



COMPUTER PROGRAM BY DIFFERENTIATION OF MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATE DISORDERS OF THE COWS' MAMMARY GLAND IN DRY PERIOD

A.V. Onishenko, post-graduate student, Kharkiv State Zooveterinary Academy

The computer program by differentiation of morphological and functional state disorders of the cows' mammary gland in dry period was developed. The program is based on objective data by mammology clinical examination of cows, which includes clinical researching for organism and mammary gland, the udder secret study, ultrasonography and thermography characteristics. This program could be used as a reliable and objective method for diagnosing the cows' mammary gland pathologies in dry period.

Keywords: computer program, dry period, ultrasonography, thermography.

УДК 57.08:636.2.082.453.5

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИШОКОВЫХ СВОЙСТВ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ИЗ ЭКСТРАКТА СОИ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ БАРАНОВ

Павленко Б.М., к.с.-х.н.

Институт животноводства НААН

Приведены результаты поиска и изучения действия альтернативных фортификантов на мембранный аппарат спермиев и доказана возможность замены ими нативного желтка в составе криопротективной среды для спермы баранов.

Ключевые слова: сперма, температурный шок, фосфолипиды, липопротеиды, куриный желток, соя, клеточная мембрана, криоконсервация.

Криобиологическими, иммунологическими и биофизическими методами установлено, что в механизме температурного шока клеток главную роль отводят осмосу, а причиной деструкции клеточной мембраны является мгновенное перемещение через неё воды за счёт уравнивания осмотического давления, что лишает цитоплазматическую мембрану свойств полупроницаемости.

Было изучено механизм фортификации спермиев при охлаждении и установлено, что фортификант наслаивается на поверхности клетки и создаёт гидрофобную фазу, что затормаживает осмотическое действие, связанное с уравниванием концентрационных градиентов в системе «клетка-среда». Установлено, также, что защитный слой создаётся на цитоплазматической мембране на протяжении 2-5 минут с момента контакта её с антишоковым компонентом – фортификантом и потом прочно удерживается на ней даже при многократном отмывании клеток изотоническими средами.

Эти теоретические исследования были взяты за основу методики определения антишоковых свойств криорезистентности различных биологически-активных веществ и биохимических соединений при поиске, разработке и усовершенствовании сред для криоконсервации спермы различных видов животных.

При замораживании спермы в азоте, обязательным компонентом криопротективной среды является нативный желток куриных яиц, содержащий много фосфолипидов и липопротеидов, которые при взаимодействии с плазматическими



мембранами спермиев модифицируют их путём повышения устойчивости и стабильности [1, 3, 4, 7, 9]. Адсорбируясь липофильными и гидрофильными участками плазматических мембран липоидные комплексы почти в 2-3 раза утолщают оболочку клетки, что придаёт устойчивость спермиям к экстремальным температурным, осмотическим, иммунологическим, физико-химическим и механическим повреждениям [5, 6, 9, 12, 13].

В связи с этим желточные среды стали основой производственных технологий консервирования спермы животных. Однако, желток по своим негативным показателям относительно спермы (нестандартность, термолабильность, бактерионосительство, иммуноспецифичность и токсичность) не является идеальным компонентом криопротективных сред, что приводит к необходимости поиска его эффективных заменителей, в первую очередь из источников растительного происхождения. Ранее [2] из бобов сои был выделен фосфолипид – липозитол и доказано, что он защищает спермии от температурного шока при нулевых температурах, на одном уровне с лецитином куриного желтка. Однако, по данным исследований [12] использование растительного фосфолипида в форме спиртовой вытяжки при криоконсервации спермы не создаёт криозащитный эффект, сравнимый с применением нативного желтка, в связи с чем эти исследования не получили дальнейшего развития. В дальнейшем [2] этими же авторами было экспериментально доказано, что более эффективными для защиты спермиев от температурного шока являются не свободные фосфолипиды желтка, а их липопротеидные комплексы с содержанием до 50% белков. Исследуя этот вопрос [8] впервые было заморожено сперму быка в среде изготовленной на основе липопротеиновой вытяжки (РАФ-1) из семян сои, что открыло перспективу для создания дешёвых, термостабильных, экологически чистых и эффективных сред для спермы животных. В ходе дальнейших исследований была создана среда (РАФ-2) [10] в качестве полной замены стандартной лактозо-желточно-глицериновой №1 по Харьковской технологии для разбавления и криоконсервации спермы быков-производителей. Дальнейшие наши исследования были направлены на изучение антишоковых свойств растительного фортификанта (РАФ-2) применительно к сперме баранов-производителей.

Целью исследований являлось повышение санитарно-гигиенического уровня искусственного осеменения самок и защита маточного поголовья от распространения заболеваний, передающихся желтком куриных яиц через замороженную или охлажденную до 0 °С сперму производителей путём замены в составе криопротективных сред желтка компонентом растительного происхождения, выделенного из семян сои.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в научно-методическом племпредприятии ИТ НААН.

Объект исследований - нативная, замороженная и деконсервированная сперма баранов, опытные и контрольные криопротективные среды, желток куриных яиц, соевый гидролизат и другие компоненты сред, оборудование для замораживания спермы и искусственного осеменения.

Для исследований использовали сперму баранов, стандартную лактозо-желточно-глицериновую среду № 1 и бесжелточную лактозо-цитратно-глицериновую среду № 2, которые предназначены для криоконсервации спермы по Харьковской технологии.

В качестве сырья для получения антишокового компонента использовали семена сои.



При изготовлении экспериментальных сред семена сои высушивали до 1 % влажности, после чего перемалывали их до состояния муки. Муку растворяли бидистиллированной водой в соотношении 1:3. экстрактивную массу перемешивали на протяжении 1 часа при комнатной температуре на магнитной мешалке, а потом прогревали на водяной бане при температуре 65 °С. В течение 30 минут. После этого экстрактивную смесь центрифугировали при 7 тысячах оборотов на протяжении 20 минут. Осадок удаляли, а надосадочную жидкость использовали в опытах.

Осмотическое давление экстракта измеряли криоскопическим методом, концентрацию водородных ионов – криоскопическим методом по ГОСТ 20909.5-75.

Компенсацию осмотического давления проводили дополнительным внесением сахарозы в полученные экстракты, после чего их использовали в качестве основы для криопротективных сред.

Общим контролем являлась лактозо-желточно-глицериновая среда. Полученными образцами сред разбавляли исследуемые пробы спермы в соотношении 1:1, выдерживали их при комнатной температуре на протяжении 5 минут, после чего разбавляли сперму бесжелточной лактозо-цитратно-глицериновой средой №2 в соотношении 1:10 [7]. Обработанную таким образом сперму исследовали на резистентность к холодовому шоку [6] и способность к замораживанию в жидком азоте по Харьковской технологии. При этом изучали влияние замораживания на качественные показатели спермиев после оттаивания, выживаемость спермы при температуре 38 °С.

Результаты исследований. Установлено, что при экстрагировании антишокового компонента из сои бобовых во всех использованных образцах концентрация водородных ионов составляла 6,2-6,4 единицы и соответствовала уровню этого показателя желточной среды, которая являлась контролем.

При криоскопии экстрактов полученных по описанной методике установлено, что осмотическое давление в соевом экстракте составляло 8,2 единицы и было на уровне контрольной среды, что объясняется высоким содержанием в этих бобах осмотически-активных веществ.

На первом этапе исследований бы определён коэффициент резистентности к температурному шоку по общепринятой методике (ГОСТ 20909.4-75).

Таблица 1

Определение показателя криорезистентности к температурному шоку спермы разбавленной средой на основе растительного фортификанта (РАФ-2)

Среды для разбавления спермы	Показатель резистентности к температурному шоку (R)
Растительный фортификант (РАФ)	0,83
Контроль, желток	0,74
Контроль негативный	0,24

Исследованиями антишоковых свойств указанного фортификанта установлена его способность защищать спермии от температурного шока. В условиях мгновенного перепада температур в интервале от 28 °С до 0 °С. При этом коэффициент криорезистентности в опытной среде составлял R=0,83; в контроле- 0,74 и 0,24 – в негативном контроле. Эти данные свидетельствуют о высокой эффективности растительного фортификанта в качестве протектора к температурному шоку.



Аналогичная зависимость эффективности использования растительного фортификанта на основе экстракта сои отмечена так же и при глубоком замораживании спермы баранов в жидком азоте. После замораживания-оттаивания в контроле осталось 42 % полноценных спермиев, в экстракте сои – 41 %. Выживаемость при температуре 38 °С составляла: 6,0 часов, а показатель абсолютной выживаемости составлял 17,0 единиц.

Таблица 2

Биологические показатели качества спермы после замораживания-оттаивания с применением растительного фортификанта

Показатели качества спермы (а)	Среда лактозо-желточно-глицериновая среда (контроль)	Растительный фортификант (опыт)
Подвижность спермы после разбавления (а)	7,3 ± 0,02	7,3 ± 0,01
Подвижность спермы после замораживания - оттаивания	4,5 ± 0,002	4,7 ± 0,001
Выживаемость в часах (t)	7,7±0,4	9,3 ± 0.05***
Показатель абсолютной выживаемости (Sa)	21,2±1,2	23,8 ± 1,1***

Примітка. *** $p < 0,001$.

Анализ экспериментальных данных свидетельствует о том, что изученный растительный фортификант на основе экстракта сои способен защищать спермии баранов от температурного шока при гипотермии, как в зонах плюсовых температур, так и в зонах субнулевых температур. По данным полученных результатов установлено высокое защитное действие от криповреждений спермиев растительным фортификантом из экстракта сои, который может быть равноценным заменителем нативного желтка в криопротективных средах.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности использования антишоковых компонентов растительного происхождения при криоконсервации спермы баранов-производителей.

Выводы:

1. Установлено, что липопротеидная вытяжка из сои проявляет свойства защиты спермиев от температурного шока в условиях мгновенного падения температуры с 28 °С до 0 °С на одном уровне с нативным желтком.

2. Установлена прямая зависимость осмотического давления в экстрактах от температуры экспозиции и условий экстракции. Оптимальные параметры экстрагирования обеспечиваются при непрерывном смешивании экстрагированной смеси на протяжении 1 часа, экспозиции её при температуре 65 °С с последующим разделением смеси на фракции.

Экстракт сои, компенсированный по осмотическому давлению сахарозой в присутствии криопротектора глицерина (5%) обеспечивают высокую выживаемость спермиев при замораживании в жидком азоте. При этом выживаемость спермы составляла 20,0 единиц и достоверно не отличалась от использования для замораживания стандартной криопротективной среды с содержанием в ней 30% желтка.



3. Использование растительного фортификанта плазматических мембран вместо нативного желтка даёт возможность избежать загрязнения спермы и половых путей самки возбудителями инфекционных заболеваний, передающихся с желтком, применить простые и надёжные способы стерилизации, избежать использования дорогого диетического желтка, а также решить проблему централизованного изготовления криопротективных сред и поставки их племенным предприятиям.

Библіографічний список

1. Милованов В.К. Разбавители для спермы сельскохозяйственных животных /В. Милованов, О.Селиванова – Проблемы животноводства. 1932. №2. – С.75-86.

2. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. / Милованов В.К. – М. Монография. Изд. с.-х. литературы, журналов и плакатов.– 1962. – 696 с.

3. Осташко Ф.И. О природе холодового удара живчиков / Осташко Ф.И. – Х.: Ин.-т лесостепи и полесья УССР, 1963. – С.22-41. (Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных: Сб. научных трудов).

4. Осташко Ф.И. Способ консервирования спермы животных. / Ф.И. Осташко, М.П. Павленко, 1974 – А.С. №523693.

5. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Осташко Ф.И. – К.: Урожай, 1978. – 255 с.

6. Осташко Ф.И. Методика визначення антишокових властивостей захисних компонентів в розбавлювачах при дії низьких температур на спермії / Осташко Ф.І. Павленко М.П., Павленко Л.М. – Х.: Ін-т тваринництва УААН, 1992. – С. 138-142. (Нове в методах зоотехнічних досліджень).

7. Павленко М.П. Усовершенствование и разработка технологии криоконсервации спермы быков-производителей. / Павленко М.П. – Х.: Ин-т Лесостепи и полесья УССР, 1981. – Автореф. канд. диссертации.

8. Осташко Ф.И. Новый фортификант плазматических мембран и его влияние на биологические показатели спермиев быков при консервации / Осташко Ф.И., Павленко М.П., Павленко Л.Н. 1995 р. – С.188-189. – Х. І З'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини.

9. Павленко Л.М. Довгозбережне середовище для кріоконсервації сперми бугаїв та способи його виготовлення. / Павленко Л.М. – Х.: Ін-т тваринництва УААН –1999 – 19 с. (Автореф. канд. дис.).

10. Павленко Л.М. Изучение антишокового действия и санитарных свойств растительных модификаторов цитоплазматических мембран при консервировании спермы быков. / Павленко Л.М., Павленко М.П., Павленко Б.М. – Х.: Ін-т УААН – 2008. – С.315-323. (матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні методи репродукції сільськогосподарських тварин: Стан і перспективи розвитку»).

11. Семёнова В.А. Применение низкомолекулярного липопротеида желтка в средах для замораживания семени баранов / Семёнова В.А. –М.: Животноводство, 1987. – №3, – С. 51-52. (Агропромиздат).

12. Ostashko F.I. Antishock effect of yolk and components in cooling spermatozooids of bull, ram and boar / Ostashko F.I., Pavlenko M.P., Pavlenko L.N – 1984. – Illinois (USA). — V.1. – P.209-211. (10th International Congress on animal Reproduction and A.I.).



13. Phillips P.H. A yolk-buffered pabulum for the preservation of the bull semen / Phillips P.H., Lardy H.A – 1940. - Vol.23. - P.394-396. J. Dairy Sci..

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ СЕРЕДОВИЩА НА ОСНОВІ РОСЛИННИХ КОМПОНЕНТІВ ІЗ ЕКСТРАКТУ СОЇ ПРИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ БАРАНІВ

Павленко Б.М., Інститут тваринництва НААН

Наведені результати пошуку і вивчення дії альтернативних фортифікантів мембранного апарату спермій і доведена можливість заміни ними нативного жовтка в складі кріопротективного середовища для сперми.

Ключові слова: сперма, температурний шок, фосфоліпіди, ліпопротеїди, курячий жовток, соя, кліткова мембрана, кріоконсервація.

STUDY OF THE MEDIUM EFFECTIVENESS ON THE BASIS OF PLANT COMPONENTS MADEN FROM SOYBEAN EXTRACTS AT SHEEP SPERM CRYOPRESERVATION

B.M. Pavlenko, Institute of Animal Science, UAAS

The results by researching and studying the effects of alternative fortificants of sperm membrane apparatus are presented in the article and the possibility of replacing native yolk in the cryoprotective medium for sperm by them is proved.

Keywords: sperm, temperature shock, phospholipids, lipoproteins, chicken egg yolk, soybean, cell membrane, cryopreservation.