,67; 5,33 и 4,33 балла. Анализируя данные таблицы 2, стоит отметить, что физико-химические показатели спермы производителей опытных групп через 24 часа хранения соответствовали норме, в то время как в контроле отмечено превышение концентрации водородных ионов на 0,26.

Таблица 2 – Физико-химические свойства спермиев при различных концентрациях ЛФ

Группы	Количество эякулятов	Подвижность при хранении, балл					
		24 ч.		48 ч.		72 ч.	
		pH	осмос, мОсм	pH	осмос, мОсм	pH	осмос, мОсм
Контроль	30	7,26	309,33 ±0,43	7,56	311,4 ±0,42	7,81	308,12 ±0,43
I опытная	30	6,92	311,33 ±0,18***	7,22	317,27 ±0,24***	7,54	309,31 ±0,28*
II опытная	30	6,93	308,57 ±0,70	7,22	308,6 ±0,68**	7,58	307,54 ±0,80
III опытная	30	6,86	302,8 ±0,67***	7,18	304,17 ±0,65***	7,57	305,32 ±0,65*
IV опытная	30	6,91	303,23 ±0,69***	7,21	302,37 ±0,53***	7,6	303,27 ±0,59***

Спустя 48 и 72 часа хранения установлено значительное превышение указанного показателя во всех исследуемых группах эякулятов – 0,18-0,56 и 0,54-0,81 соответственно. В то же время, величина осмотического давления оставалась на сравнительно одинаковом уровне во всех 5 группах в течение всего срока хранения. Наиболее стабильные результаты по исследуемым параметрам выявлены в эякулятах II и III опытных групп.

В ходе исследований установлено (таблица 3), что наиболее многочисленными формами морфологических изменений спермиев при введении в разбавитель rhLF различных концентраций являются дистальные цитоплазматические капли.

Таблица 3 – Степень целостности морфологии спермиев в зависимости от концентрации ЛФ

Группы	Кол-во эякулятов	Целостность по показателю, %								
		проксимальные капли			дистальные капли			аномалия хвостика		
		24 ч.	48 ч.	72 ч.	24 ч.	48 ч.	72 ч.	24 ч.	48 ч.	72 ч.
Контроль	30	100,0	100,0	100,0	77,0 ±2,35	74,67 ±3,34	54,67 ±1,67	100,0	99,33 ±0,09	99,33 ±0,09
I опытная	30	100,0	100,0	100,0	79,4 ±2,12	75,0 ±2,30	71,0± 2,35 ***	100,0	99,1 ±0,15	99,0± 0,09*
II опытная	30	100,0	100,0	100,0	84,33 ±1,23 **	81,0 ±1,75	76,33 ±1,83 ***	100,0	99,0 ±0,26	99,0 ±0,24
III опытная	30	100,0	100,0	100,0	84,36 ±1,64*	75,33 ±2,2	75,25 ±2,33 ***	99,0 ±0,15	99,67 ±0,09 *	99,33 ±0,18
IV опытная	30	100,0	99,6 ±0,09	99,6 ±0,09	67,67 ±3,76*	66,33 ±2,0*	63,67 ±2,06 ***	100,0	99,6± 0,09*	99,5 ±0,09

Дистальные цитоплазматические капли находятся в дистальном конце средней части шейки половых гамет [2]. При проведении исследований установлено, что в эякулятах всех исследуемых групп находится превышающее норму (10 %) число данных аномалий – 16-33 % спустя 24 часа хранения и 24-46 % после 72 часов. Минимальная степень повреждений выявлена в эякулятах II и III опытных групп – 15,67-23,67 и 15,64-24,75 % соответственно.

Проксимальные цитоплазматические капли представляют собой односторонние гладкие выпуклости на шейке спермия, такие половые клетки не обладают немедленной способностью к оплодотворению яйцеклетки [2]. В исследованных пробах такая форма морфологических аномалий практически не встречалась (0,4 % в пробах IV опытной группы).

Ненормально сформированный хвостик не допускает прогрессирующего движения спермия и может затруднить его продвижение в маточную трубу, не говоря уже о возможности проникнуть в яйцеклетку [2]. В наших исследованиях выявлено, что данный тип повреждений (около 1 %) проявляется спустя 48 часов хранения во всех исследуемых эякулятах и сохраняется на установленном уровне в течение всего срока хранения.

Таким образом, можно сделать вывод, что использование в составе разбавителя спермы rhLF различных концентраций оказывает неодинаковое воздействие на сперму, что приводит к изменению её двигательной активности и морфологической целостности. Так, более высокие значения показателя подвижности за 24, 48 и 72 часа хранения установлены в пробах II и III опытных групп – 8,0; 7,33; 6,0 и 7,6; 6,33 и 5,67 балла соответственно. Наиболее стабильные результаты по физико-химическим показателям также выявлены в эякулятах II и III опытных группах, как и минимальная степень дистальных цитоплазматических капель – 15,67-23,67 и 15,64-24,75 % соответственно.

Анализируя данные таблицы 4 можно отметить, что наилучшие результаты были получены при применении rhLF в эякулятах II и III опытных групп – отсутствовали условно-патогенные и патогенные микроорганизмы и ОМЧ, был низкий коли-титр.

Таблица 4 – Уровень санации при разных концентрациях ЛФ

Группы	ОМЧ, в 1 мл спермы	Коли-титр, мл	Наличие патогенных грибов
Контроль	6,5x10 ²	0,1	–
I опытная	4,2x10 ²	0,01	–
II опытная	–	0,001	–
III опытная	–	0,001	–
IV опытная	3,0x10 ²	0,01	–

Заключение: 1. Установлено положительное влияние рекомбинантного лактоферрина человека на качественные показатели и бакобсеменённость спермы хряков.

2. Выявлено, что более высокие значения показателя подвижности за 24, 48 и 72 часа хранения установлены в пробах с добавлением rhLF в количестве 10 и 15 мг/литр разбавителя.

3. Отмечено, что в эякулятах с указанной концентрацией rhLF наиболее стабильны результаты по физико-химическим показателям – рН и осмос – и минимальна степень дистальных цитоплазматических капель, отсутствовали условно-патогенные и патогенные микроорганизмы и ОМЧ, коли-титр составлял 0,001.

Литература

1. Советкин С. В., Нарижный А. Г. и др. Санирующие препараты для повышения качества спермы хряков-производителей / С. В. Советкин [и др.] // Ветеринария. – 2000. – № 6. – С. 48-50.
2. Богданович, Д. М. Влияние новых сочетаний санирующих препаратов на качественные показатели спермы хряков-производителей / Д. М. Богданович, А. И. Будевич, О. И. Гливанская // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2016. – Т. 51, ч. 1. – С. 4-10.
3. Богданович, Д. М. Качество спермы хряков при использовании усовершенствованной гхцс-среды и разбавителей зарубежного производства / Д. М. Богданович, О. И. Гливанская // Аспекты животноводства и производства продуктов питания : материалы междунар. науч.-практ. конф. – Жодино, 2017. – С. 6-11.
4. Bronicka, A. Aktualne kryteria oceny oraz uwarunkowania jakosci nasenia knura / A. Bronicka, Z. Dembinski // Med. Weter. –1999. – Vol. 55, № 7. – P. 436-439.
5. Pejsak, Z. Andrologia / Z. Pejsak. – Krawow : Platan, 1996. – 218 p.
6. Гливанская, О. И. Оплодотворяющая способность спермы хряков-производителей при использовании новых санирующих препаратов / О. И. Гливанская, Д. М. Богданович // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2017. – Т. 52, ч. 1. – С. 53-58.
7. Антибактериальный комплекс в составе нового поколения разбавителей спермы хряков / А. И. Будевич [и др.] // Инновации и современные технологии в производстве и переработке с.-х. продукции : сб. науч. статей IX междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 85 юбилей фак-те технологич. менеджмента. – Ставрополь, 2014. – С. 9-13.
8. Гливанская, О. И. Зависимость качества спермы от концентрации биостимулятора в разбавителе в технологии искусственного осеменения свиней / О. И. Гливанская, Д. М. Богданович // Таврический научный обозреватель. – 2016. – № 5-2(10). – С. 199-202.
9. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin / A. Pierce [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1991. – Vol. 196(1). – P. 177-184/
10. Борзенкова, Н. В. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки лекарственных препараты и биологически активные добавки / Н. В. Борзенкова, Н. Г. Балабушевич, Н. И. Ларионова // Биофармацевтический журнал. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 3-19.
11. Baker, E. M. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release / E. M. Baker, E. N. Baker // Biometals. – 2004. – Vol. 17. – P. 209-216.
12. Инструкция по искусственному осеменению свиней / подгот. : Е. В. Раковец [и др.]. – Минск, 1998. – 38 с.

Поступила 1.03.2018 г.