

Разработка фотостимулятора для повышения эффективности репродуктивных технологий в свиноводстве и фотофизических механизмов, определяющих регуляторное действие света на сперму хряков

**В. Ю. Плавский¹⁾, А. И. Будевич²⁾, И. А. Леусенко¹⁾, С. В. Якимчук¹⁾,
А. Н. Собчук¹⁾, Т. С. Ананич¹⁾, А. И. Третьякова¹⁾, А. В. Микулич¹⁾,
Л. Г. Плавская¹⁾, В. М. Катаркевич¹⁾, А. Л. Шмитко¹⁾, С. А. Сапсалева²⁾,
Н. В. Януть²⁾, Т. Н. Бровко²⁾**

¹⁾ *Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by*

²⁾ *РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»,
г. Жодино, Минская обл., Беларусь*

Представлены данные о разработанном авторами фотостимуляторе для повышения оплодотворяющей способности спермы хряков-производителей, интегрированном в оборудование (климабокс), традиционно используемое в племенных и товарных свиноводческих хозяйствах в технологиях искусственного оплодотворения. Показано, что в основе механизма регуляторного действия света на сперму животных лежит изменение редокс-состояния спермиев, влияющего на их функциональную активность, за счет возбуждения эндогенных фотосенсибилизаторов и генерации активных форм кислорода.

Ключевые слова: фотостимулятор; репродуктивные технологии; сперма хряков; оплодотворяющая способность; эндогенные фотосенсибилизаторы; активные формы кислорода.

Development of a photostimulator to increase the effectiveness of reproductive technologies in pig breeding and photophysical mechanisms that determine the regulatory effect of light on boar sperm

**V. Y. Plavskii¹⁾, A. I. Budevich²⁾, I. A. Leusenko¹⁾, S. V. Yakimchuk¹⁾,
A. N. Sobchuk¹⁾, T. S. Ananich¹⁾, A. I. Tretyakova¹⁾, A. V. Mikulich¹⁾,
L. G. Plavskaya¹⁾, V. M. Katarkevich¹⁾, A. L. Shmitko¹⁾, S. A. Sapsalev²⁾,
N. V. Yanut²⁾, T. N. Brovko²⁾**

¹⁾ *B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail:
v.plavskii@ifanbel.bas-net.by*

²⁾ *RUE "Scientific and Practical Center of the NAS of Belarus on Animal Husbandry", Zhodino,
Minsk region, Belarus*

The data on a photostimulator developed by the authors to increase the fertilizing ability of boar sperm, integrated into the equipment (climabox) traditionally used in breeding and commercial pig farms in artificial insemination technologies, are presented. It has been shown that the mechanism of the regulatory effect of light on animal sperm is based on a change in the redox state of sperm, affecting their functional activity, due to the excitation of endogenous photosensitizers and the generation of reactive oxygen species.

Keywords: photostimulator; reproductive technologies; boar sperm; fertilizing ability; endogenous photosensitizers; reactive oxygen species.

Введение

Технологии искусственного осеменения становятся все более распространенными в современном животноводстве. По данным [1], в свиноводческой отрасли развитых стран около 95 % сельскохозяйственных ферм используют искусственное осеменение, которое не только обеспечивает повышение продуктивных и репродуктивных показателей у животных, но и способствует сохранению их генетического потенциала. Одной из актуальных проблем, возникающих в ходе практической реализации данной репродуктивной технологии, является поддержание на высоком уровне функциональных свойств сперматозоидов в течение достаточно длинного временного промежутка после получения спермы от хряка-производителя. Исследования последних лет убедительно свидетельствуют, что перспективным методом поддержания функциональных свойств сперматозоидов в процессе их хранения является предварительное воздействие на сперму излучения видимой области спектра лазерных или светодиодных источников [2–4]. Согласно масштабным исследованиям, выполненным в различных странах мира [5], световое облучение спермы хряков способно обеспечить увеличение как показателей опороса, так и размеров и выживаемость помета.

В настоящей работе представлены данные о разработанном авторами фотостимуляторе, основанном на использовании светодиодных источников, для повышения оплодотворяющей способности спермы хряков. Исследован также фотофизический механизма регуляторного действия света на сперму животных.

1. Материалы и методы исследования

Сперма животных. Исследования механизмов действия оптического излучения проводили, используя в качестве объектов сперму хряков породы *ландрас* (поставщик Республиканское унитарное предприятие по племенному делу «Минское племпредприятие», Несвижский филиал).

Спектрально-флуоресцентные измерения. Измерения спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции спермы проводили на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Inc., France).

Хемилюминесцентный метод контроля светоиндуцированного образования активных форм кислорода. Измерения параметров светоиндуцированного свечения спермы осуществляли на хемилуминометре Lum 5773 (ДИСофт, Россия),

2. Фотостимулятор спермы хряков

Внешний вид фотостимулятора спермы хряков показан на рис. 1. Его отличительной особенностью является интегрированность в оборудование (климабокс), традиционно используемое в племенных и товарных хозяйствах в технологиях искусственном осеменении свиней. Фотостимулятор предназначен для повышения оплодотворяющей способности спермы хряков-производителей в результате воздействия на нее излучения светодиодных источников. Эффект достигается за счет повышения важнейших свойств спермиев: подвижности, переживаемости, целостности мембран, поддержании на более высоком уровне биологической полноценности при хранении, а также их оплодотворяющей способности.



Рис. 1. Внешний вид фотостимулятора спермы хряков

Необходимость использования климобокса продиктована тем, что оптимальная температура для поддержания функциональных свойств спермы хряков составляет 16–18 °С. При этом в соответствии с технологическими инструкциями, свежеполученные эякуляты хряков разбавляются с использованием специальных растворов – питательных сред, предназначенных для сохранения жизнеспособности и подвижности сперматозоидов, снижения их агглютинации и поддержания благоприятной среды для долгосрочного или кратковременного хранения спермы перед искусственным осеменением. После разбавления эякуляты расфасовывают в специальные контейнеры – стерильные (одноразовые) прозрачные для света флекситюбы и помещают в климобокс. Климобокс содержит встроенные светодиодные источники, обеспечивающими возможность воздействия излучением красной области спектра с длиной волны в максимуме спектра испускания при $\lambda_{\text{макс}} = 630$ нм или $\lambda_{\text{макс}} = 740$ нм. Необходимость использования света дальнего красного диапазона обусловлена тем, что отдельные племенные хозяйства используют несколько видов красителей с целью идентификации спермы конкретных пород животных для исключения непреднамеренного оплодотворения свиноматки спермой хряка другой породы. При этом специально выполненные нами исследования показали, что применение излучения с длиной волны $\lambda_{\text{макс}} = 630$ нм способно ингибировать активность спермиев за счет возбуждения некоторых красителей, применяемых для идентификации породы. Излучение с $\lambda_{\text{макс}} = 740$ нм, обладая стимулирующим действием, находится вне полос поглощения всех типов красителей, применяемых для идентификации породы, и не оказывает деструктивного действия при их использовании.

Воздействие оптическим излучением осуществляется по ранее установленной программе с обеспечением необходимой длительности и интенсивности воздействующего излучения. Количество отдельных флекситюбов спермы, одновременно подвергающихся стимулирующему действию излучения, 1–25. Объем камеры, в которой поддерживается необходимая температура спермы, 35 л.

При этом предусмотрена возможность питания устройства как от сети переменного тока, так и от генератора (аккумуляторной батареи) автомобиля при его транспортировке вне помещения.

3. О роли эндогенных фотосенсибилизаторов в механизме регуляторного действия света на сперму хряков

При рассмотрении возможных механизмов регуляторного действия света на сперму животных мы исходим из того, что в его основе лежит изменение редокс-состояния спермиев, влияющего на их функциональную активность [3, 4]. Причиной светоиндуцированного изменения окислительно-восстановительного статуса половых клеток является увеличение уровня активных форм кислорода (АФК), и прежде всего, синглетного кислорода, за счет возбуждения эндогенных фотосенсибилизаторов. При этом основная масса эндогенных фотосенсибилизаторов, способных генерировать АФК, являются флуоресцирующими соединениями [3, 4]. Выполненные нами исследования показали, что, используя сперму хряка различной степени разбавления, удастся зарегистрировать ряд эндогенных флуорофоров, способных выполнять функцию фотосенсибилизатора. В качестве примера на рис. 2 показаны спектры флуоресценции спермы хряка, разбавленной физраствором в соотношении 1:25 при различных длинах волн возбуждения.

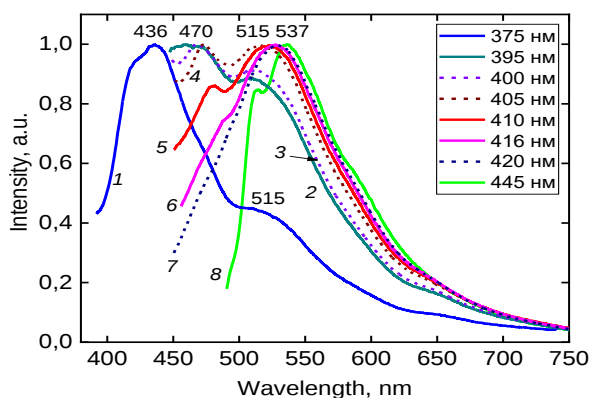


Рис. 2. Спектры флуоресценции спермы хряка, разбавленной физраствором в соотношении 1:25 при различных длинах волн возбуждения λ_{ex} :
1 – 375 нм; 2 – 395 нм; 3 – 400 нм; 4 – 405 нм; 5 – 410 нм; 6 – 416 нм; 7 – 420 нм; 8 – 445 нм

Из представленных данных следует, что при возбуждении флуоресценции излучением с $\lambda_{ex} = 375$ нм (кривая 1) спектр испускания характеризуется полосой с максимумом в области $\lambda_{max} = 436$ нм и выраженным плечом в области 515 нм. Не вызывает сомнения, что максимум при $\lambda_{max} = 436$ нм обусловлен вкладом во флуоресценцию кофермента никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (NADH) и его фосфорилированного производного – NADPH, а плечо в области 515 нм – флавиновой компонентой. По мере смещения длины волны возбуждения от $\lambda_{ex} = 375$ нм (кривая 1) к $\lambda_{ex} = 445$ нм (кривая 7) вклад флавиновой компоненты, представленной в сперме в основном молекулами FAD, при незначительном вкладе FMN, увеличивается. Характерно, что при возбуждении разбавленной спермы в области $\lambda_{ex} = 395$ нм (кривая 2) и 400 нм (кривая 3), на длинноволновом склоне полосы флуоресценции в области 650 нм регистрируется слабо выраженное плечо. Исследование неразбавленного эякулята, а также эякулята, обработанного HCl однозначно показало присутствие порфириновой компоненты (преимущественно копропорфирина) в сперме (рис. 3).

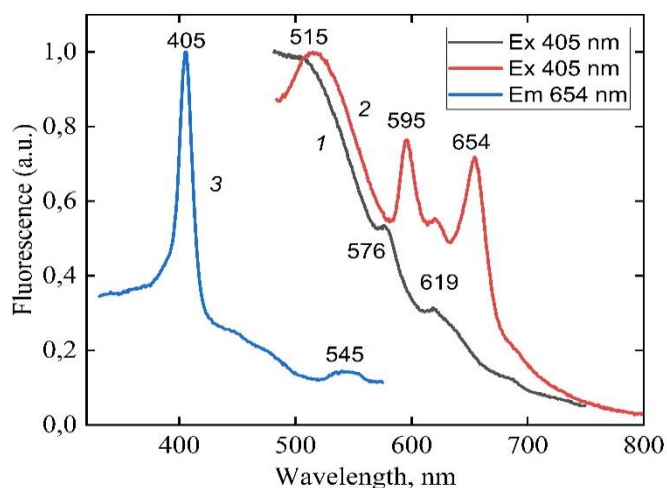


Рис. 3. Спектры флуоресценции (кривые 1, 2) и возбуждения флуоресценции (кривая 3) не обработанного эякулята (1) и эякулята, обработанного соляной кислотой (2, 3):
1, 2 – $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$; 3 – $\lambda_{\text{em}} = 654 \text{ nm}$

Способность эндогенных флуорофоров спермы сенсibilизировать образование активных форм кислорода подтверждена данными хемилюминесцентного анализа. Установлено значительное увеличение хемилюминесцентного сигнала при его контроле непосредственно после прекращения облучения образцов. Причем внесение перед облучением спермы тушителя синглетного кислорода (азид натрия) значительно снижает величину интегральной хемилюминесценции. Защитное действие перехватчиков перекиси водорода (пирувата натрия) и гидроксильных радикалов (*D*-маннитола) выражено в меньшей степени. Следовательно, синглетный кислород является основной формой АФК, инициирующей модуляцию функциональной активности сперматозоидов при воздействии излучения видимого диапазона спектра.

Заключение

Разработан фотостимулятор спермы хряков, встроенный в оборудование, используемое в технологиях искусственного оплодотворения. Показано, что регуляторное действие света обусловлено генерацией АФК в сперме за счет возбуждения эндогенных фотосенсибилизаторов порфириновой и флавиновой природы.

Библиографические ссылки

1. Red LED light acts on the mitochondrial electron chain of mammalian sperm via light-time exposure-dependent mechanisms / O. Blanco-Prieto [et al.] // *Cells*. 2020. Vol. 9, iss. 12. P. 2546
2. Specific LED-based red light photo-stimulation procedures improve overall sperm function and reproductive performance of boar ejaculates / M. Yeste [et al.] // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. P. 22569.
3. Comparative effect of low-intensity laser radiation in green and red spectral regions on functional characteristics of sturgeon sperm / V. Plavskii [et al.] // *Photochem Photobiol*. 2020. Vo. 96 iss. 6. P. 1294–1313.
4. Effect of continuous wave, quasi-continuous wave and pulsed laser radiation on functional characteristics of fish spermatozoa / V. Plavskii [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 2021. Vol. 216. P. 112112.
5. Red-light stimulation of boar semen prior to artificial insemination improves field fertility in farms: A worldwide survey / O. Blanco-Prieto [et al.] // *Reprod Domest Anim*. 2019 Vol. 54, iss. 8. P. 1145–1148