

## ВЛИЯНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ АКРОСОМ СПЕРМИЕВ И ЭКЗОГЕННОГО ПРОГЕСТЕРОНА НА ПРИЖИВЛЯЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ

Ю.А. Горбунов, Н.Г. Минина, П.С. Федук

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 08.07.2013 г.)

**Аннотация.** В результате исследований, направленных на изучение биологической полноценности спермы быков-производителей, используемой для получения эмбрионов, установлено, что отбор замороженно-оттаянной спермы по показателю сохранности акросом спермиев обеспечивает повышение выхода эмбрионов на 14%, что в расчете на каждые 10 пересадок позволяет получить дополнительно 1,4 теленка. Инъекции КОП 17-а телкам-реципиентам по схеме: за 48 часов до пересадки эмбрионов и повторно на 15-й день полового цикла способствует повышению приживляемости пересаженных эмбрионов на 18%, что в расчете на каждые 10 пересадок обеспечивает дополнительное получение 1,6 теленка.

**Summary.** As a result of research aimed at understanding the biological value of semen sires used to produce embryos, it is established that the selection of frozen-thawed sperm in terms of preservation of sperm acrosome enhances the increase of the yield of embryos by 14%, which allows to get 1.4 additional calves for every 10 transplantations. 17-a COP injections to recipient heifers under the scheme of 48 hours prior to embryo transplantation and repeated on the 15th day of the sexual cycle leads to the acceptability of transplanted embryos growth by 18%, which allows to obtain 1.6 additional calves for every 10 transplantations.

**Введение.** Методы искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов были созданы как средство реализации генотипической селекции. Однако большой их потенциал остается до конца не реализованным в направлении увеличения сроков использования быков-производителей и оценки качества спермопродукции. Была обнаружена положительная корреляция ( $r=0,60$ ) между процентом спермиев с интактной акросомой и их оплодотворяющей способностью [1]. Только благодаря применению этого метода стало возможным развитие техники замораживания спермы хряков. Предложен также метод, заключающийся в окрашивании акросом флуоресцентными красителями и определении коэффициента вариаций площади и сухой массы головок спермиев для оценки качества спермы [2]. В опытах Wray K.R., Spire M.F. [3] при использовании спермы с содержанием 76, 64 и 46% спермиев с целыми акросомами оплодотворяемость ооцитов *in vitro* составила 83, 58,6 и 47,8% соответственно.

Большинство повреждений акросом происходит еще при разбавлении спермы, а само замораживание повреждает акросомы в меньшей степени. Акросома вырабатывает ферменты гиалуронидазу, акрозин и кислую фосфатазу, участвующие в оплодотворении. Набухание, отслоение и разрывы акросомы наблюдаются при разбавлении, что в основном зависит от состава среды и криопротектора, а также при охлаждении, эквilibрации, в период после холодого удара, в процессе замораживания и оттаивания. На сохранность акросом влияют индивидуальные особенности организма быка. Например, заболевание придатков семенников обусловлено увеличением поврежденных спермиев. Акросома разрушается и в том случае, когда, например, 2-3 раза в сутки в течение 6 месяцев извлекают канистры со спермой из жидкого азота сосудов Дьюара. Поэтому очень важно регулярно следить на пунктах искусственного осеменения за уровнем жидкого азота, не поднимать канистры высоко над горловиной сосуда, приобретать сперму в небольшом количестве (на 2-3 месяца работы) или хранить ее в нескольких канистрах [4].

Еще одной причиной эмбриональных потерь на ранних стадиях развития по данным, представленным Клиниским Ю.Д. [5], Прокофьевым М.И. [6], Черемисиновым Г.А. [7], Эрнстом Л. К., Сергеевым Н.И. [8], является нарушение баланса половых гормонов в организме самок. Из эндокринных факторов наибольшее значение имеет прогестерон, который необходим для возникновения и поддержки беременности. Это, а также недостаточная изученность роли гормона во взаимосвязи эмбрион - желтое тело - матка послужило основанием для определения степени влияния препарата оксипрогестерона капронат 17 $\alpha$  (КОП - 17  $\alpha$ ) на приживляемость эмбрионов в половых органах реципиентов. Авторы указывают, что для получения максимального эффекта по приживляемости пересаженных эмбрионов с минимальными затратами применяется препарат КОП-17 $\alpha$ , который является синтетическим аналогом гормона желтого тела - прогестерона. Химическая формула его отличается тем, что в положении С17 содержит остаток капроновой кислоты. Будучи эфиром оксипрогестерона, капронат более стоек в организме, чем прогестерон, действует медленнее и оказывает пролонгирующий эффект. После однократной внутримышечной инъекции масляного раствора КОП-17 $\alpha$  действие его продолжается до 14 дней. Препарат вызывает переход слизистой оболочки матки из фазы пролиферации, вызываемой фолликулярным гормоном, в секреторную фазу, а после оплодотворения способствует nidации зародыша в слизистую оболочку матки, что необходимо для его дальнейшего развития. Пролонгирующее действие препарата способствует полной обеспеченности прогестероном организма

животного. Однако отмечается, что обработка должна проводиться в период за 48 часов до пересадки эмбрионов и повторно на 15-й день полового цикла, что совпадает с периодами формирования желтого тела беременности, усиления секреции трофобласта, имплантации зиготы в эндометрий, начальной стадии плацентации, т.е. приходится на критические периоды внутриутробного развития.

Нерешенность этих вопросов и обусловило проведение исследований. В связи с этим целью исследований явилось изучение влияния целостности акросом спермиев, а также экзогенного прогестерона на приживляемость эмбрионов.

**Материал и методика исследований.** На первом этапе исследований изучали биологическую полноценность спермы, используемой для получения эмбрионов, пригодных к криоконсервации. Всего было проведено 324 анализа спермодоз от быков-производителей различного происхождения.

Отобранные образцы замороженно-оттаянной спермы оценивали на выживаемость и подвижность (активность) спермиев по общепринятым методикам, а также по состоянию акросом в нашей модификации. Ее суть состоит в том, что на монитор компьютера выводится обработанное программой Bioscan высококачественное изображение с микроскопа, полученное от цветной цифровой видеокамеры и увеличенное в 1400 раз. При каждом анализе на предметное стекло наносили глазной стеклянной палочкой одну маленькую каплю оттаянной спермы и рядом с ней три капли из слоя, содержащего жидкую фракцию белка куриного яйца, являющегося изотонической питательной средой. При этом она должна иметь коэффициент рефракции по шкале прибора ИРФ-22 в пределах 1,3558...1,3590. Смешивали сперму с питательной средой в соотношении 1:3, накрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом при температуре 38°C. Подсчитывали число подвижных сперматозоидов с поврежденными акросомами и число совсем неподвижных в 3 контрольных полях зрения микроскопа. Суммировали аналогичные показатели и вычисляли их соотношение. Скорость сперматозоидов при этом замедлялась настолько, что они практически стояли на месте. При этом в большинстве случаев удалось без труда просмотреть не только состояние акросом на движущихся и неподвижных спермиях, но и оценить их подвижность в баллах.

При помощи системы БИОСКАН на мониторе компьютера можно производить и фотоснимки спермиев. В ходе исследований нами были идентифицированы как полноценные сперматозоиды, так и спермии, имеющие структурные нарушения, в том числе утратившие акросому, или имеющие различные ее повреждения.

В качестве доноров использовали 32 высокопродуктивные коровы черно-пестрой породы, принадлежащие РУСП «Племзавод «Россь», в возрасте от 2 до 4 лактаций, живой массой 620-650 кг, с удоем по наивысшей лактации от 10,0 до 11,5 тыс. кг молока, жирностью 3,89 – 4,1%. Эмбрионы получали после индукции полиовуляции препаратом ФСГ-Супер и последующим извлечением их на 7-й день.

Извлечение, оценку, пересадку эмбрионов осуществляли согласно рекомендациям по трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве. Криоконсервацию эмбрионов проводили с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации. После извлечения зародыши отличного и хорошего качества на стадии морулы и бластоцисты были отобраны для замораживания и пересадки реципиентам.

Всего прореагировало полиовуляцией 87,5% животных-доноров, от которых получено 208 эмбрионов и яйцеклеток. При этом пригодным к трансплантации был 131 эмбрион, или 63% от общего числа извлеченных. Все они находились в стадиях развития поздней морулы, ранней и поздней бластоцисты. В расчете на 1 голову извлечено 4,64 эмбриона, пригодного для трансплантации.

На втором этапе исследований для изучения влияния инъекций экзогенного прогестерона КОП-17 $\alpha$  на приживляемость эмбрионов в организме реципиентов были сформированы 2 группы телок-аналогов по возрасту – 14-16 месяцев и живой массе 380-400 кг, по 45 голов в каждой.

Реципиентам контрольной группы внутримышечно вводили 12 мл физиологического раствора хлористого натрия, двукратно: на 5-й и 15-й день полового цикла, а реципиентам опытной группы – внутримышечно 12 мл 12,5%-го раствора КОП 17- $\alpha$ , двукратно: за 48 часов до пересадки и повторно на 15-й день полового цикла.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для установления качества замороженно-оттаянной спермы быков-производителей различного происхождения нами была изучена ее оплодотворяющая способность по таким показателям, как: выживаемость спермиев (часов), сохранность акросом (%), активность спермиев (баллов). При этом спермодозы были разделены на 2 группы: от быков-производителей зарубежной (1 группа) и отечественной (2 группа) селекций.

Полученные данные указывают, что в среднем сперма 5-ти быков импортной селекции лучше, чем 30 отечественных, по таким показателям, как подвижность спермиев после оттаивания (соответственно 5,4 против 4,5 баллов), по выживаемости спермиев (9,5 против 8,5 часа), но хуже по сохранности их акросом (соответственно 84,58 против 95,07%).

В процессе проведения исследований для установления связи между сохранностью акросом и качеством эмбрионов, предназначенных для криоконсервации, важно было проанализировать результаты осеменения коров-доноров спермой быков-производителей отечественной и зарубежной селекций. Для этого было сформировано 7 групп коров-доноров, которые были осеменены замороженно-оттаянной спермой 11 быков различного происхождения.

Наиболее значительные различия в оплодотворяемости отмечены у коров в связи с таким показателем, как сохранность акросом спермиев. При этом количество пригодных к пересадке эмбрионов (85, 55 и 47%) наблюдалось при введении в половые пути самок спермы с уровнем сохранности акросом спермиев, соответственно 95, 97 и 93% от быков отечественной селекции (РУСП «Племзавод «Россь», РУСП «Племзавод «Красная Звезда») и голландской селекции.

В то же время наименьшее количество их установлено при сохранности акросом в пределах 74, 85 и 83% соответственно у производителей английской, датской и канадской селекций.

Обнаружена заметная тенденция к последовательному снижению качества зародышей, извлеченных у коров доноров, по мере снижения показателя сохранности акросом спермиев до уровня 74-85%. В результате осеменения коров-доноров спермой быков-производителей датской и английской селекции извлечено пригодных к криоконсервации эмбрионов лишь от 22 до 32% соответственно.

В среднем, при сравнении результатов извлечения эмбрионов в группе доноров, осемененных спермой быков зарубежной селекции, с донорами, осемененными спермой быков отечественной селекции, установлены достоверные различия по количеству эмбрионов, пригодных к криоконсервации. Данный показатель был выше в группе, где для осеменения использовалась сперма быков, рожденных в племзаводах «Россь» и «Красная Звезда», на 14,6 эмбрионов (25,0 против 10,4;  $P < 0,001$ ). При этом нами установлено, что остальные учитываемые показатели – средняя продуктивность женских особей, активность и выживаемость спермиев определяющего влияния на качество извлеченных зародышей не оказали.

Далее необходимо было выяснить влияние спермы, оцененной дополнительно по такому критерию, как сохранность акросом на приживляемость зародышей у реципиентов, для чего было сформировано две группы телок. Реципиентам 1-й контрольной группы пересаживали эмбрионы, полученные при использовании спермы быков-производителей отечественной селекции, а 2-й опытной – зарубежной селекции (табл. 1).

Сохранность акросом спермиев по группе быков-производителей зарубежной селекции была ниже на 11,2% по сравнению с группой быков-производителей отечественной селекции и составила в среднем 84,8%.

Таблица 1 – Результаты пересадки реципиентам эмбрионов, полученных с использованием спермы быков отечественной и зарубежной селекции

Группы быков-производители (селекция)	Осемено-доноров, n	Сохран-ность акросом,спермие в, %	Извлечено эмбрионов, пригодных к криоконсервации		Пересажено эмбрионов, реципиентам, гол.	Стали стельными	
			всего n / %	в т.ч. на 1 донора		n	%
1 Контрольная (отечественная)	17	96,0	50/70**	2,94± 0,21**	29	16	55± 9,24
2 Опытная (зарубежная)	28	84,8	52/32	1,86± 0,18	37	15	41± 8,08

Достоверные различия установлены по количеству пригодных к криоконсервации эмбрионов в пользу животных первой группы на 38% ( $P<0,01$ ). При этом в расчете на одного использованного по извлечению зародышей донора различия были также существенными и составили 1,08 (2.94 против 1.86,  $P<0,01$ ). При пересадке эмбрионов, полученных с использованием спермы быков отечественной селекции, стельность установлена у 55% реципиентов, что оказалось выше их приживляемости во второй группе на 14%, где использовалась сперма быков зарубежной селекции (55 против 41%).

Таким образом, наибольшее количество пригодных к пересадке эмбрионов наблюдалось при введении в половые пути коров-доноров спермы с уровнем сохранности акросом спермиев 95-97%, что установлено у быков, рожденных в РУСП «Племзавод «Россь» и РУСП «Племзавод «Красная Звезда». При этом отмечена заметная тенденция к ухудшению качества извлеченных у коров зародышей по мере снижения показателя сохранности акросом спермиев. Вместе с тем было установлено, что другие учитываемые показатели, такие как средняя продуктивность женских предков быков, активность и выживаемость спермиев определяющего влияния на качество эмбрионов не оказали.

Следовательно, использование спермы быков-производителей отечественной селекции при условии оценки ее по показателю сохранности акросом спермиев обеспечивает повышение приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов на 14%, что в расчете на каждые 10 пересадок позволяет получить дополнительно 1,4 теленка.

С целью повышения приживляемости пересаженных эмбрионов у реципиентов изучали эффективность применения препарата КОП-17а.

Данные исследований о влиянии инъекций гормонального препарата КОП-17а телкам-реципиентам на приживляемость у них эмбрионов после введения за 48 часов до их пересадки и повторно на 15-й день цикла представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты применения препарата КОП-17а в связи со стельностью реципиентов

Группа	Пересадок, п	Наименование введенного препарата	Стали стельными	
			п	%
1 Контрольная	45	физиологический раствор	19±0,95	42
2 Опытная	45	Препарат КОП 17-а	27±1,41*	60

После пересадки эмбрионов процент стельности в контрольной и опытной группах составил 42 против 60% соответственно. Установлено, что применение капронат оксипрогестерона-17а способствует достоверному повышению приживляемости эмбрионов на 18% за счет своевременной стабилизации баланса половых гормонов в организме реципиента в наиболее ответственные для этого периоды.

**Заключение.** Использование спермы быков-производителей отечественной селекции при условии дополнительной оценки ее по показателю сохранности акросом спермиев обеспечивает повышение приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов на 14%, что в расчете на каждые 10 пересадок позволяет получить дополнительно 1,4 теленка.

С целью повышения приживляемости эмбрионов целесообразно проводить двукратную обработку реципиентов КОП-17а: за 48 часов до пересадки и повторно через 10 дней (15-й день цикла), внутримышечно, в дозе 12мл 12,5%-ного раствора, что способствует повышению приживляемости эмбрионов на 18%, что в расчете на каждые 10 пересадок составляет 1,6 теленка.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Скорняков, Б.А. Электронно-микроскопическое изучение взаимодействия замораживания на целостность акросом спермы быков / Б.А. Скоряков // Тезисы докладов научно-производственной конференции по теории и практике воспроизводства сельскохозяйственных животных, г. Харьков. - 2002. - С.71-72.
2. Раковский, Я.П. Особенности спонтанной биофлюоресценции половых клеток самцов с.-х. животных / Я.П. Раковский, В.С. Васильев, А.А. Бегма // Биохемилюминесценция в сельском хозяйстве. - 2006. - С.33-35.
3. О значении акросомы в оценке семени самцов-производителей И.И. Соколовская [и др.] // «Животноводство». - 1991. - №9. - С.39-41.
4. Wray, K.R., Spire, M.F. The influence of semen quality, as determined by percent intact acrosoms on fertilization rates in superovulated cows / K.R. Wray, M.F. Spire // Theriogenology, U. S., 2004. - №1. - P. 236.

5. Клинский, Ю.Д. Направленная регуляция и интенсификация процессов размножения у сельскохозяйственных животных в условиях промышленной технологии / Ю.Д. Клинский // Гормоны в животноводстве: тр. Всесоюз. ин-т жив-ва. – Дубровицы, 2001. – Вып. 64. – С.7-8.
6. Прокофьев, М.И. Биотехнология регуляции воспроизводительной функции у крупного рогатого скота / М.И. Прокофьев // Сб. н. тр. / Всесоюз. НИИ физиол. биохим. и питания с.-х. животных. – Боровск, 2003. – т. XXVII. – С.33-40.
7. Черемисинов, Г.А., Нежданов, А.Г. Регуляция и стимуляция воспроизводительной функции коров гонадотропными и гестагенными препаратами / Г.А. Черемисинов, А.Г. Нежданов // Проблемы эндокринологии: тез. докл. научн. конф., Воронеж, - 1975 г. / Акад. наук СССР Воронежск. с.-х. ин-т. – Воронеж, 1995. – С. 34-38.
8. Эрст, Л.К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных / Л.К. Эрст, Н.И. Сергеев. – М.: Агропромиздат, 1999. - С.190-193.