



*The purebred Landrace sires of France selection, under full feeding conditions, had an advantage on the grounds of reproductive qualities, including the percentage of fertility and multiple pregnancy inseminated by these boars sows of other selection groups. The priority directions of Landrace pigs population selection at the LLC "Agro-service" Chuhuiv district breeding farm were defined.*

*Keywords: sperm production, genotype, sires, Landrace, Dyurok, selection, concentration, sperm activity, ejaculate volume, terminal sires.*

УДК 636.4.082.4:57.089.3

## **ЕФЕКТИВНІСТЬ МЕТОДУ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ БУГАЇВ ПРЯМИМ ЗАНУРЕННЯМ ДВОСТІННО-СІТЧАСТИХ КАСЕТ ЗІ СПЕРМОДОЗАМИ У ЗРІДЖЕНИЙ АЗОТ**

**Сушко О. Б., к. с.-г. н.**

Інститут тваринництва НААН

*Проведено дослідження щодо експериментального обґрунтування подальшого вдосконалення методів глибокого заморожування бугаїв шляхом прямого занурення касет зі спермодозами в зріджений азот.*

*Випробувано метод кріоконсервації статевих клітин із використанням нових контейнерів – двостінно-сітчастих касет, застосування яких сприяє нівелюванню біологічної різноякісності спермодоз та усуненню певних негативних факторів локальної дії, які мають місце при використанні традиційної процедури та обладнання. Створено новий шестисекційний заморожувач ЗСК-36/6 для можливості використання розроблених касет із можливістю регулювання й обмеження витрат зрідженого азоту.*

**Ключові слова: кріоконсервація, спермодоза, бугаї, кріорезистентність.**

В останні роки дослідження з репродукції тварин, особливо видів, що мають визначальні господарсько-корисні ознаки для забезпечення населення продуктами харчування, значно інтенсифікувалися [1-11]. Це стосується як фундаментальних, так і прикладних досліджень із біотехнології репродукції тварин. При цьому основний упор робиться на створення ресурсозберігаючих технологій при зберіганні генетичних матеріалів, розробку методів підвищення біологічної та санітарної якості гамет, активізацію і підтримання в нормі репродуктивної функції тварин в умовах їх інтенсивної експлуатації.

У розвинутих західних країнах здійснюються тривалі дослідно-конструкторські роботи щодо вдосконалення конструкцій кріогенного обладнання сільськогосподарського призначення. Зокрема, такі роботи проводять провідні науково-виробничі компанії з виробництва технологічного, кріогенного обладнання посудин Дьюара „Cryo Diffusion”, IM-technologies (Франція), Minitube (Німеччина) [12].

В Україні також накопичено значний професійний досвід створення кріогенного обладнання, яке використовується у сфері відтворення тварин. Науковими розробками в даному напрямку традиційно займалися у Харкові – широко відомі роботи академіка, доктора біологічних наук, професора Осташка Ф. І., професора, доктора біологічних наук Бугрова О. Д. (Інститут тваринництва НААН), доктора технічних наук Жунь Г. Г. (НТУ „Харківський політехнічний інститут”). Як правило, співпраця вчених із досвідченими конструкторами (Капрелянц Н. Т.,



Зубенко А. І., Остащенко В. С. та іншими ) давала змогу більшості розробок доводити до серійного виробництва [13, 14, 15].

Розвитку даного напрямку науково-виробничої діяльності на окремих етапах сприяли вчасно прийняті рішення загальнодержавного рівня. Так, у 2004 - 2005 роках завдяки вірно обраним Укрплемоб'єднанням (Білозерський О. Л.) пріоритетам щодо використання бюджетних коштів, вітчизняним заводам вдалося отримати конче необхідне державне замовлення на виготовлення посудин Д'юара для криозберігання сперми та інших біологічних матеріалів. Харківський завод транспортного устаткування та Коростенський завод хімічного машинобудівництва в рамках даного замовлення виготовили для тваринницької галузі 5000 модернізованих посудин сімейства „Харків” та СДС-біо.

Таким чином, сільськогосподарські підприємства отримали необхідну кількість нового обладнання, чим в Україні проблема переоснащення пунктів штучного осіменіння та лабораторій відтворення тварин була в значному ступені вирішена.

В останні роки посудний парк було суттєво оновлено та впроваджено у виробництво. Ми сумісно розробили (Інститут тваринництва НААН і ДП „Харківський завод транспортного устаткування”) криогенну посудину „Харків-40 СКП”, яка має змінну робочу конфігурацію та може використовуватись як стаціонарно-портативне біосховище [15, 16].

Подальший розвиток наших наукових досліджень, дослідно-конструкторських робіт був направлений на модернізацію способу криоконсервування сперми тварин і створення у творчій співдружності з фахівцями вищеназваного ДП „Харківський завод транспортного устаткування” (Зубенко А. І., Немашкало О. А.) відповідного обладнання для його реалізації.

Так, проведено дослідження з експериментального обґрунтування подальшого вдосконалення методів криоконсервування статевих клітин бугаїв шляхом прямого занурення касет зі спермодозами в зріджений азот. Даний метод використовується в системі Харківської технології асептичного взяття, криоконсервації та використання сперми бугаїв у формі облицьованих гранул. Потенційно метод може бути універсальним і застосовуватись для інших технологічних форм спермодоз, тих же пайет різного об'єму. Метод, що розробляється, є альтернативною системою заморожування в парах зрідженого азоту. На відміну від останнього заморожування шляхом прямого занурення касет у зріджений азот є високотехнологічним і забезпечує стабільність температурного режиму охолодження сперми. Це пояснюється відсутністю розбігу температур в азоті у рідкому стані, на відміну від парів, де температура може суттєво різнитись. Зокрема, при використанні певних класичних методів існує значний градієнт температур у парах у залежності від висоти над рівнем дзеркала зрідженого азоту. Тому, при використанні промислового обладнання, в якому для охолодження спермодоз застосовується парообразний азот, застосовується режим постійної конвенції парів, що вимагає додаткового використання конвекторів, здатних експлуатуватись у холодних умовах. Криоконсервування ж сперми прямим внесенням контейнерів у зріджений азот дозволяє уникнути цілого ряду технологічних складнощів.

**Матеріали та методи досліджень.** У роботі використовували біотехнологічні, кріобіологічні, фізіологічні методи та методи дослідно-конструкторського моделювання.

У експериментах використовувалась сперма бугаїв-плідників чорно-рябої, красно-рябої голштинських та симентальської порід, яку отримували на штучну вагіну після садки на механічний станок (фантом).



При мікроскопічній оцінці якості спермопродукції плідників застосовувались діючі норми з використанням традиційних методик, зокрема передбачених згідно з ДСТУ 3535-97 (Сперма бугаїв нативна. Технічні умови). Оцінка якості замороженої сперми бугаїв проводилась з урахуванням показників, передбачених ГОСТ 26030-83 (Сперма быков замороженная. Технические условия) (Сперма бугаїв заморожена. Технічні умови), з прийняттям 10 % спермій із прямолінійно-поступовим рухом за 1 бал рухливості. Вживаність деконсервованої сперми проводилась шляхом інкубації при температурі 38 °С до досягнення рухливості 0,5 бали показник абсолютної вживаності, як комплексна характеристика, визначався за формулою:

$$S_a = a_0 + \sum a_i \cdot t_i,$$

де  $S_a$  – показник абсолютної вживаності сперми, умов. од.;  
 $a_0$  – рухливість сперми після розморожування, бал;  
 $a_i$  – рухливість сперми на момент чергового визначення, бал;  
 $t_i$  – проміжок часу між визначенням рухливості, год.

Показник кріорезистентності визначався за формулою:

$$CR = a_0/a_s \cdot 100 \%,$$

де  $CR$  - показник кріорезистентності, %  
 $a_0$  - рухливість сперми після розморожування, балів;  
 $a_s$  - рухливість свіжеотриманої сперми, балів

Для визначення ступеня ушкодження мембранного апарату спермій після заморожування застосовувалося подвійне фарбування вітальними фарбниками SYBR-14 і пропідіум йодід (PI) за методикою Weaver J. L. [12]. Використовувався проточний цитометр DAKO Galaxy при довжині хвилі 488 нм для збудження флуоресценції клітин. При цьому, за ступенем ушкодження мембран, спермії відповідно до методики розділялися на три умовні категорії: «живі», тобто з неушкодженими мембранами; «ушкоджені», тобто спермії з частково порушеним мембранним апаратом і «мертві», тобто спермії з сильно ушкодженими, зруйнованими мембранами. Загальна кількість оцінюваних клітин становила 25 тисяч за один аналіз.

Дослідно-конструкторська робота велась із використанням традиційних етапів – технічне завдання, ескіз конструкції, загальне креслення конструкції, робочі креслення кожної деталі, моделювання та виготовлення дослідно-промислового зразку.

Біометрична обробка результатів здійснювалася за загальноприйнятими методиками [13] з використанням програми Excel. При цьому достовірність різниці для показників рухливості та вживаності розраховувалася за методикою оцінки генеральної середньої, а для показників цитометричних досліджень – за методикою оцінки генеральних часток (з урахуванням того, що цитометр оцінює кожену клітину персонально і відносить до однієї з категорій).

**Результати досліджень.** На першому етапі проведені експерименти з вивчення біологічної якості сперми бугаїв у залежності від сектору розташування спермодоз у стандартному контейнері – пласка сталева касета (200мм x 70мм x 10 мм) – для Харківської технології асептичного отримання, кріоконсервації та використання сперми бугаїв (табл. 1).



Таблиця 1

**Вивчення біологічної якості сперми бугаїв у залежності від сектору розташування спермодоз**

Показник якості деконсервованих спермій бугая	Базова (стандартна) касета			
	Часткове завантаження	Повне завантаження		
		Низ (n=10)	Низ (n=19)	Середина (n=16)
Рухливість, бали	1,7±0,2	3,2±0,1	4,2±0,1	3,7±0,1
Виживаність, години	2,7±0,2	6,4±0,1	5,6±0,1	5,3±0,1
Показник абсолютної виживаності, ум.одн.	5,6±0,5	14,2±0,6	15,8±0,5	12,4±0,5
Показник кріорезистентності, %	21,3	40,0	52,5	46,3

Було показано, що такі основні фізіологічні показники як рухливість та виживаність сперми в зразках, розташованих при заморожуванні в придонній частині касети, також значно нижчі у порівнянні зі спермодозами, які охолоджувались в середній та верхній частині касети, при кріоконсервуванні методом прямого занурення касет зі спермодозами у зріджений азот. Проведені випробування свідчили, що при заморожуванні сперми в облицьованих гранулах об'ємом 0,25 мл, на дні стандартної касети (контроль) рухливість, виживаність та показник абсолютної виживаності сперми становили 1,7±0,2 балів; 2,7±0,2 години та 5,6±0,5 ум.одн. (n=10), тобто були нижче норми.

У співпраці з Інститутом зоотехніки (Польща, м. Краків) за допомогою фахівців лабораторії біотехнології відтворення (З. Смронг, М. Бохенек) проведені експерименти з застосуванням проточної цитометрії щодо визначення ступеня ушкодження мембран статевих клітин бугаїв у залежності від сектору розташування спермодоз у базовій пласкій металевій касеті.

Визначення відповідних характеристик цитометричних досліджень спермій показав, що на нижньому рівні стандартної металеві касети кількість клітин зі зруйнованим мембранним апаратом (тобто віднесених до категорії „мертві” [dead] більша ніж в середньому у верхньому рівні касети.

Процент спермій цієї категорії коливався в межах 57,56-77,71 % на нижньому рівні, тоді як на середньому рівні цей показник становив 42,86-46,34 %, верхньому – 35,85-42,29 %. Слід відмітити, що в додатковому експерименті, де застосовувався тільки один зразок сперми, розташований на нижньому рівні – дні причому практично пустої касети, процент ушкоджених статевих клітин був ще вищим – 92,57- 99,57 %. Звісно, що в реальних умовах один зразок у касеті на дні може бути лише теоретично, але цей експеримент підтверджує, що в придонному секторі в силу певних факторів відбувається значне збільшення кількості клітин з ушкодженими мембранами.



Таблиця 2

**Ступінь ушкодження мембран спермійів бугаїв при заморожуванні шляхом прямого занурення стандартної металевій касети для Харківської технології в зріджений азот за даними проточної цитометрії**

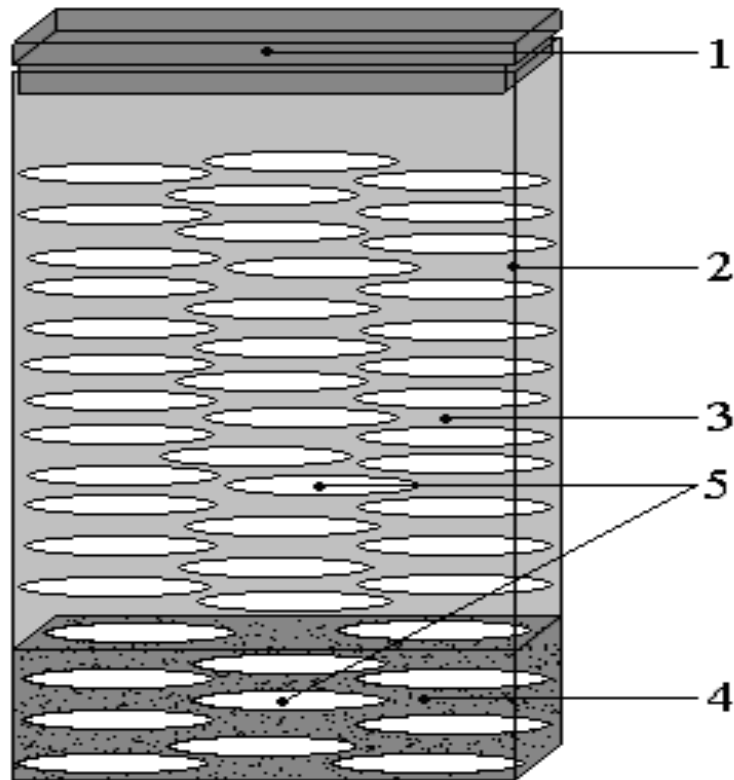
Висота розміщення (від дна) зразка сперми в стандартній металевій касеті для Харківської технології	Ступінь ушкодження мембран спермійів		
	Живі [live], %	Ушкоджені [hurt or moribund], %	Мертві [dead], %
<i>Експеримент 1</i> <i>n=25 тис. клітин</i>			
H=0cm (full)	34,80±0,30 <sup>a</sup>	7,64±0,17 <sup>a</sup>	57,56±0,31 <sup>a</sup>
H=8cm(full)	46,19±0,32 <sup>b</sup>	10,95±0,20 <sup>b</sup>	42,86±0,31 <sup>b</sup>
H=16 cm(full)	46,18±0,32 <sup>b</sup>	11,53±0,20 <sup>b</sup>	42,29±0,31 <sup>b</sup>
H=0cm (empty)	0,14±0,02 <sup>c</sup>	0,29±0,03 <sup>c</sup>	99,57±0,04 <sup>c</sup>
<i>Експеримент 2</i> <i>n=25 тис. клітин</i>			
H=0cm (full)	26,14±0,28 <sup>a</sup>	12,31±0,21 <sup>a</sup>	61,55±0,31 <sup>a</sup>
H=8cm(full)	41,39±0,31 <sup>b</sup>	13,44±0,22 <sup>a</sup>	45,17±0,31 <sup>b</sup>
H=16 cm(full)	39,43±0,30 <sup>c</sup>	24,92±0,27 <sup>b</sup>	35,65±0,30 <sup>c</sup>
H=0cm (empty)	3,88±0,12 <sup>d</sup>	3,77±0,12 <sup>c</sup>	92,35±0,17 <sup>d</sup>
<i>Експеримент 3</i> <i>n=25 тис. клітин</i>			
H=0cm (full)	10,62±0,19 <sup>a</sup>	11,67±0,20 <sup>a</sup>	77,71±0,26 <sup>a</sup>
H=8cm(full)	27,41±0,28 <sup>b</sup>	26,25±0,28 <sup>b</sup>	46,34±0,32 <sup>b</sup>
H=16 cm(full)	31,18±0,29 <sup>c</sup>	32,96±0,30 <sup>c</sup>	35,85±0,30 <sup>c</sup>
H=0cm (empty)	0,43±0,04 <sup>d</sup>	0,85±0,06 <sup>d</sup>	98,72±0,07 <sup>d</sup>
<i>У середньому по 3 експериментам</i>			
H=0cm (full)	23,85±0,16 <sup>a</sup>	10,54±0,11 <sup>a</sup>	65,61±0,17 <sup>a</sup>
H=8cm(full)	38,33±0,18 <sup>b</sup>	16,88±0,14 <sup>b</sup>	44,79±0,18 <sup>b</sup>
H=16 cm(full)	38,93±0,18 <sup>b</sup>	23,14±0,15 <sup>c</sup>	37,93±0,18 <sup>c</sup>
H=0cm (empty)	1,48±0,04 <sup>c</sup>	1,64±0,05 <sup>d</sup>	96,88±0,06 <sup>d</sup>

*Примітки:*

1. Full – повністю заповнена спермодозами касета; empty – один зразок сперми на дні пустої касети.

2. Різними суперскриптами <sup>a, b, c, d</sup> позначено величини, що достовірно відрізняються при  $p < 0,01$  у межах одного стовпця.

Пояснення цьому було знайдено і суть його полягає у наступному. Металеві касети, виготовлені з нержавіючої сталі, яка має досить високу теплопровідність (47 Вт/мК). У порожнині касет, крім спермодоз, знаходиться також повітря, яке при зануренні касети в рідкий азот зріджується в силу того, що температура переходу повітря з газоподібного стану у зріджений вища, ніж у азоту. Під дією сили тяжіння зріджене повітря по стінкам стікає на дно касети, утворюючи в нижній частині шар, в який потрапляє частина спермодоз (рис. 1).



**Рис. 1. Шар зрідженого повітря, який утворюється в металевій касеті при заморожуванні спермодоз:**

1 – кришка касети; 2 – металева стінка касети; 3 – повітря в газообразному стані; 4 – повітря в зрідженому стані; 5 – спермодози.

Висота цього шару залежить від ступеня наповненості касет спермодозами: чим менше спермодоз тим більша висота шару.

Спермодози, які знаходяться на дні касети у шарі зрідженого повітря, піддаються впливу швидкостей охолодження набагато більшим за оптимальні. Так за нашою оцінкою швидкість охолодження для облицьованих гранул об'ємом 0,25 мл становила – 29-33 °C/хв (у діапазоні 0 °C до мінус 10 °C) та 125-222 °C/хв (у діапазоні від мінус 10 °C до мінус 80 °C). Для пайетованої сперми з об'ємом 0,25 мл швидкості охолодження в діапазонах температур від 0 °C до мінус 10 °C та від мінус 10 °C до мінус 80 °C дорівнюють 25-33 °C/хв та 400-444 °C/хв, відповідно до вищенаведених температурних діапазонів. Крім того, ті спермодози, які контактують зі стінками металеві касети, охолоджуються з більшою швидкістю, ніж ті, які розташовані вздовж центральної осі касети і не мають щільного контакту зі стінкою касети. Це може спричинити високий градієнт температур і виступати як фактор індукції різноякісності деконсервованого матеріалу.

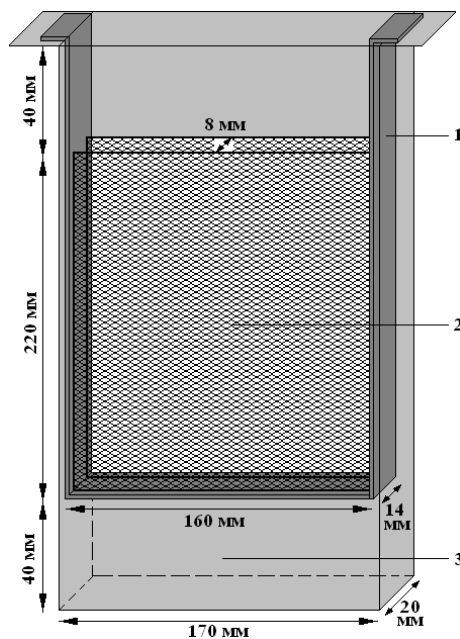


Таблиця 3

**Кількість зрідженого повітря у стандартній металевій касеті при її зануренні в зріджений азот**

Параметри касетри	Відкрита пуста касетра				Касетра пуста з пробкою				Касетра, заповнена наполовину спермодозами				Касетра, повністю заповнена спермодозами			
	1	3	5	10	1	3	5	10	1	3	5	10	1	3	5	10
Час знаходження касетри у зрідженому азоті, хв	1	3	5	10	1	3	5	10	1	3	5	10	1	3	5	10
Об'єм зрідженого повітря, мл	4	20	29	45	3	12	20	38	2	7	12	30	1	3	6	18
Висота шару зрідженого повітря у касетрі, мм	5	25	35	55	3	15	25	45	2	8	15	35	1	3	7	20

Для нівелювання вищезгаданих чинників, що згубно впливають на якість статевих клітин, було проведено дослідно-конструкторську роботу та створено модельний металевий контейнер із двома стінками, при чому внутрішня стінка виконана сітчастою (рис. 2).

**Рис. 2. Металева двостінно-сітчаста касета:**

- 1 – внутрішній сітчастий контейнер, в якому розташовуються облицьовані гранули чи пайети;
- 2 – сітчаста стінка з нержавіючої сталі;
- 3 – зовнішній контейнер із листової нержавіючої сталі.

Внутрішня сітчаста частина встановлена, таким чином, що спермодози будуть знаходитись над шаром зрідженого повітря не контактуючи з ним. Це також унеможливує контакт спермодоз із зовнішніми стінками касети. Контейнер отримав назву двостінно-сітчаста касета.



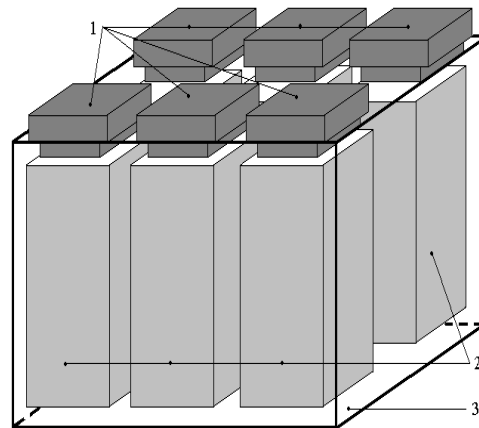
Крім того, геометричні характеристики нової касети такі, що в ній можливо розташовувати пайети об'ємом 0,25 або 0,5 мл. Пайети при цьому будуть щільно укладатися в порожнині касети в горизонтальному положенні під дією сили тяжіння.

При цьому, як подальший розвиток ідеї, було створено модель багатосекційної кріоємності для зрідженого азоту замість широкогорлої посудини Д'юара, яка застосовується при використанні стандартних касет із радіальним розташуванням останніх. Недоліком стандартної технології є великий розхід зрідженого азоту незалежно від кількості біоматеріалу, що кріоконсервується. Так широкогорла посудина модифікації Харків-30, що традиційно використовується, передбачає заправку близько 26-28 літрів зрідженого азоту.

Як альтернативний варіант, було запропоновано та виготовлено металевий 6-ти-секційний кріостат, із оснащенням кожного кріовідсоку 6 касетами з паралельним розташуванням (рис. 3, 4). При застосуванні 6 двостінно-сітчастих касет в один кріовідсік заливається 3,25-4,0 л. зрідженого азоту. Так як кількість, задіяних у роботі секцій, може варіювати від 1 до 6 пропорційно кількості спермодоз, що кріоконсервуються, то витрати зрідженого азоту можна регулювати, використовуючи від 3,25-24 л кріоагенту при заморожуванні відповідно від 6 до 36 серій спермодоз одночасно (в одній касеті – одна серія спермодоз, виготовлених із одного еякуляту).



а)



б)

**Рис. 3. Дослідно-промисловий зразок обладнання для заморожування сперми плідників «ЗСК 36/6»:**

а) загальний вид, б) схематичне зображення (1 – кришки, 2 – відсіки зі зрідженим азотом для розташування касет (кріовідсіки), 3 – термоізолюючий матеріал).

Розробленому обладнанню для реалізації запропонованої модифікації методу заморожування сперми бугая, шляхом прямого занурення металевих контейнерів зі спермодозами у зріджений азот, присвоєно робочу назву «ЗСК 36/6».

У результаті проведених випробувань, встановлено біологічні характеристики сперми бугая при заморожуванні з використанням запропонованого методу і створеного обладнання в порівнянні з базовим методом і стандартними пристроями для Харківської технології кріоконсервування спермодоз бугаїв-плідників (табл. 4).





Таблиця 4

**Показники якості деконсервованих спермійв бугая при заморожуванні за допомогою дослідно-промислового зразку пристрою «ЗСК 36/6» та базового пристрою для Харківської технології (n=10)**

Показник якості деконсервованих спермійв бугая	Експериментальний метод із застосуванням двостінно-сітчастої касети і обладнання «ЗСК 36/6» (дослід)				Базовий метод із застосуванням стандартних касет (контроль)			
	Часткове завантаження	Повне завантаження			Часткове завантаження	Повне завантаження		
		низ	низ	середина		верх	низ	низ
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Рухливість, бали	4,1 ±0,2	4,3 ±0,3	4,4 ±0,2	4,3 ±0,5	2,4 ±0,4	4,2 ±0,3	4,2 ±0,2	4,3 ±0,4
Вживаність, години	7,2 ±0,4	7,3 ±0,2	7,1 ±0,3	7,3 ±0,4	2,8 ±0,2	7,4 ±0,1	7,2 ±0,1	7,3 ±0,1
Показник абсолютної виживаності, ум. одн.	21,4 ±0,7	21,6 ±0,5	22,1 ±0,4	22,3 ±0,6	5,8 ±0,6	22,1 ±0,8	21,3 ±0,6	22,4 ±0,8
Показник кріорезистентності, %	51,2	53,7	55,0	53,7	30,0	52,5	52,5	53,7

Із отриманих даних видно (табл. 4), що при частковому завантаженні контейнерів показник рухливості деконсервованих спермійв бугая у дослідній групі, де застосовувався метод із використанням двостінно-сітчастої касети, становив у „придонному” секторі  $4,1 \pm 0,2$  бали і був достовірно ( $P < 0,95$ ) вищий, ніж у контролі, де рухливість становила  $2,4 \pm 0,4$  бали. У відсотковому відношенні різниця між дослідом і контролем у проблемній зоні контейнера за рухливістю суттєво вище на 41,5 %. Відповідно виживаність сперми у дозах, що при заморожуванні опинились на дні контейнера, була незадовільною і становила лише 2,8 години, в той час як у досліді спермодози мали нормальну виживаність 7,2 години.

При цьому біологічна різноякісність у двостінно-сітчастій касеті мінімальна: зокрема за показником рухливості спостерігаються коливання на рівні 4,1-4,3 бали, за показником виживаності 7,1-7,3 години, за комплексною характеристикою - показником абсолютної виживаності – 21,4-22,3 ум.од. У той же час, в контролі коливання значно більші за рахунок знаходження певної кількості спермодоз у неоптимальних умовах кріоконсервування. Зокрема, при неповному завантаженні касети спермодози на дні касети мали рухливість на 1,8-1,9 бали нижче. За показником кріорезистентності ця різниця становила 21,2 % на користь експериментального методу.

Також слід зазначити, що при повному завантаженні контрольних та дослідних контейнерів зі спермою показники рухливості деконсервованого матеріалу



достовірно не відрізняються між собою в залежності від місця розташування в касеті і відповідали прийнятим нормам, що очевидно пояснюється мінімумом зрідженого повітря, яке утворилося в касеті при заморожуванні. Проте застосування касет із неповним завантаженням є достатньо частим явищем, зокрема як при обробці порівняно малих еякулятів, із кількістю вироблених спермодоз менше 100 шт., так і порівняно великих еякулятів (одна або кілька повних касет плюс одна з неповним завантаженням).

Безумовно, що процент спермодоз, які мають погіршені показники біологічної якості, достатньо невисокий і не перевищує 5-6 %, але при застосуванні методу вибіркової перевірки це може стати вирішальним для всієї серії спермодоз і стати причиною її вибраковки.

#### **Висновки:**

1 При заморожуванні сперми бугаїв методом прямого занурення стандартних металевих касет зі спермодозами в зріджений азот спостерігається певна різноякісність сперми, зокрема за ступенем ушкодження мембран статевих клітин та основними фізіологічними показниками; найбільший рівень ушкоджених клітин спостерігається в нижній придонній частині касет.

2. Певна різноякісність та зниження рівня біологічної якості сперміїв спостерігається в спермодозах у нижній придонній частині касет у силу ефекту зрідження повітря та його стікання на дно касет під впливом сили тяжіння, внаслідок чого частина спермодоз опиняється в зоні дії швидкостей охолодження, значно більших за оптимальні.

3. Застосування методу прямого занурення двостінно-сітчастих касет зі спермодозами у зріджений азот може вирішити проблему різноякісності біоматеріалу, нівелюючи негативний ефект зрідженого повітря на дні касети.

4. Біологічна якість спермодоз, що знаходяться у нижній частині двостінно-сітчастих касет, знаходиться на рівні 4,1 бала за рухливістю, 7,2 години за виживаністю, 21,4 умов. од. за показником абсолютної виживаності, що відповідає фізіологічній нормі і діючим стандартам.

#### **Бібліографічний список**

1. Осташко Ф. И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Осташко Ф. И. // К.: Аграрна Наука. – 1995. – 184 с.
2. Бугров А. Д. Криповреждения и криозащита спермиев быков при глубоком замораживании / Бугров А. Д. // Х., 2010. – 320 с.
- 3 Белоус А. М. Криобиология / Белоус А. М., Грищенко В. И. // К.: Наукова думка. - 1994. – 424 с.
4. Курбатов А. Д. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных / Курбатов А. Д., Платов Е. М., Корбан Н. В. // Л.: Агропромиздат. – 1988. – 256 с.
5. Милованов В. К. Биология воспроизводства и искусственное осеменение животных / Милованов В. К. // М.: Сельхозиздат. – 1962. – 696 с.
6. Наук В. А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / Наук В. А. // Кишинев: Штиинца. – 1991. – 199 с.
7. Basic aspects of frozen storage of semen / Holt W.V. // Anim. Reprod. Sci. – 2000. – Vol. 62. – P. 3–22.
8. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa / Leibo S.P., Bradley L. // The Male gamete: from basic science to clinical applications. – Cache River Press. – 1999. – P. 502–516.



9. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing / Watson P.F. // *Reprod. Fertil. Dev.* – 1995. – Vol. 7. – P. 871–891.

10. Грищенко В. И. Новые подходы к проблеме низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток животных и человека / Грищенко В. И., Лучко Н. А. // *Проблемы криобиологии.* – 1997. – № 1–2. – С. 61–67.

11. Сушко О. Б. Ефективність застосування буферних середовищ, кріопротекторів і режимів заморожування сперми жеребців / Сушко О. Б., Сморгонь З., Бохенек М., Компанієць А. М., Міщенко А. Г. // *Вісник аграрної науки.* – 2009. – №9. – С. 35–39.

12. Catalogue cryodiffusion, 2006// [www.cryodiffusion.com](http://www.cryodiffusion.com).

13. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Осташко Ф. И. // *К.: Урожай.* – 1978. – 225 с.

14. Жунь Г. Г. Науково-технічні засади створення вискоелективних промислових кріопосудин і енергозберігаючих пристроїв і технологій на їх основі / Жунь Г. Г. // Автореферат на здобуття вченого ступеня доктора технічних наук. – Одеса, 2010. – 35 с.

15. Сушко О. Б. На допомогу спеціалістам із відтворення сільськогосподарських тварин / Сушко О. Б., Міщенко А. Г., Алейніков В. П., Зубенко А. І. // *Тваринництво України.* – К., 2011. – №5. – С.5-8.

16. Патент України на корисну модель № 51943. МПК (2009) А61J 1/00. Посудина кріобіологічна для зберігання репродуктивних клітин у зрідженому азоті / О. Б. Сушко, А. І. Зубенко, Ф. І. Осташко, Б. Я. Литвин, М. М. Байцур, А. Г. Міщенко. – № u 2010 00625; Заявл. 22.01.2010; Опубл. 10.08.2010, Бюл. № 15. – 4 с.

### *ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ БЫКОВ ПРЯМЫМ ПОГРУЖЕНИЕМ ДВОСТЕННО-СЕТЧАТЫХ КАССЕТ С СПЕРМОДОЗАМИ В ЖИДКИЙ АЗОТ*

*Сушко А. Б., Институт животноводства НААН*

*Проведены исследования по экспериментальному обоснованию дальнейшего совершенствования методов глубокого замораживания спермы быков путем прямого погружения кассет с спермодозой в жидкий азот.*

*Протестированный метод криоконсервации половых клеток с использованием новых контейнеров - двостенно-сетчатых кассет, применение которых способствует нивелированию биологической разнокачественности спермодоз и устранению определенных негативных факторов локального действия, которые имеют место при использовании традиционной процедуры и оборудования.*

*Был создан новый шестисекционный замораживатель для возможности использования разработанных кассет с возможностью регулирования и ограничения расхода жидкого азота.*

*Ключевые слова: криоконсервация, спермодоза, быки, криорезистентность*

### *THE EFFECTIVENESS OF BULL SEMEN CRYOCONSERVATION METHOD BY DIRECT IMMERGING TWO-WALL MESH TAPES WITH SPERMA IN NITROGEN LIQUID*

*O. Sushko, Institute of Animal Science, NAAS*

*A research was conducted on a pilot study to further improve the methods of deep freezing of bulls sperm by direct immersion of cassettes with sperma in nitrogen liquid.*



*Tested method of cryopreservation of germ cells with the use of new containers - two-wall mesh tapes, the use of which contributes to the levelling of biological diversity of sperm doses and the elimination of certain negative factors of local action that occur when using conventional procedures and equipment.*

*The new 6 sectional freezer was created for the possibility of using the developed cassettes with the ability to control and limit the flow rate of nitrogen liquid.*

*Keywords: cryopreservation, sperma, bulls, cryopresistance.*

УДК 628.23

## СПОСІБ БОРОТЬБИ З БАКТЕРІАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА

**Терновська Н. І.,** м. н. с.,

**Дмитрієва О. В.,** м. н. с.,

**Литвин В. М.,** к. б. н.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН

*У статті наведено спосіб боротьби з бактеріальними захворюваннями шовковичного шовкопряда за допомогою препарату Фармазину 200. Застосування його в якості терапевтичного засобу у розчині з концентраціями 1,0 % і 1,5 %, шляхом згодовування з кормом зараженим гусеницям IV та V віків, сприяло зниженню загальної загибелі шовковичного шовкопряда на стадіях гусениці та лялечки. Одночасно у досліді достовірно підвищувались життєздатність шовкопряда та урожай шовковичних коконів, а також спостерігалася тенденція до підвищення частки сортових коконів порівняно з зараженим контролем. Розроблений спосіб боротьби з бактеріальними захворюваннями шовковичного шовкопряда, завдяки ефективності і доступності препарату Фармазину 200, може бути використаний на вигодівлях шовковичного шовкопряда.*

**Ключові слова: шовковичний шовкопряд, життєздатність, бактеріози, кокони, метелики.**

Однією з основних причин зниження життєздатності та продуктивності шовковичного шовкопряда є інфекційні та інвазійні хвороби, які широко розповсюджені в шовківницьких регіонах світу, в тому числі і в Україні [1]. До зазначених хвороб, несприйнятливих умов довкілля і впливу стресуючих чинників, шовкопряд, як пойкилотермний організм, є надзвичайно чутливим. Встановлено, що збудники цих захворювань є стійкими та патогенними й уражують шовкопряда на усіх стадіях його розвитку, зберігаючи замкнутий епізоотичний ланцюг: грена → гусениці → метелики → грена [2]. Розробки ефективних режимів їх використання щодо асоціації бактеріальних захворювань шовковичного шовкопряда, так як попередніми дослідженнями встановлено, що саме бактеріози є одними з найбільш поширених захворювань на вигодівлях [2].

Тому, актуальними є дослідження випробування сучасних, доступних препаратів протимікробної дії Фармазин 200 і Бровасептол на стадіях грени та гусениці шовковичного шовкопряда та створення на їх основі ефективних способів боротьби з бактеріальними захворюваннями.

**Матеріали та методи досліджень.** Для визначення бактерицидної дії досліджуваних препаратів застосовували метод батистових тест-об'єктів [4]. Дослідні