

чения белой и розовой телятины рекомендации. – ВНИИЖ. 2011. 74 с.

// Spec. Circ. / Ohio State Univ. Ohio Agr. Res. and Dev. Cent. 1998. № 163. P. 54-57.

8. Eastridge, M.L., Roseler, D.K. Grain intake and growth of pre-weaned dairy calves

DOI:10.34617/pghg-s427

УДК 638.145.43

### **КРИОУСТОЙЧИВОСТЬ СПЕРМЫ ТРУТНЕЙ В ЭЛЕКТРОЛИТНОЙ И НЕЭЛЕКТРОЛИТНОЙ СРЕДЕ**

**Гулов Алексей Николаевич**<sup>1</sup> - науч. сотр., соискатель

**Сайфутдинова Зифа Низамовна**<sup>2</sup> – канд. биол. наук

**Митрофанов Дмитрий Викторович**<sup>1</sup> – науч. сотр., соискатель

**Языков Иван Андреевич**<sup>1</sup> – мл. науч. сотр., магистрант

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр пчеловодства»

<sup>2</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук»

Рассматриваются вопросы криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы. В качестве разбавителей испытывали питательные среды для культур клеток насекомых. Тестировали криопротекторы - диметилсульфоксид (контроль), натуральный пчелиный мед, мед в сочетании: с глицерином, ДМСО, этанолом, метанолом. Выявлена низкая жизнеспособность (Lim 36,5±1,8 % - 39,9±0,3 %) и подвижность замороженооттаянной спермы (Lim 2,0 - 4,0 балла), разбавленной в синтетических средах. Высокую жизнеспособность сперматозоидов и их подвижность 4,0 балла наблюдали в образце с 3 % глицерином 78,0±1,4 % и с 10% ДМСО 79,6±1,2 %. При этом, сперма до замораживания находилась в состоянии мезабиоза в течение 3 мес. при 3 °С.

**Ключевые слова:** криоконсервация спермы; жизнеспособность сперматозоидов.

### **THE DRONE SPERM OF CRYOSTABILITY IN AN ELECTROLYTE AND NON- ELECTROLYTE ENVIRONMENT**

**Gulov Alexey Nikolaevich**<sup>1</sup>, researcher

**Sayfutdinova Zifa Nizamovna**<sup>2</sup>, leading researcher

**Mitrofanov Dmitry Viktorovich**<sup>1</sup>, researcher

**Yazykov Ivan Andreyevich**<sup>1</sup>, junior researcher, undergraduate

<sup>1</sup>FSBSI «Federal beekeeping research centre»

<sup>2</sup>FSBSI «Federal Scientific Centre VIEV»

The questions of cryopreservation of sperm of honeybee drones are considered. Nutrient media for insect cell cultures were tested as diluents. We tested cryoprotectors - dimethylsulfoxide (control), natural honey, honey in combination with glycerol, DMSO, ethanol, and methanol. Low sperm viability (Lim 36.5±1.8 % - 39.9±0.3 %) and mobility was detected of frozen-thawed sperm (Lim 2.0 – 4.0 points) diluted in synthetic media. High sperm viability and motility of 4.0 points were observed in a

sample with 3 % glycerol 78.0±1.4 % and 10 % DMSO 79.6±1.2 %. Before freezing, sperm was in a state of mesabiosis for 3 months at 3 °C.

**Key words:** sperm cryopreservation; sperm viability

Главная цель низкотемпературного хранения спермы - это сделать возможным использование ее для искусственного осеменения пчелиных маток с сохранением воспроизводительной способности на уровне осемененных свежееотобранной спермой или полученных в условиях естественного спаривания. В этом случае возможно широкое применение замороженной спермы с целью получения ранних плодных маток. При решении этой задачи необходимо вести систематический контроль состояния спермы в процессе криохранения, осуществлять поиск оптимальных разбавителей и криопротекторов.

Во время длительного хранения в жидком азоте сперматозоиды подвергаются воздействию целого ряда факторов, вызывающих структурные и функциональные изменения клеток. Данные процессы могут быть сгенерированы тем или иным видом криофилактика или реакцией среды экстендера. Криоконсервация на основе метанола с добавлением яичного желтка способствовала значительному улучшению подвижности сперматозоидов после замораживания-оттаивания [1]. Использование этилового спирта в составе среды для замораживания спермы хряка увеличило абсолютный показатель живучести сперматозоидов. Добавление пчелиного меда в состав разбавителей значительно улучшает подвижность сперматозоидов после оттаивания, целостность их мембран и акросом, а также снижает количество аномалий в морфологии сперматозоидов у лошадей [2], быков [3], буйволов [4], коз [5], баранов [6], крыс и мышей, рыб, человека.

Цель работы – изучить влияние различных разбавителей и криопротекторов на криоустойчивость спермы трутней.

**Методика исследований.** Качество спермы оценивали по показателям - подвижности, целостности цитоплазматиче-

ских мембран сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии с использованием набора LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit L 7011 (Life Technologies Limited, Scotland) и морфологии спермиев методом суправитального окрашивания набором Diff Quick. В первой серии исследований проводили испытание питательных сред для культур клеток насекомых: среда C46 pH 7,2; Lonza Insect-XPRESSTM pH 6,1 осмолярность 371 мосмоль/кг; Schneider's Drosophila Medium с L-глутамином pH 4,6, осмолярность 278 мосмоль/кг; Grace's Insect Medium (2x) pH 6,3, осмолярность 715 мосмоль/кг; JPL-41 Insect Medium с хлоридом кальция, бикарбонатом натрия и без L-глутамин, pH 5,9-6,5, осмолярность 330-370 мосмоль/кг. Во второй серии опытов исследовали криоустойчивость спермы, разбавленной в среде C46 в сочетании с яичным желтком без добавления и с добавлением ДМСО. Задача третьей серии опытов заключалась в изучении криоустойчивости спермы в неэлектролитной среде. Испытывали следующие варианты разбавителя: мед+лактоза+сахароза+яичный желток; мед+лактоза+сахароза+яичный желток+метанол 10%; мед+лактоза+сахароза+яичный желток+этанол 10%; мед+лактоза+сахароза+яичный желток+10% ДМСО; мед+лактоза+сахароза+яичный желток+3% глицерин. Концентрацию ионов водорода в разбавителе доводили 6М NaOH до значения pH 8,2. Исходный pH меда - 4,0.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В ходе предварительной оценки испытываемых синтетических сред выявилось их, весьма положительное действие, на физиологическое состояние сперматозоидов (табл. 1).

Таблица 1 – Показатели качества спермы до и после криохранения в течение 7 сут

Разбавитель	Показатели качества					
	Жизнеспособность, %		Подвижность, балл		Сперматозоиды с дефектами головок, %	
	после	до	после	до	после	до
Lonza	39,9±0,3 <sup>ab</sup>	78,8±0,65	2,0	5,0	36,0±1,7	25,4±6,3
Graces	38,2±0,7 <sup>cb</sup>	78,7±6,4	3,5	5,0	38,4±2,7	41,3±4,6 <sup>ab</sup>
C46(контроль)	55,1±2,5 <sup>b</sup>	88,7±2,2	4,0	5,0	23,8±1,5 <sup>b</sup>	19,3±3,8 <sup>b</sup>
Schneider's	36,5±1,8 <sup>db</sup>	95,2±2,8	2,0	5,0	44,3±2,4 <sup>db</sup>	47,0±4,2
JPL-41	38,4±0,8 <sup>eb</sup>	91,2±0,4	4,0	5,0	36,2±3,1	23,0±5,1

авсde- достоверные различия при  $p < 0,01$

Цитоплазматическая мембрана сперматозоидов, разбавленных в подкисленной синтетической среде, подверглась наибольшему воздействию условий криохранения. Контрольные образцы, разбавленные в среде с pH 7,2 (C46) достоверно надежно были защищены от агрессивных

условий хранения в жидком азоте.

Применение яичного желтка, в ходе собственных исследований, благотворно сказалось на сохранности плазматических мембран сперматозоидов трутней (табл. 2).

Таблица 2 – Показатели качества заморожено-оттаянной спермы после 7 сут криохранения

Разбавитель	Показатели качества	
	Жизнеспособность, %	Подвижность, балл
C46 (1,0 мл) + ДМСО 10% (контроль)	51,5±3,5 <sup>ca</sup>	1,5
C46 (0,5 мл) + ДМСО 10% + 0,5 мл желток	47,2±11,3 <sup>ba</sup>	1,5
C46 (0,5 мл) (без ДМСО) + 0,5 мл желток	2,7±0,7 <sup>a</sup>	0,5

bc- достоверные различия при  $p < 0,05$

Однако подвижность сперматозоидов, как опытного, так и контрольного образцов, была предельно низкой на одном уровне. Полусинтетическая среда C46 с добавлением яичного желтка и без ДМСО не обладает криофилактическими свойствами для защиты жизненного ресурса спермы трутней.

Результаты исследований продемонстрировали нам натуральный пчелиный мед в качестве криопротектора, а в сочетании с 3% глицерином или 10% диметилсульфоксидом мед обеспечил самую высокую защиту жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы в сравнении с синтетическими средами и яичным желтком (табл. 3).

Таблица 3 – Показатели качества спермы после криоконсервации в электролитной и неэлектролитной среде

Показатели	Разбавитель			
	С46+ДМСО 10% (контроль)	Мед+глицерин 3%	Мед+ДМСО 10%	Мед
Жизнеспособность, %	55,1±2,5 <sup>a</sup>	78,0±1,4 <sup>ba</sup>	79,6±1,2 <sup>ca</sup>	37,2±0,5 <sup>d</sup>
Подвижность, балл	4,0	4,0	4,0	3,0

abc- достоверные различия при  $p < 0,01$

**Выводы.** Предварительные результаты исследований впервые демонстрируют перспективы натурального пчелиного меда по сохранению жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы во время криоконсервации. Длительное охлаждение неразбавленной спермы (состояние мезабиоза) в течение 3 мес при 3 °С создает условия для более эффективного проявления свойств криопротекторов глицерина и ДМСО по защите оргanelл клеток и их энергетического потенциала при низкотемпературном хранении.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Рязанской области (проект 18-44-620001).*

### Список литературы

1. El-Sheshtawy R.I. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters / R.I. El-Sheshtawy, D.A. El-Badry // Asian Pacific Journal of Reproduction. - 2016. - V. 5(4). - P. 331-334.

2. Herranz-Jusdado J.G. European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation of large vol-

umes / J.G. Herranz-Jusdado, V. Gallego, C. Rozenfeld // Aquaculture. - 2019. - V. 506. - P. 42-50.

3. Kandiel M.M.M. Quantitative Ultrastructure Evaluation of Egyptian Buffalo Bull Frozen-Thawed Spermatozoa under the Effect of Honey / M.M.M. Kandiel, A.R.M. El-Khawagah // Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences. - 2019. - V. 6 (3). - P. 92-98. DOI: 10.21276/sjavs.2019.6.3.4

4. Malik A. Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali / A. Malik, R. Fauzi, M.I. Zakir // Acta veterinaria indonesiana. - 2017. - V. 5(2). - P. 98-104.

5. Shikh Maidina M. Supplementation of Nigella sativa Oil and Honey Prolong the Survival Rate of Fresh and Post-Thawed Goat Sperms / M. Shikh Maidina, M.H. Padlana // Tropical Animal Science Journal. - 2018. - V. 41(2). - P. 94-99. DOI: <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.2.94>

6. Zaghoul A. A. Relevance of Honey Bee in Semen Extender on the Quality of Chilled-Stored Ram Semen / A.A. Zaghoul // J.Animal and Poultry Prod. - 2017. - V. 8(1). - P. 1- 5.