

On the basis of the carried-out research it is revealed that the most valuable in the food relation surpassing on functional properties (possessing high functional properties) is poultry of industrial production, in particular pectoral muscles.

Key words: Protein, functional properties, water-binding (WBA) ability, water-holding (WHA) ability, fat holding ability(FHA), emulsifying ability (EA), emulsion stability (ES), chest muscles, thigh muscles.

УДК 619:636.083.454

Усенбеков Е.С., Бименова Ж.Ж., Шманов Г.С., Кузембаев Ж.С., Жумаханова Р.М.

Казахский национальный аграрный университет

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФЕРТИЛЬНОСТИ СПЕРМЫ БЫКОВ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Аннотация

Авторы статьи в качестве дополнительного критерия оценки фертильности спермы быков производителей голштинской породы рекомендуют использовать определение протамина и гистона в спермиях, метод ДНК фрагментации. Максимальный допустимый уровень содержания спермиев с фрагментацией ДНК в замороженных спермодозах при искусственном осеменении коров племенного хозяйства ТОО «Амиран» по результатам исследования колебался от 13,00% до 17,15%.

Ключевые слова: замороженная сперма, краситель «Aniline Blue», ДНК фрагментация, фертильность спермиев быков.

Введение

В настоящее время известны способы определения фертильности спермиев быков-производителей путем проведения анализа структуры хроматина, однако недостатком указанного способа является низкая эффективность определения фертильности спермиев быков-производителей, вследствие отсутствия критерия оценки оплодотворяющей способности спермиев быков производителей. Анализ литературных данных показывает, что результаты искусственного осеменения молочных коров зависят не только от их репродуктивного состояния, но и в значительной степени от оплодотворяющей способности спермиев быков производителей. Около 40% производителей имеют пониженную фертильность, незначительная часть бесплодна. В связи с этим определение фертильности спермиев самцов производителей имеет большое экономическое и биологическое значение [1,2].

В медицине для оценки оплодотворяющей способности спермиев мужчин используются такие молекулярно-генетические методы, как ДНК фрагментация, определение количества ядерного белка в спермиях. Указанные методы достаточно информативные, позволяют выявить мужское бесплодие, связанное с процессом формирования зрелых спермиев [3].

Известно, что превращение гистона в протамины является наиболее важным шагом в формировании спермиев. В норме, зрелый хроматин спермиев содержит приблизительно 85% протамина и 15% гистона, тогда как незрелый хроматин содержит более 15% гистона. Протамины являются высокоспецифическими протеинами, ядро которых содержит много аргинина и в небольшом количестве содержится - цистеин. Метод

определения ядерного белка в спермиях основан на свойстве окрашивания протеина, гистона, богатого аминокислотой, лизином в темно-синий цвет, краской «AnilineBlue», (головка спермиев окрашивается в темно-синий цвет), а ядро зрелых спермиев (протамин) окрашивается в розовый цвет, так как богат аминокислотами, аргинином и цистеином[4,5].

В настоящее время традиционные методы оценки качества спермы быков: определение концентрации, морфологии, подвижности спермиев не всегда являются информативными способами диагностики фертильности спермиев. Применение современных молекулярно-генетических методов оценки оплодотворяющей способности спермиев быков, как ДНК фрагментация спермиев (Sperm DNA fragmentation, SDF), тест депрессии хроматина спермиев (Sperm chromatin dispersion test, SCD) позволяет повысить результативность искусственного осеменения коров.

Авторами эксперименты по оценке фертильности спермиев проводились на 201 быках голштинской породы центра искусственного осеменения Испании двумя способами: ДНК фрагментация спермиев (анализ криоконсервированной спермы после оттаивания - SDF-0, анализ спермы после 6 часовой инкубации при температуре 37°C - SDF-6) и тест депрессии хроматина спермиев (SCD). Уровень ДНК фрагментации - SDF-0 у быков производителей составил в среднем 3,35, с колебаниями от 1,0 до 20,40, SDF-6 в среднем 3,60, с колебаниями от 1,0 до 19,47. Наследуемость SDF признака у быков была умеренно высокой (0,41 и 0,29 для SDF-0и SDF-6, соответственно), а данный показатель у одного и того же животного был высоким (0,73 и 0,70 для SDF-0 и SDF-6 соответственно). Для общей оценки результативности искусственного осеменения были использованы две критерий: оценка сервисной ценности быка (estimated service bull value, ESBV) и оценочная генетическая ценность (estimated genetic values - EGV). Результаты дискриминантных анализов свидетельствуют, что коэффициент корреляции Пирсона между значениями SDF-0 анализа и ESBV имел цифровое значение в пределах от 0,43 до 0,50, $P < 0,001$, данный показатель по SDF-6анализу был низким, от 0,15 до 0,26. Таким образом, повышение цифрового значения SDF анализа от 7% до 10% является индикаторным показателем низкого успеха при искусственном осеменении коров[6].

Известно, что любая деформация или нарушение хроматина ДНК спермиев в результате отрицательного действия технологических процессов (криоконсервация спермиев, технология получения сексированной спермы) влияет на оплодотворяемость и часто стельность у коров на ранней стадии заканчивается эмбриональной смертностью. Для изучения нежелательного влияния криоконсервации спермы и технологии получения сексированной спермы на степень повреждения ДНК спермиев быков был оптимизирован метод -TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling). В качестве материала для TUNEL анализа были использованы свежеполученные спермы от двух быков черной Японской породы и замороженные спермы 34 племенных быков голштинской породы. По результатам экспериментов средний TUNEL индекс спермы был 4,7% и 55,7% для быков черной Японской породы, 4,9% и 39,5% для быков голштинской породы. Слабая отрицательная корреляция между индексом TUNEL спермы и зачатием была выявлена у быков голштинской породы, ($P < 0,05$), авторы в качестве дополнительного параметра оценки качества спермы быков производителей рекомендуют использовать TUNEL индекс [7].

В работе анализируется эффективность разных способов идентификации фертильности и субфертильности спермы мужчин и быков производителей, рассматривается коммерческий потенциал применения методов оценки спермы способами: SCSA, COMET, SCD (Sperm Chromatin Dispersion) или HALO, AOT (Acridine Orange test), TUNEL. Суть метода SCSA заключается в применении проточной цитометрии для

определения состояния хроматина и целостности ДНК спермиев, окрашенные красителем ДНК (акридиновый краситель) проходят через фокальную точку лазерного луча, лазерный свет приводит к тому, что краситель излучает флуоресцентный свет определенного цвета.

Разработанные тест системы COMET (1998) и SCD (2003) являются простыми в выполнении, не требуется проточный цитометр, используются световой микроскоп, пропускаемая способность образцов 50-200 спермиев за один анализ, однако полученные результаты статистически не достоверны. Чувствительность методов TUNEL и SCSA оценивалась с помощью регрессионного анализа и корреляция результатов TUNEL и SCSA исследований у быков составила 0,78 ($P < 0,001$), у жеребцов 0,65 ($P < 0,001$), у баранов 0,84 ($P < 0,002$). Необходимо отметить, что все существующие тест системы SCSA, COMET, SCD, AOT, TUNEL чувствительные, специфичные, позволяет определить состояние хроматина и степень фрагментированности ДНК спермиев, однако, пороговые значения варьибельные[8].

Целью исследования явилось исследование содержания ядерного белка в спермиях быков производителей и изучение уровня ДНК фрагментации спермиев с помощью молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы исследований

Определение количества ядерного белка в спермиях 14 быков производителей племенного хозяйства ТОО «Байсерке-Агро» проводилось в лаборатории кафедры акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства КазНАУ с использованием набора «Nuclear Protein Assay» sperm nuclear protein assay using «Aniline Blue» staining производства Индийской компании «Sperm Processor Pvt. Ltd». К 100 мкл образца замороженной спермы добавляли 400 мкл физиологического раствора и центрифугировали в течение 2-3 минут при обороте 2000g. Разбавляли сперму с таким расчетом, чтобы конечная концентрация в 1 мл спермы была в пределах 40-60 млн спермиев. Затем удаляли надосадочную жидкость, наносили с помощью микропипетки 5 мкл осадочной жидкости на чистое предметное стекло, готовили мазок и высушивали в течение 5-7 минут на воздухе.

Ставили предметное стекло в горизонтальном положении и вносили на мазок 1 мл фиксирующего раствора, чтобы полностью был покрыт мазок закрепителем (экспозиция 5 минут). По истечении 5 минут сливали фиксирующий раствор и в вертикальном положении, в стаканчике дистиллированной воды отмывали мазок от закрепителя. Высушивали мазок на воздухе и в течение 5 минут окрашивали красителем №1 в количестве 1 мл, чтобы мазок был полностью покрыт раствором, затем сливали краситель №1, в стаканчике дистиллированной воды отмывали мазок от красителя, высушивали на воздухе. Потом эту же процедуру повторяли с красителем №2, экспозиция 2 минуты.

Исследование уровня ДНК фрагментации спермиев проводилось согласно протокола. Ставили пробирку с агарозой в водяную баню ($+70^{\circ}\text{C}$) экспозиция 15-20 минут, затем пробирку на 5 минут поместили в термостат ($+37^{\circ}\text{C}$), параллельно готовили образец спермы, доводили концентрацию спермы до 10-15 млн спермиев в 1 мл путем разбавления спермы физиологическим раствором, добавляли в пробирку 60 мкл спермы, несколько раз пипетировали, затем ставили пробирку в термостат и наносили с помощью пипетки 15-20 капель смеси спермы с агарозой на предметное стекло, ставили аккуратно на образец покровное стекло, чтобы не образовались пузырьки воздуха, поместили предметное стекло в холодильник ($+2+8^{\circ}\text{C}$) на 5 минут, по истечении времени аккуратно убирали покровное стекло. Затем предметное стекло поместили в специальный лоток и добавляли 8-10 мл реагента I, экспозиция 7 минут, сливали реагент I, высушивали предметное стекло с помощью фильтровальной бумаги и поместили предметное стекло в

лоток, добавляли 8-10 мл реагента II, экспозиция 20 минут, сливали реагент II, промывали дистиллированной водой, высушивали предметное стекло, ставили предметное стекло в горизонтальном положении и добавляли 1 мл 70% этилового спирта, экспозиция 2 минуты, сливали спирт и затем эту же процедуру повторяли с 96%, 100% этиловым спиртом. На предметное стекло наносили 500 мкл красителя I, экспозиция 2 минуты и добавляли на мазок 1 мл красителя II, экспозиция 10-15 минут, высушивали мазок на воздухе в течение 7-10 минут. Всего посчитали в нескольких поле зрения всего 200 спермиев и по формуле определяли процентное содержание спермиев с протамином, как зрелых спермиев и с гистоном, как незрелых спермиев[9].

Результаты исследований и их обсуждение

Для определения уровня ДНК фрагментации мазок исследовали под микроскопом с помощью иммерсионного масла под увеличением 40х. По результатам микроскопии спермий разделили на три группы: спермий без фрагментации ДНК ($R_1/R_2 \leq 1,4$), спермий с фрагментацией ДНК (R_1/R_2 от 1,0 до 1,4) и дегенерированные спермий ($R_1/R_2 \geq 1,0$), (рис 1).

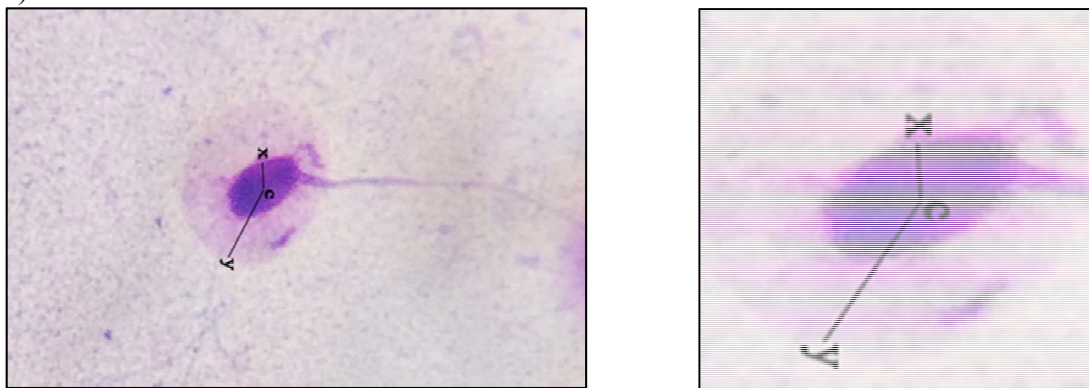


Рисунок 1. Критерий определения уровня фрагментации ДНК спермиев, радиус R_1 = от центра ядра спермиев до оболочки спермиев (C→X), радиус R_2 = от центра ядра спермиев до внешнего края ореола спермиев (C→Y).

Различают внутренние и внешние причины ДНК фрагментации спермиев млекопитающих, к внутренним относятся окислительный стресс, эндогенная активация эндонуклеазы, изменение в ремоделировании хроматина во время спермиогенеза. Внешние факторы, влияющие на целостность ДНК спермиев: компоненты разбавителя спермы, криоконсервация спермы, техника оттаивания замороженной спермы [8]. В наших экспериментах в качестве материала для исследования были использованы замороженные в соломинках спермы быков производителей. Как видно на рисунке 2 спермий в зависимости от сохранности хроматина спермиев быков производителей были разделены на три группы: спермий без фрагментации ДНК (1), спермий с фрагментацией ДНК (2) и дегенерированные спермий (1).

Нами, была установлена существенная взаимосвязь оплодотворяемости коров с фертильностью спермы, определяемой по уровню ДНК фрагментации (таблица 1). Так, были протестированы образцы спермы 14 быков производителей голштинской породы с процентом оплодотворяемости не менее 70%, доля спермиев без фрагментации ДНК в первой группе была 80,65%, во второй группе 86,10%. Таким образом, максимальный допустимый уровень содержания спермиев с фрагментацией ДНК в замороженных спермодозах колеблется от 13,00% до 17,15%.

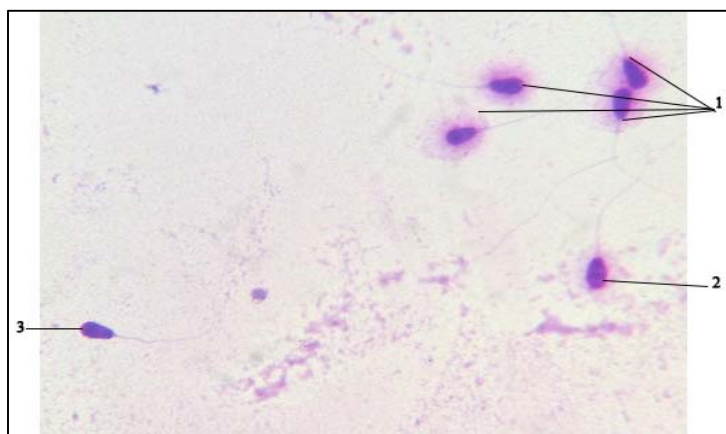


Рисунок 2. Сpermий без фрагментации ДНК - 1, spermий с фрагментацией ДНК - 2, spermий с дегенерацией -3.

Таблица 1. Содержание spermиев без фрагментации ДНК, с фрагментацией ДНК и с дегенерацией в замороженных spermодозах быков производителей оплодотворяемостью не менее 70%.

Опытные группы и число быков производителей		Процент оплодотворяемости spermы быков при искусственном осеменении коров не менее 70%		
		Spermий без фрагментации	Spermий с фрагментацией ДНК	Spermий с дегенерацией
I	n=10	80,65%	17,15%	2,20 %
II	n=4	86,10%	13,00%	0,90%

Выводы

Следует отметить, что результативность искусственного осеменения животных зависит не только от функционального состояния репродуктивных органов коров, но и от оплодотворяющей способности spermиев быков производителей. Результаты определения ядерного белка (протамина и гистона) в spermиях показывают, что в spermиях быков производителей содержатся протамины, которые свидетельствует о высоком качестве spermы, так как в образцах не обнаружены spermий с гистонем. Согласно результатам исследования максимальный допустимый уровень содержания spermиев с фрагментацией ДНК в замороженных spermодозах при искусственном осеменении коров ТОО «Амиран» составил от 13,0% до 17,15%. Для оценки качества spermы, кроме традиционных методов исследования, рекомендуется использовать - определение уровня фрагментации ДНК.

Литература

1. Flowers W.L. Sperm characteristics that limit success of fertilization. J. Anim. 2013. v. 91. no. 7 3022-3029
2. Иолчиев Б.С. Индекс фрагментации ДНК хроматина в spermатозоидах при оценке качества семени у быков-производителей / Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Кленовицкий П.М., Кононов В.П., Таджиева А.В. // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 4. С. 31-35.
3. Руднева С.А., Брагина Е.Е., Арифудин Е.А., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Ермолаева С.А., Курило Л.Ф., Черных В.Б. Фрагментация ДНК в spermатозоидах и ее взаимосвязь с нарушением spermатогенеза. Андрология и генитальная хирургия, 2014. № 4. С. 26-33.
4. Rodrigo V. de Oliveira, SuleDogan, Lauren E. Belser, Abdullah Kaya, Einko Topper, Arlindo Moura, Giselle Thibaudeau and Erdogan Memili. Molecular morphology and function of

bull spermatozoal linked to histones and associated with fertility. *Reproduction* (2013) 146 263-272.

5. Sule Dogan, Peter Vargovic, Rodrigo Oliveira, Lauren E. Belser, Abdullah Kaya, Arlindo Moura, Peter Sutovsky, John Parrish, Einko Topper, and Erdog'an Memili. Sperm Protamine-Status Correlates to the Fertility of Breeding Bulls. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (2015) 92(4):92, 1-9

6. S. Karoui, C. Díaz, C. González-Marín, M.E. Amenabar, M. Serrano, E. Ugarte, J. Gosálvez, R. Roy, C. López-Fernández, M.J. Carabaño. Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility? *J. Anim. Sci.* 2012.90:2437-2449.

7. Kumiko TAKEDA, Kyoko UCHIYAMA, Masashi KINUKAWA, Takahiro TAGAMI, Masahiro KANEDA and Shinya WATANABE. Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 61, No 3, 2015, p 185-190,

8. Donald P. Evenson. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science* 169 (2016) 56-75

9. Джуланов М.Н., Иванов Н.П., Намет А.М., Усенбеков Е.С., Орынханов К.А., Алиев М.А., Тургумбеков А.А., Хизат С., Кенешбаев М.Д. Рекомендации по повышению эффективности воспроизводства крупного рогатого скота молочного и мясного направлений продуктивности. Одобрены решением ученого совета ТОО «КазНИВИ» МСХ РК (протокол №7 от 28.09.2017 г). Алматы, ул Ади Шарипова 120, оф 7. Издат «PrintMaster» С 20

Усенбеков Е.С., Бименова Ж.Ж., Шманов Г.С., Кузембаев Ж.С., Жумаханова Р.М.

БҰҚА ШӘУЕТІНІҢ ҰРЫҚТАНДЫРҒЫШ ҚАБЫЛЕТІН МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ӘДІСТЕРМЕН БАҒАЛАУ

Аңдатпа

Мақала авторлары голштейн тұқымдас бұқаларының спермийлерінің ұрықтандырғыш қабилетін анықтауға балама сынақ әдісі ретінде, шәуеттегі спермийлер құрамындағы протамин және гистон ақзаттарын анықтауды, ДНҚ фрагментация тәсілін қолдануды ұсынады. «Амиран» ЖШС асыл тұқымды шаруашылығында сиырларды қолдан ұрықтандыру кезіндегі бұқалардың қатырылған шәуетіндегі ДНҚ фрагментациясының ең жоғарғы пайдалануға болатын деңгейі 13,0%-дан 17,15%-ға дейін аралықта.

Кілт сөздер: қатырылған шәует, «Aniline Blue» бояуы, ДНҚ фрагментация, бұқа спермийлерінің ұрықтандыру қабілеті.

Ussenbekov Y., Bimenova Zh., Shmanov G., Kuzembaev Zh., Zhumakhanova R.

MOLECULAR-GENETIC METHODS OF FERTILITY EVALUATION OF SPERM BULLS

Annotation

The authors recommend using the definition of protamine and histone in spermatozoa, the DNA fragmentation method as an additional criterion for assessing the fertility of sperm of bulls of Holstein breed producers. The maximum permissible level of sperm content with DNA fragmentation in frozen sperm doses with artificial insemination of cows of breeding farms of Amiran LLP, according to the results of the study, ranged from 13,00% to 17,15%

Key words: frozen semen, dye «Aniline Blue», DNA fragmentation, fertility of bull spermatozoa.

UDK 619:616-07:616.995.1]:636.3

**Shabdarbayeva G.S., Usmangaliyeva S.S., Khussainov D.M.,
Akhmetova G.D., Asylhanov D.U.**

Kazakh national agrarian university

OBTAINING OF ANTICOENUROSISS SERUM

Annotation

The article refers to veterinary helminthology, immunology and biotechnology, in particular to the method of obtaining the immune serum used in the serological diagnosis of the price tag. The method of obtaining an antiserum serum provides (in comparison with the known method) the production of a more active serum, which makes it possible to increase the reliability of serological reactions.

Key words: helminth, coenurosis, adjuvant, antigen, vesicle fluid, immunization, cyst, titer, antibodies.

Introduction

General Description: Adults (*Taenia multiceps*) occur in the small intestine of dogs and wild carnivores, and can reach lengths of up to 1 metre. The *Coenurus* (intermediary stage) occurs in sheep and is usually localised in the brain or spinal cord. Other ruminants and man can also be infected. The *Coenurus* is a large cyst full with liquid and many floating scolices, it could reach 5cm or more in diameter [1].

Life Cycle: Indirect cestode life cycle. Adults in dogs pass gravid proglottides with eggs in the faeces. When the proglottides burst the eggs are disseminated in the environment contaminating pastures and water supplies. When ingested by sheep (or other ruminants) the eggs hatch. The hexacanth develops into metacestods which penetrate the intestinal wall and enter the blood stream. Only those parasites which reach the nervous system will develop into a fully developed *Coenurus* in 7 to 8 months. The definitive host (dog) gets infected by eating infected sheep tissue. **Location:** Adult tapeworms live in the small intestine of dogs. *Coenurus cerebralis* are found in the brain or spinal cord of sheep. **Geographical Distribution:** Worldwide. **Significance:** Feeding sheep carcasses to dogs may cause infection and perpetuation of the infection cycle. The intermediary stages (*Coenurus*) cause severe problems in infected sheep including death [2, 3].

Effect on Intermediate Host: An acute meningoencephalitis in lambs may occur as a consequence of migration of large numbers of immature stages of this parasite. The chronic stages develop as a result of increased destruction of brain and spinal cord tissue as the *Coenurus* grows. The neurological clinical signs are recognised as "gid" or "staggers" and are dependent on the location of the cyst in the central nervous system.

Coenurus cerebralis is the intermediary larval stage of *Taenia multiceps*: a tapeworm which is found in the small intestine of dogs and wild canids [5]. Sheep are considered to be the animal species most susceptible [4, 6]. Ovine coenurosis is found in Africa and Asia, with prevalence ranging from 1.3 to 9.8 % [7, 8]. *C. cerebralis* inhabits the central nervous system and