



УДК 57.08:636.2.082.453.5

## ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ СРЕД ДЛЯ РАЗБАВЛЕНИЯ СПЕРМЫ БЫКОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ АНТИШОКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ

Павленко Б.М., к.с.-х.н., Сушко А.Б., к.с.-х.н., Савельева М.С., научн.сотр.  
Институт животноводства НААН

Киндя В.И., к.с.-х.н.

Сумской национальной аграрный университет

*Приведены данные изучения защитного действия компонентов, полученных из семян сои и биомассы мицелиального гриба *Blakeslea trispora*. Доказана возможность успешного использования некоторых из них в составе среды для разбавления спермы, вместо куриного желтка.*

**Ключевые слова: сперма, семена сои, криопротективная среда, желток, фосфолипиды, липопротеиды, мицелиальная масса.**

Воспроизводство животных в молочном скотоводстве базируется на широком применении искусственного осеменения коров и тёлочек глубокозамороженной спермой. При глубоком замораживании спермы, обязательным компонентом криопротективной среды является нативный желток куриного яйца из-за обилия в нём фосфолипидов и липопротеидов, которые, взаимодействуя с плазматическими мембранами спермиев, усиливают их прочность и стабильность. [3,7,11]. Адсорбируясь липофильными и гидрофильными участками плазматических мембран, липоидные комплексы почти в три раза утолщают клеточную мембрану, что усиливает устойчивость спермиев к повреждающим температурным, осмотическим, физико-химическим и механическим факторам. [7-10,11]. Поэтому желточные разбавители стали основой производственных технологий консервирования спермы животных. Однако, вследствие ряда существенных недостатков, желток не является идеальным компонентом искусственных сред. Основным из них является его термолабильность, что лишает возможности надёжно стерилизовать желтоксодержащие среды общедоступными способами [13]. При этом доказано, что желток во многих случаях является носителем патогенной и условно-патогенной микрофлоры [1, 2]. Установлено проникновение через скорлупу таких возбудителей как пуллороза, тифа, чумы, аспергиллёза, микоплазмоза, сальмонеллёза и ряда вирусных инфекций [2]. Таким образом, не исключена возможность контаминации микрофлорой разбавителей спермы при изготовлении их ex tempore в условиях племенного предприятия [9]. Применение желтка в качестве компонента криопротекторных сред может вызывать микробную контаминацию спермы и распространения при проведении искусственного осеменения.

Учитывая вышеизложенное, существует необходимость альтернативной замены и исключения из состава искусственных сред куриного желтка, поиска защитных компонентов из альтернативных источников неживотного происхождения.

Ранее было выделено из бобов сои фосфолипид – липозитол и доказано, что он защищает половые клетки быка от температурного шока при нулевых температурах на одном уровне с лецитином куриного желтка [4]. В результате дальнейших ис-



следований и поэтапных разработок из семян сои была получена растительная липопротеидная вытяжка (РАФ-1) [12].

Также в наших исследованиях впервые испытан в качестве защитного компонента препарат мицелиальной массы гриба *Blakeslea trispora*. Биомасса *Blakeslea trispora* богата на белковые, липидные вещества, каротиноиды, водо- и жирорастворимые витамины, аминокислоты, макро- и микроэлементы [5]. Биомасса *Blakeslea trispora* богата на белковые, липидные вещества, каротиноиды, водо- и жирорастворимые витамины, аминокислоты, макро- и микроэлементы, она широко используется для производства кормовых добавок. Следует отметить, что одна из таких кормовых добавок, производная от *Blakeslea trispora*, производимая путем механодезагрегации биомассы гриба, «Витагон» испытывалась ранее путем введения в состав рационов быков-производителей, с положительным эффектом, относительно биологических характеристик спермы [5].

В биомассе гриба содержатся в значительном количестве фосфолипиды (2,5 %), что было принципиальным для наших исследований, потому что с этими соединениями в значительной степени связывают защитный эффект сред, применяемых при охлаждении и глубоком замораживании спермы сельскохозяйственных животных. В липидном составе биомассы *Blakeslea trispora* фосфолипиды составляют 9-12 %, и они являются вторыми по количеству после триглицеридов. При этом в составе биомассы гриба идентифицировано 11 фосфолипидных соединений [5], которые предположительно могут проявить защитный эффект.

Целью настоящей работы было установить эффективность разбавителей спермы быков, изготовленных с использованием альтернативных защитных компонентов, полученных из различного сырья неживотного происхождения,

**Материалы и методы исследований.** В экспериментах в качестве сырья для получения альтернативного антишокового компонента в одном случае использовали семена сои, в другом биомассу мицелиального гриба *Blakeslea trispora*.

В первом случае сою измельчали до консистенции муки, осуществляли её водно-глицериновую экстракцию с последующим удалением нерастворившихся веществ центрифугированием и выведением концентрации глицерина в среде до 7 % по методике [12].

В другом случае для исследования защитного действия препарата из мицелиальной биомассы гриба *Blakeslea trispora* в опытную среду была введена сухая вытяжка из его биомассы, полученные из кормового препарата „Витагон”. Экстракцию проводили с использованием в качестве экстрагента бидистиллированной воды при температуре 70 °С в течение 2 часов и мацерации в закрытой лабораторной посуде в течении 72 часов в термостате при температуре 38 °С. В последующем производили центрифугирование и удаление не растворившейся части, после чего высушивание в термостате с использованием открытых чашек Петри. Затем сухие экстракты из биомассы *Blakeslea trispora* вводили в среду, содержащую 11 % лактозы, 7 % глицерина в концентрации 1 %, 2 %, 3 %.

Осмотическое давление исследуемых разбавителей (гидролизат семян сои или раствор вытяжки) контролировали криоскопическим методом. Осмотическое давление среды на основе гидролизата сои составляло 360 мОсм. Осмотическое давление среды с экстрактами *Blakeslea trispora* находилось на уровне 310, 325, 350 мОсм, соответственно исследуемым концентрациям. Показатель концентрации водородных ионов (рН) после окончательного разбавления спермы был близок к 7,0. Стерилиза-



цию приготовленных сред производили термическим методом (70 °С в течение 1 часа).

Сперму быков разбавляли средами по двухмоментной методике: в начале в соотношении 1:1 первой средой с выдержкой их при комнатной температуре в течение 5 минут, после чего окончательное разбавление второй средой – лактозоцитратно-глицериновым разбавителем (среда №2) в соотношении 1:8 [8,15].

В опытных группах в качестве первой среды использовали лактозо-глицериновые среды, содержащие гидролизат сои или экстракты из биомассы гриба *Blakeslea trispora*. В контроле использовали аналогичную лактозо-глицериновую среду, но с добавлением 30 % желтка.

При этом, изучали устойчивость спермы к температурному или холодовому шоку на основании коэффициента резистентности (при резком перепаде температуры в положительном диапазоне), в соответствии с методикой (ГОСТ 20909.4-75), а также устойчивость спермы к действию низких температур при глубоком замораживании по общепринятым методам. Изучалась подвижность, выживаемость, показатель абсолютной выживаемости и криорезистентность спермы после замораживания-оттаивания при использовании в разбавителях экспериментальных защитных компонентов, сравнивая их с желтком.

**Результаты исследований.** В экспериментах при искусственной индукции температурного шока процент спермиев быка, которые сберегли подвижность и составлял 75 % для соевого гидролизата, и 42,4-52,6 % для сред с экстрактами из гриба *Blakeslea trispora*. В контроле при использовании желтка этот показатель находился на уровне 74,8 %, а в отрицательном контроле, где не были введены защитные компоненты – 24,6 %. Таким образом, среда на основе экстракта сои защищала спермии от температурного шока на уровне с желточной. Среды с вытяжками из гриба *Blakeslea trispora* необходимый уровень протективного действия не показали, хотя и обладали выраженным защитным эффектом (табл. 1).

Таблица 1

**Резистентность спермы быков к искусственной индукции температурного (холодового) шока в средах, содержащих экстракты сои и биомассы мицелиального гриба *Blakeslea trispora***

Среды	Процент спермиев, сохранивших подвижность (коэффициент резистентности к холодovому шоку)
Среда с водно-глицериновым экстрактом сои	75,0±1,50 (0,75)
Среды с сухими экстрактами из <i>Blakeslea trispora</i> , в концентрации, %	
1,0	42,4±2,45 (0,42)
2,0	50,6±2,65 (0,51)
3,0	50,6±2,65 (0,51)
Контроль, среда с желтком	74,8±1,49 (0,75)
Контроль негативный (без дополнительных защитных компонентов)	24,6 ±4,18 (0,25)



Биологические показатели спермы после замораживания-оттаивания при применении в защитных средах вытяжек из мицелиального гриба *Blakeslea trispora* были недостаточно высокими и уступали соответствующим показателям, полученным при использовании стандартного разбавителя, содержащего желток куриного яйца. Наиболее высокий результат по подвижности спермы был получен при 3 % концентрации сухого экстракта –  $3,5 \pm 0,5$  бала. Показатель выживаемости и абсолютный показатель выживаемости спермы при температуре  $38^\circ\text{C}$  в экспериментальных группах значительно (более чем в 2 раза) уступали контрольному показателю. Таким образом, защитный эффект экстрактов из *Blakeslea trispora*, оказался недостаточным для практического применения в разбавителях спермы быков, по крайней мере при имеющихся у нас технологических возможностях обработки вышеуказанного сыря.

Таблица 2

**Изучение биологических показателей спермы быков после замораживания в экспериментальных средах на основе гидролизата сои показало, что подвижность и выживаемость спермиев не уступали таковым при использовании желточных разбавителей (n=10)**

Среды для криоконсервирования спермы с использованием	Подвижность спермиев (а), баллы	Выживаемость, при $38^\circ\text{C}$ (t), часы	Показатель абсолютной выживаемости ( $S_a$ ), у. е.	Криорезистентность (CR),
Гидролизата сои	$5,0 \pm 0,011$	$8,9 \pm 0,8$	$23,9 \pm 1,8$	0,625
Желтка (контроль)	$4,8 \pm 0,015$	$7,7 \pm 0,4$	$21,2 \pm 1,2$	0,60
Достоверность (р) с контролем	<0,5	>0,5	<0,5	<0,5

Таблица 3

**Биологические показатели спермы быков после замораживания-оттаивания в средах, содержащих сухие экстракты из биомассы мицелиального гриба *Blakeslea trispora* (n=20)**

Среды для криоконсервирования спермы с использованием сухого экстракта из <i>Blakeslea trispora</i> в концентрации	Подвижность спермиев (а), балы	Выживаемость, при $38^\circ\text{C}$ (t), часов	Показатель абсолютной выживаемости ( $S_a$ ), усл.ед.	Криорезистентность (CR), %
1%	$2,3 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,9$	28,7
2%	$2,8 \pm 0,2$	$2,7 \pm 1,3$	$6,4 \pm 0,6$	35,0
3%	$3,5 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,6$	43,7
Контроль, желток	$4,3 \pm 0,3$	$7,3 \pm 1,4$	$22,2 \pm 1,9$	53,7

Примечание.  $P < 0,05$ .

В итоге, возможно, констатировать, что среды, полученные с применение альтернативных защитных компонентов, поддающихся стерилизации, могут быть весьма эффективными. При этом разбавители, полученные на основе экстрактов сои способны защищать половые клетки быков не хуже сред, изготовленных с использова-



нием желтка куриного яйца, исключая при этом возможность микробной контаминации спермы. Защитные среды, полученные с использованием сухих экстрактов из биомассы мицелиального гриба *Blakeslea trispora* не обеспечили защитный эффект на необходимом для практического применения уровне, но возможно являются перспективными при дальнейшем совершенствовании технологии выделения антишоковых компонентов и их применения.

### Библиографический список

1. Бреславец В.О. Вплив хімічної обробки у другу половину інкубації на мікробну контамінацію та виводимість яєць / Бреславец В.О., Шоміна Н.В., Ракова А.А. – Х. : Ветеринарна медицина. Міжвідомчий науковий збірник – 85. Том 1. – С.164 – 169.
2. Загаевский И. Источники обсеменения яиц микрофлорой и их дезинфекция / Загаевский И., 1969. – №6. – С.33 – 34. Птицеводство.
3. Милованов В.К., Разбавители для спермы сельскохозяйственных животных / Милованов В.К., Селиванова О.А.. 1932. – №2. – С.75–86. Проблемы животноводства.
4. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных / Милованов В.К. М.:. 1962. – 696 с.– Изд. с.–х. литературы, журналов и плакатов.
5. Киндя В.И. Перспективы использования микробных биомасс при различных уровнях их переработки / Киндя В.И. 2005. – Минск : Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества (Материалы Междунар. науч.– практ. конф.).
6. 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).
7. Осташко Ф.И. Способ консервирования спермы животных / Ф.И. Осташко, М.П. Павленко, 1974 – А.С. №523693.
8. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Осташко Ф.И. – К.: Урожай, 1978. – 255 с.
9. 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).
10. 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.
11. 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.
12. Павленко Л.М. Довгозбережне середовище для криоконсервації сперми бугаїв та способи його виготовлення. / Павленко Л.М. – Х.: Ін–т тваринництва УААН. – 1999. – 19 с. (Автореф. канд. дис).



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

14. 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. (10<sup>th</sup> International Congress on animal Reproduction and A.I.

15. 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..

*ПРОТЕКТИВНА ДІЯ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ РОЗБАВЛЕННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ, ВИГОТОВЛЕНИХ ЗІ ЗАСТОСУВАННЯМ АЛЬТЕРНАТИВНИХ АНТИШОКОВИХ КОМПОНЕНТІВ*

*Павленко Б.М., Сушко О.Б., Савельєва М.С., Інститут тваринництва НААН  
Кіндя В.І., Сумський національний аграрний університет*

*Наведено дані вивчення захисної дії компонентів, отриманих із насіння сої та біомаси міцеліальної гриба *Blakeslea trispora*. Доведено можливість успішного використання деяких із них у складі середовища для розбавлення сперми, натомість курячого жовтка.*

*Ключові слова: сперма, насіння сої, криопротективне середовище, жовток, фосфоліпіди, ліпопротеїди, міцеліальна маса.*

*PROTECTIVE EFFECT OF MEDIUMS FOR BULL SPERM DILUTION, PRODUCED USING THE ALTERNATIVE ANTISHOCK COMPONENTS*

*B.M. Pavlenko, O.B. Sushko, M.S. Savelieva, Institute of Animal Science, UAAS  
V.I. Kindya, Sumy National Agrarian University*

*The data from the study of protective effect of components, obtained from soybean seeds and biomass of *Blakeslea trispora* fungal are presented in the article. The opportunity of the successful using some of them for sperm dilution instead of chicken egg yolk is demonstrated.*

*Keywords: sperm, soybean seed, cryoprotective environment, yolk, phospholipids, lipoproteins, mycelial mass.*