

УДК 636.2.034:612.02

А.И. ГАНДЖА<sup>1</sup>, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ<sup>1</sup>, И.В. КОСТИКОВА<sup>1</sup>,  
Е.Д. РАКОВИЧ<sup>1</sup>, О.В. ГРИШКИНА<sup>1</sup>, Е.С. ЛОБАНОК<sup>2</sup>,  
В.П. НИКОЛЬСКАЯ<sup>2</sup>

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ  
СПОСОБНОСТИ СПЕРМЫ ВНЕ ОРГАНИЗМА**

<sup>1</sup>РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук  
Беларуси по животноводству»

<sup>2</sup>ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной  
академии наук Беларуси»

**Введение.** Активное внедрение клеточных репродуктивных технологий в животноводство является приоритетным в экономической политике многих стран мира. Резкое снижение воспроизводительной функции высокопродуктивных молочных коров становится мировой проблемой, решение которой заключается в применении современных достижений биотехнологии репродукции, к которой относится и технология получения преимплантационных эмбрионов из созревших вне организма яйцеклеток. В настоящее время во многих лабораториях мира разработаны системы дозревания ооцитов из яичников убитых на мясокомбинате коров.

Успешное оплодотворение яйцеклетки, как *in vivo*, так и *in vitro*, происходит при выполнении двух условий: яйцеклетка должна созреть, а сперма пройти подготовку к оплодотворению. В естественных условиях сперматозоиды в половых путях самки в течение нескольких часов претерпевают существенные изменения, необходимые для приобретения ими оплодотворяющей способности. Они состоят в преобразовании строения клеточных мембран на головке спермиев, слиянии плазматической мембраны с оволеймой (акросомная реакция), а также в обеспечении исходно неподвижных половых клеток необходимыми веществами для придания им плавательной активности. Этот процесс в естественных условиях занимает несколько часов. В искусственных условиях подготовка спермы к оплодотворению (капацитация) происходит значительно быстрее. Окончательной стадией преобразования спермиев при постановке опытов *in vitro* можно считать приобретение

ими оплодотворяющей способности.

Многочисленные исследования показали, что капацитации сперматозоидов вне организма способствуют факторы, дестабилизирующие состояние их мембран, индуцирующие их акросомную реакцию, повышающие оплодотворяющую способность. Многие ученые в своих работах показали высокую эффективность влияния кофеина на капацитацию спермиев [1, 2, 3]. Присутствие простагландина в организме самки положительно сказывается на жизнеспособности спермиев. Однако данные литературы по влиянию простагландина на сперматозоиды в условиях *in vitro* противоречивы: он либо несколько подавляет, либо не влияет на морфологию акросом и подвижность сперматозоидов [4, 5].

Имеется ряд работ, в которых сообщается о положительном воздействии физических факторов на созревание яйцеклеток. Отмечается положительный эффект стимуляции развития клеток импульсным электрическим полем, гелий-неоновым лазером. Ранее было доказано положительное влияние постоянного магнитного поля на качественные показатели спермы при искусственном оплодотворении [6, 7].

В технологии *in vitro* чаще всего используют заморожено-оттаянную сперму быков. Замораживание и последующее оттаивание спермиев индуцируют развитие неблагоприятных внутриклеточных изменений (увеличение уровня реактивных форм кислорода, повреждение мембранных структур), снижает выживаемость и функциональную активность клеток. Плазматическая мембрана сперматозоидов содержит достаточно большое количество ненасыщенных жирных кислот, подвергаемых перекисному окислению, что вызывает ее дестабилизацию, нарушение ионного гомеостаза клетки, снижение потенциала митохондрий и плазматической мембраны, фрагментацию ДНК, падение и без того низкой антиоксидантной защиты [8, 9, 10].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось повышение эффективности оплодотворяющей способности спермиев вне организма с использованием гормональных и биофизических способов воздействия, установление метаболических критериев жизнеспособности спермиев.

**Материал и методика исследований.** Исследования были проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-производственный центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» и лаборатории биофизики и инженерии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

Объектом исследований служила заморожено-оттаянная сперма крупного рогатого скота, которую после размораживания помещали в пробирку с 1 мл питательной среды и ставили в термостат на 1 час с

целью разделения подвижных и неподвижных (погибших) спермиев. В качестве основной питательной среды для капацитации использовали среду Тироде. С целью повышения эффективности созревания спермиев к основной питательной среде добавляли синтетические аналоги простагландина F<sub>2α</sub> эстрофан и тимэстрофан в количестве 25, 50 и 100 мкг/мл. В качестве капацитирующего агента использовали гепарин (150 ед/мл) и кофеин в различных дозах (2, 4, 8 мг/мл р-ра). Дальнейшие манипуляции со спермой проводили согласно общепринятым методикам: методы разбавления, центрифугирования, ресуспендирования и инкубации в различных средах. Затем сперму в количестве 1×10<sup>6</sup> сперматозоидов в 1 мл добавляли к созревшим к этому времени ооцитам для определения ее оплодотворяющей способности. Ооциткумулюсные комплексы (ОКК) выделяли рассечением ткани яичников, полученных на мясокombинате после убоя животного. Созревание ооцитов проводили по разработанной нами схеме в течение 24 часов в СО<sub>2</sub>-инкубаторе во влажной среде при температуре 39°С и присутствии 5 % СО<sub>2</sub> в воздухе. Совместная инкубация спермы и ооцитов продолжалась 18-20 часов при температуре 39°С в атмосфере с 5 % СО<sub>2</sub> и максимальной влажности. С целью увеличения жизнеспособности спермы изучалось влияние лазерного излучения и направленного поляризованного света на жизнеспособность и оплодотворяющую способность сперматозоидов путем воздействия данных физических факторов на свежеразмороженную сперму и после ее капацитации. Для проведения работ использовали магнито-лазерный аппарат «Вектор-03» и лампу поляризованного света «Биоптрон». На свежеразмороженную сперму воздействовали лазерным лучом с частотой 5 и 10 Гц в течение 10 и 20 сек. Поляризованным светом воздействовали на сперму либо сразу после проведения swim-up процедуры, либо после процесса капацитации в течение 10 сек. Эффективность капацитации определяли по уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей.

Была проведена сравнительная характеристика функционального состояния заморожено-оттаянных сперматозоидов быков-производителей после капацитации в течение 2-х часов путем определения интенсивности перекисного окисления липидов, внутриклеточного содержания АТФ (адезинтрифосфата), интенсивности дыхания и мембранного потенциала.

Все манипуляции с яйцеклетками, оценку активности сперматозоидов, стадий развития и качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота проводили под микроскопом МБС-10 при увеличении в 56 крат.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Изучено влияние синтетических аналогов простагландина F<sub>2α</sub> (эстрофана, тимэстрофа-

на) на оплодотворяющую способность спермиев крупного рогатого скота при получении эмбрионов вне организма (табл. 1). В результате исследований установлено, что добавление в среду для капацитации как эстрофана, так и тимэстрофана в дозе 50 мкг/мл привело к увеличению уровня дробления по сравнению с контролем на 3,1-2,3 % соответственно. Уменьшение концентрации простагландина до 25 мкг/мл снижало уровень дробления, как по сравнению с контролем на 8,8-10,4%, так и с вышеуказанной группой, на 11,9-12,5 % соответственно. Увеличение концентрации эстрофана до 100 мкг/мл привело к значительному снижению уровня дробления – на 13,5 % по сравнению с контролем. Однако в данной группе был самый высокий выход эмбрионов на преимплантационных стадиях развития – 16,6 %, что выше по сравнению с группами, капацируемыми в среде с добавлением 25 и 50 мкг эстрофана на 9,1-5,5 %, а тимэстрофана – 7,8-5,7 % соответственно.

Таблица 1 – Влияние эстрофана и тимэстрофана на оплодотворяющую способность спермиев

Варианты опыта	Концентрация, мкг/мл	Кол-во ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
Контроль	-	46	19-41,3	7-15,2
Эстрофан в среде для капацитации	25	40	13-32,5	3-7,5
	50	27	12-44,4	3-11,1
	100	54	15-27,8	9-16,6
Эстрофан в среде для оплодотворения	25	54	16-29,6	10-18,5
Тимэстрофан в среде для капацитации	25	68	21-30,9	6-8,8
	50	46	20-43,4	5-10,9

При добавлении эстрофана в среду для оплодотворения уровень дробления составил 29,6 %, но при этом было получено 10 эмбрионов на стадии морула-бластоциста, что составило 18,5 % от числа ооцитов, поставленных на созревание.

При подготовке спермы к оплодотворению вне организма в качестве капацирующего агента широко используется гепарин. Однако встречаются работы, где указано, что применение кофеина также способствует успешному прохождению процедуры капацитации. Наши исследования показали, что использование кофеина не способствовало повышению оплодотворяющей способности спермы (табл. 2).

Уровень дробления, по сравнению с контрольной группой, был ниже и составлял от 15,6 (при концентрации кофеина 4 мг/мл раствора) до 25,9 % (при концентрации кофеина 8мг/мл раствора). При этом вы-

ход морул-бластоцист при использовании кофеина в концентрации 2 мг/мл составлял 7,5 %, при использовании концентрации 8 мг/мл – 14,8 %, что ниже по сравнению с контролем на 9,2-1,9 %. При концентрации кофеина 4 мг/мл преимплантационных эмбрионов не получено.

Таблица 2 – Эффективность применения кофеина в качестве капацитирующего агента

Концентрация кофеина, мг/мл р-ра	Всего оплодотворено клеток, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
2	40	8–20,0	3–7,5
4	32	5–15,6	–
8	27	7–25,9	4–14,8
Контроль (гепарин)	36	14–38,9	6–16,7

Воздействие лазерного луча с частотой 5 Гц в течение 10 сек. на свежеразмороженную сперму позволило получить 44,1 % дробящихся клеток от числа поставленных на культивирование (15 из 34), а также 5 эмбрионов на стадии морула-бластоциста, что составляет 14,7 % от оплодотворенных клеток. Увеличение времени экспозиции лазерного луча до 20 сек. не позволило получить дробящихся клеток. После воздействия лазерным лучом мощностью 10 Гц в течение 10 сек было получено 8 клеток на 8-16 клеточной стадии, что составило 25,0 % от числа поставленных на культивирование. Зародышей на преимплантационных стадиях не получено. По-видимому, воздействие лазерного излучения непосредственно на клетки после разморозки носит неоднозначный характер и требует дальнейших углубленных исследований.

Изучено влияние направленного поляризованного света на физиологические показатели и оплодотворяющую способность спермиев крупного рогатого скота при получении эмбрионов вне организма (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние направленного поляризованного света на эффективность капацитации замороженно-оттаянной спермы крупного рогатого скота.

Сроки воздействия поляризованным светом	Всего оплодотворено клеток, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
После swim-up процедуры	24	6-25,0	4-16,7
Перед оплодотворением	31	17-54,8	4-12,9

В результате исследований установлено, что воздействие поляризованного света в течение 10 сек видимых изменений таких показателей, как подвижность и уровень агрегации, не вызывало. В то же время, при обработке спермы после swim-up процедуры выход дробящихся эмбрионов составил 25,0 % от числа поставленных на культивирование (6 из 24), из них 16,7 % развились до ранней морулы. После воздействия поляризованным светом на сперму после её капацитации было получено 17 дробящихся зародышей, что составило 54,8 %. Однако выход зародышей на преимплантационных стадиях в данном опыте был ниже и составил 12,9 % от числа оплодотворенных.

Проведена сравнительная характеристика функционального состояния заморожено-оттаянных сперматозоидов в зависимости от индивидуальных особенностей животных и способа заморозки спермы (табл. 4). Сперма быков Герой и Химозин была заморожена в пайеттах, а быка 500179 – в гранулах. Исследовались такие показатели, как интенсивность перекисного окисления липидов, внутриклеточное содержание АТФ, интенсивность дыхания и мембранный потенциал.

Таблица 4 – Сравнительная характеристика функционального состояния заморожено-оттаянной спермы после капацитации

Способ заморозки спермы, быки	Интенсивность перекисного окисления липидов усл. ед./10 <sup>6</sup> кл	Внутриклеточное содержание АТФ, нМ/10 <sup>6</sup> кл	Интенсивность дыхания, tg α	Мембранный потенциал, мВ
Герой	0,89-0,97	1,17-1,60	0,45-0,63	-35 мВ
Химозин	1,46-1,68	0,23-0,36	0,11-0,15	-18 мВ
500179	0,88-0,92	0,97-1,25	0,41-0,54	-33 мВ

Как видно из приведенной таблицы, уровень перекисного окисления липидов был выше у химозина по сравнению с Героем на 0,57-0,71 усл. ед. /10<sup>6</sup> кл. и спермой в гранулах на 0,58-0,76 усл. ед. /10<sup>6</sup> кл., соответственно. В то же время, внутриклеточное содержание АТФ, как одного из показателей жизнеспособности, у клеток спермы Героя составило 1,17-1,60 нМ/10<sup>6</sup> кл., что превышало аналогичный показатель клеток, замороженных в гранулах на 0,2-0,35 нМ/10<sup>6</sup> кл., а клеток Химозина – на 0,94-1,24 нМ/10<sup>6</sup> кл. Интенсивность дыхания клеток Героя и быка 500179 находилась на одинаковом уровне и значительно превышала интенсивность дыхания клеток Химозина. Аналогичная зависимость наблюдается и по мембранному потенциалу – -35-33мВ против -18 мВ. Выход эмбрионов при оплодотворении созревших ооцитов спермой Героя составил 17,3 %, спермой быка 500179 – 16,4 %, при использовании спермы Химозина преимплантационных эмбрионов получено не было.

**Заключение.** Добавление в среду для капацитации 50 мкг/мл простагландина увеличивало уровень дробления на 2,3-3,1 %, но при этом снижался выход эмбрионов на преимплантационных стадиях. Увеличение концентрации эстрофана в среде для капацитации до 100 мкг/мл, а также добавление его в среду для оплодотворения позволило увеличить выход эмбрионов на стадии морула-бластоциста до 16,6-18,5 %.

При использовании в качестве капацитирующего агента кофеина в количестве 8 мг/мл при подготовке спермы крупного рогатого скота для оплодотворения *in vitro* выход эмбрионов составил 16,7 % при уровне дробления 25,9 %.

Воздействие направленного поляризованного света на сперматозоиды после их созревания более эффективно по сравнению с воздействием на неё сразу после *swim-up* процедуры, выход преимплантационных эмбрионов составил 16,7 % против 12,9 %. Использование лазерного излучения позволило получить 14,7 % морул-бластоцист.

Интенсивность дыхания сперматозоидов 0,41-0,63  $\text{tg } \alpha$ , интенсивность перекисного окисления липидов 0,88-0,97 усл. ед. / $10^6$  кл., внутриклеточное содержание АТФ 0,97-1,60 нМ/ $10^6$  кл. и мембранный потенциал -33-35мВ позволяют получать при оплодотворении созревших *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота 16,4-17,3 % преимплантационных эмбрионов при уровне дробления 39,8-42,3 %.

Повышение эффективности оплодотворяющей способности спермы вне организма можно достигнуть введением 25 мкг/мл эстрофана в среду для оплодотворения, при этом выход преимплантационных эмбрионов составит 18,5 %. Воздействие направленного поляризованного света в течение 10 сек с интенсивностью 40 мВт/см<sup>2</sup> позволяет увеличить выход морул-бластоцист на 3,8 %.

#### Литература

1. Сураева, Н. М. Оптимальные приемы капацитации спермы быков для оплодотворения яйцеклеток / Н. М. Сураева, А. З. Кесян, М. И. Прокофьев // Вестн. акад. с.-х. наук. – 1993. – № 4. – С. 49-50
2. *In vitro* penetration of pig oocytes by commercially prepared frozen-thawed. Boar spermatozoa in a chemically semi-de-fined bicarbonate-free medium / L. Abeysdeera [et al.] // *Theriogenology* – 1996. – Vol. 45, № 1. – P. 265.
3. Effect of Group Culture and Embryo-culture Conditioned Medium on Development of Bovine Embryos / T. Fujita [et al.] // *J. of Reproduction and Development*. – 2006. – Vol. 52, № 1. – P. 137-142
4. Effect cloprostenol treatment at artificial insemination on sov fertility / R. N. Kirkwood [et al.] // *Reprod. Domest. Anim.* – 2007. – Vol. 42, N 2. – P. 26-28.
5. Kozumplik, J. The effect of Oestrphan Spofa (synthetic analog of prostaglandin F2 alpha) added to the insemination dose on pregnancy and fertility in sow / J. Kozumplik, J. Martinek // *Vet. Med.* – 1986. – Vol. 31, N 4. – P. 227-232.
6. Колесникова, А. А. Стимуляция развития ооцитов млекопитающих *in vitro* / А. А. Колесникова, В. А. Шагимага // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных : тез. докл. 6-ой Междунар. конф. (19-20 дек. 2006 г.) / ВИЖ. – Дуброви-

цы, 2006. – С. 85-87.

7. Карашев, М. Ф. Созревание ооцитов и оплодотворение яйцеклеток крупного рогатого скота *in vitro* в средах с биологически активными веществами : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Карашев М.Ф. – Харьков, 1987. – 25 с.

8. Rogers, B. J. ATP levels in hamster spermatozoa during capacitation *in vitro* / B. J. Rogers, B. Morton // *Biol. Reprod.* – 1973. – Vol. 9. – P. 361-369.

9. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species. DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm / C. Marchetti [et al.] // *Human Reprod.* – 2002. – Vol. 17, N 5. – P. 1257-1265.

10. Rasul, Z. Canges in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa / Z. Rasul, N. Ahmad, M. Anzar // *J. Androl.* – 2001. – Vol. 22, N 2. – P. 278-283.

(поступила 17.03.2008 г.)

УДК 636.15.082.12(476)

М.А. ГОРБУКОВ, Ю.И. ГЕРМАН, М.К. БОРИСОВЕЦ,  
В.Н. ДАЙЛИДЕНОК, А.И. ГЕРМАН

## ГЕНОФОНД ЛОШАДЕЙ ТЯЖЕЛОВОЗНЫХ ПОРОД БЕЛАРУСИ

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

**Введение.** В современных условиях коневодство в Беларуси является необходимой отраслью сельскохозяйственного производства, дает разнообразную продукцию. Наиболее востребованы рабочепользовательное и сопутствующее ему продуктивное направления отрасли, где преимущественно используются лошади белорусской упряжной породы [1]. С учетом специфики отдельных регионов и сельскохозяйственных предприятий республики, традиций и особенностей коневодства осуществляется также разведение лошадей тяжеловозных пород, из которых в республике имеются в основном русская и советская. Они необходимы как для работы, производства скороспелого молодняка, реализуемого на экспорт, так и получения улучшателей рабочепользовательного коневодства путем выращивания хорошо развитых, работоспособных помесей от скрещивания русских и советских тяжеловозных жеребцов-производителей с матками белорусской упряжной породы. Положительный эффект таких скрещиваний установлен [2]. Вместе с тем, в нашей республике имеются лишь сравнительно небольшие группы этих животных. Для того, чтобы избежать существенных затрат на их импорт необходимо наладить системное