

## **ВИКОРИСТАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРИЙОМІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДТАЮВАННЯ СПЕРМИ ЖЕРЕБЦІВ У МАЛИХ ОБ'ЄМАХ**

**І.В. Гончаренко, д-р с.-г. наук,  
Н.П. Платонова, канд. с.-г. наук**

Національний університет біоресурсів і природокористування  
України

*Проаналізовано існуючі технології кріоконсервації сперми жеребців, наведено технологічні прийоми, які впливають на кількісні та якісні показники кріодеконсервованої сперми та запропоновано удосконалену технологію кріоконсервації сперми жеребців у 0,5 мл соломинках, що забезпечує герметичність і безпечність упаковки, економічність зберігання та високу запліднюючу здатність кріодеконсервованої сперми у контрольованих статевих циклах кобил на рівні 60% від їх першого осіменіння для збереження, вдосконалення та раціонального використання генофонду порід коней в Україні.*

Ключові слова: технології кріоконсервації, сперма жеребців, розбавлювачі, спермії, гематологічні показники крові, полімерні соломини.

Підвищення ефективності технологій відтворення у конярстві і подальший прогрес порід неможливі без втілення методів штучного осіменіння коней, в тому числі кріодеконсервованою спермою. Висока бактеріальна забрудненість сперми при природному паруванні кобил з жеребцями є причиною ембріональної смертності, зниження заплідненості самок в подальші статеві цикли, що призводить до народження ослабленого або нежиттєздатного потомства та навіть до безпліддя. В той же час штучне запліднення кобил потенційно знижує загальну мікробну забрудненість сперми при її розбавленні і санації антимікробними препаратами [1].

В сучасній практиці світового конярства отримання сперми на штучну вагіну для кріоконсервації або для осіменіння свіжою (нативною) чи свіжорозбавленою спермою є звичайною практикою. За останні 20-30 років в різних країнах накопичено значний досвід роботи зі свіжорозбавленою охолодженою спермою, розроблено

методи кріоконсервації, які сприяють збереженню фертильності сперми.

У більшості країн бувшого СРСР для штучного осіменіння коней використовують метод заморожування та тривалого зберігання сперми у зрідженому азоті, розроблений у Всеросійському науково-дослідному інституті конярства [5].

У світі розроблено та постійно використовуються декілька технологій кріоконсервації та зберігання сперми жеребців. Кожна з них включає багато етапів, які впливають на кількісні та якісні показники кріодеконсервованої сперми. Існуючі технології суттєво різняться за технологічними прийомами взяття сперми, її підготовки до кріоконсервації, складом кріозахисних середовищ, технікою заморожування, способом зберігання, розморожування і використання [2].

В зв'язку з високою індивідуальною різноманітністю хімічних та фізичних властивостей сперми жеребців при підготовці до кріоконсервації потрібно індивідуально підбирати найбільш ефективний режим. При цьому заплідненість кобил переважно залежить від двох факторів: часу осіменіння (якнайближче до овуляції) та якості сперми.

Сперма жеребців має відносно низьку концентрацію сперміїв і великий об'єм плазми, порівняно з бугаями. Традиційна технологія кріоконсервації сперми жеребців ВНДІ конярства не передбачає видалення плазми, дози сперми для кріоконсервації негерметично пакуються в алюмінієві туби по 15-20 мл.

Технології кріоконсервації сперми жеребців у соломинках 0,25, 0,5 і 5 мл передбачають видалення частини сім'яної плазми шляхом центрифугування. Але під впливом відцентрової сили протягом часу центрифугування росте кількість пошкоджених сперміїв, особливо це помітно при роботі з жеребцями, які характеризуються низькою спермопродуктивністю.

Метою досліджень було науково обґрунтувати та удосконалити технологію кріоконсервації сперми жеребців за комплексом послідовних етапів для збереження, вдосконалення та раціонального використання генофонду порід коней в Україні.

**Матеріали і методика досліджень.** В роботі використано комплекс репродуктивних методів.

Сперму жеребців відбирали за допомогою штучної вагіни різних моделей: Колорадо, Міссурі, ВНДІ конярства та Ганновер, які відрізняються конструктивними особливостями [5]. Інтервал між двома відборами сперми був не менше 2-х діб. Взяття сперми від жеребців здійснювали за загальноприйнятою методикою [12], при цьому для садки жеребця використовували підставну кобилу або фантом. З метою збереження активного статевого рефлексу і для

уникнення порушень умов експерименту внаслідок варіацій в роботі людей з жеребцями працював постійний персонал.

У кожному еякуляті визначали його об'єм після видалення гелю, концентрацію (в камері Горяєва), кількість сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом (візуальна оцінка в балах), загальну кількість сперміїв. Проби нативної і розведеної сперми після еквілібрації фіксували в 3% гіпертонічному розчині по відношенню до сперми фіксатором на основі лактозо-хелатно-цитратно (ЛХЦ) розріджувача (ВНДІ конярства). Патологічні форми сперміїв визначали при мікроскопічному дослідженні роздавленої краплі фіксованого зразка сперми за методом фазового контрасту (ос10 × об40). Враховували такі аномальні форми сперміїв: спермії з порушеннями акросомальної частини – без акросоми, з порушеною акросомою, зі збільшеною акросомою, спермії з патологіями в області шийки і хвостика (потовщення, загини), незрілі спермії (з протоплазматичними краплею), окремо лежачі голівки, тератогенні форми.

Для розведення сперми використовували розріджувачі ЛХЦЖ (ВНДІ конярства), ІНРА-82 (Palmer) і Кенні (Kenney), підігріті до 37°С. Охолодження розведеної сперми до 27° С проводили при кімнатній температурі (20-22° С) з середньою швидкістю 0,33° С, подальше охолодження здійснювали у полістироловому охолоджуючому контейнері. При середній швидкості охолодження 0,25° С/хв. час охолодження 250 мл розведеної сперми до +5° С складав 1,5 години.

Визначали також сезонні коливання морфологічних показників у нативної сперми жеребців та проводили порівняльний аналіз коливання морфологічних показників сперміїв залежно від розріджувача та способу упаковки.

**Результати досліджень.** Сьогодні існує потреба кінних заводів у широкому використанні видатних жеребців-плідників. Для цього необхідно своєчасне створення кріобанків їх спермопродукції. Однак не всі плідники мають сперму, здатну витримувати заморожування-відтаювання. Так, у США та Канаді лише 70 % плідників мають сперму, придатну до кріоконсервації.

Відомо два шляхи підвищення якості сперми. Перший полягає в розробці нових розріджувачів, однак, виходячи з особливостей метаболізму спермія, суттєво покращити якість сперми таким чином не вдається. Тому ефективнішим шляхом покращення якості сперми є вплив різноманітними методами на організм плідника з метою активізування статевої функції.

Однією з причин безпліддя самців можуть також бути активні форми кисню (АФК) в плазмі сперми, кількість яких пов'язана з окисненням поліненасичених жирних кислот і утворенням продуктів

ПОЛ (дієнових кон'югатів, малонового диальдегіду, гідроперекисів), які ушкоджують мембрани та органели сперміїв, призводячи до зниження активності, виживаності та, врешті – запліднюючої здатності сперми.

Крім того, суттєвою проблемою у відтворенні коней залишається низька кріостійкість сперми жеребців-плідників, а проведення рутинних досліджень сперми за такими показниками, як концентрація, активність, виживаність та ін. при апробації жеребців є недостатніми.

Все це спонукало нас до удосконалення технології кріоконсервації сперми жеребців у 0,5 мл соломинках, яка передбачає: герметичність і безпечність упаковки; економічність зберігання у кріоконтейнерах; оптимальні морфологічні показники (не більше 20% аномальних сперміїв); рухливість сперміїв (не менше 30% сперміїв з прямолінійно поступальними рухами); виживаність у термостаті при 38°C не менше 4-х годин; запліднюючу здатність кріодеконсервованої сперми у контрольованих статевих циклах кобил на рівні 60% від першого осіменіння.

*Особливістю статевої поведінки жеребців при взятті сперми на штучну вагіну є прояв їх статевих рефлексів та оптимальний режим використання.*

Якщо жеребець знаходиться в табуні постійно, то на перших порах він намагається паруватися з будь-якою кобилою. Однак, кобили, залежно від стадії статевого циклу по-різному на нього реагують. Ті, які не в стані статевої охоти, тікають або, навпаки, агресивно налаштовані і б'ють жеребця і, таким чином, по відношенню до них рефлексі, що відповідають за статево поведінку, гальмуються. Кобили, які перебувають у стані статевої охоти, особливостями своєї поведінки позитивно підкріплюють статеві рефлексі жеребця. З часом він набуває певного досвіду і надалі статево поведінку проявляє тільки по відношенню до кобил в стані статевої охоти.

Велика кількість проблемних в паруванні жеребців характеризуються наявністю різних видів порушень рефлекторної діяльності, які виникають внаслідок впливу різноманітних зовнішніх подразників, перемикаючих на себе увагу жеребця. Наприклад, зміна звичного місця парування, присутність сильного стороннього подразника, що викликає на себе сильний орієнтовний рефлекс тварини (яскраве світло, гучний окрик, незвична поведінка людини). Залежить це від особливостей темпераменту коня.

Нерідко зустрічаються жеребці, які схильні до сильного збудження, особливо на початку парувального сезону (після тривалого періоду статевого спокою), коли вигляд кобили викликає

у них сильний статевої рефлекс, який виявляється настільки потужним, що гальмує всі інші ланки ланцюга статевих рефлексів. У результаті може спостерігатися недостатня ерекція статевого члена, не відбуватися еякуляція, або вона неповноцінна (мала кількість сперматозоїдів, низька якість сперми). За умови спокійного відношення до цих проблем з боку людей через 5-10 хвилин збудження нормалізується і тоді стає можливим нормальне парування.

Якщо тримати жеребця-плідника в одному приміщенні разом з кобилами, то їх близькість збуджує в ньому статеві рефлекси, проте без підкріплення вони скоро гасяться і самець перестає збуджуватися від виду самки. Цей вид гальмування буває спрямованим на конкретних кобил, парування з іншими кобилами відбувається нормально. Щоб відновити нормальний прояв статевих рефлексів жеребцю потрібен відпочинок або зміна обстановки.

Диференційоване гальмування виникає у відповідь на певні подразники, наприклад, на присутність певної людини, яка раніше вчинила будь-яку дію, яка була неприємна жеребцю. Це можуть бути грубі дії в області препуцію або статевого члену, а також підмивання його надмірно холодною (гарячою) водою після садки, або жеребець відмовляється крити кобилу, яка його одного разу вдарила.

При надмірному навантаженні з'являється особливий вид гальмування статевих рефлексів – настає сонливість. Багато конярів стикаються з проблемою зниження статевої активності плідника в розпал парувального сезону. Щоб уникнути цього явища треба дотримуватися режиму використання жеребців і при необхідності давати їм відпочинок. Це також дозволить зберегти високу якість сперми, яка незмінно знижується при надмірному навантаженні на жеребця.

Надмірне використання жеребця протягом парувального сезону веде до зниження якості та зменшення кількості сперми, що негативно позначається на зажеребляємості кобил. У такому випадку йому необхідно надати більш тривалий відпочинок. Якщо жеребець регулярно робить 1-4 садки на тиждень, то такий режим використання є оптимальним і не викликає негативних наслідків. Навантаження на молодих жеребців віком 3-5 років і на старих жеребців старших 15 років не повинна перевищувати 4 садки на тиждень. Проте в господарствах з високою культурою відтворення (висока зажеребляємість, благополуччя по хворобах репродуктивної системи, обов'язкове ректальне дослідження кобил перед паруванням, осіменіння свіжоотриманою спермою кількох кобил) обходяться меншою кількістю садок на одну жеребність.

Отримання сперми від жеребців здійснювали з використанням підставної кобили або фантому, який регулювали відповідно до індивідуальних характеристик та стану здоров'я жеребця (рис. 1, 2), та штучних вагін різних конструкцій. Встановлено, що еякуляція відбувається скоріше і відсоток еякулятивних садок більше (75,7% порівняно з 59,0%), коли використовується підставна кобила, особливо це стосується періоду привчання жеребців для отримання сперми на штучну вагіну. Кількість еякулятивних садок значно більше при використанні штучних вагін з жорстким корпусом і закритим або звуженим зовнішнім краєм (моделі Ганновер і ВНДІ конярства) - біля 90% [4].



Рис. 1. Отримання сперми від жеребців з використанням фантому



Рис. 2. Фантом для взяття сперми жеребців моделі "Hannover" (Розмір фантому підходить для всіх порід коней з розмірами корпусу 200x60x55 та гідравлічно регульованою висотою від 1,28 до 1,48 м.)

Після отримання сперми, її якомога швидше необхідно розбавити, щоб попередити процеси інтоксикації. При підготовці сперми жеребців до осіменіння в свіжорозбавленому вигляді або після кріодеконсервації використовуються різні розбавники. Вони повинні містити такий набір осмотично активних компонентів, які б у певних співвідношеннях могли забезпечити сперміям оптимальні фізико-хімічні параметри (рН, осмолярність, співвідношення полярних і неполярних сполучень, іонів та ін.), а також уберегти спермії від температурного шоку, кріоушкоджень та мікробної контамінації. Різними авторами відзначається значна індивідуальна варіація збереження сперміїв при використанні розріджувачів різного складу і вказується на необхідність підбору оптимального розріджувача в кожному випадку індивідуально. Однак загальнометодичні і технологічні підходи до цього питання спрямовані на збереження максимально можливої кількості життєздатних, морфологічно нормальних сперміїв, і, як наслідок, підвищення рівня відтворення в конярстві.

При штучному осіменінні з використанням свіжорозбавленої або кріодеконсервованої сперми існує проблема збереження життєздатності сперміїв, що залежить від багатьох факторів: складу розбавника, антибіотику, що в ньому використовується, ступеня мікробної контамінації сперми та інше. Для санації сперми, як правило, використовують антибіотики: пеніцилін G, стрептоміцин, гентоміцин, неоміцин, амікацин, лінкоміцин, поліміксин В. Ці препарати не проходять гемотестикулярний бар'єр і практично нешкідливі для сперміїв, як при безпосередньому контакті (у складі розбавника), так і при внутрішньом'язевому, підшкірному, внутрішньовенному та пероральному введенні. Однак, деякі препарати є токсичними для сперміїв, токсичність інших препаратів може підвищуватися внаслідок пошкодження гемотестикулярного бар'єру в результаті системних захворювань або травм в області сім'яників.

Спеціалісти кінних заводів відмічають тенденцію до зниження запліднюючої здатності після планових вакцинацій плідників.

Нашими дослідженнями встановлено, що терапія з

використанням амоксициліну в рекомендованих дозах призводить до тимчасового збільшення кількості сперміїв з порушеннями вторинного характеру та зниження запліднювальної здатності. Під час парувального сезону й при підготовці до нього необхідно вивчати й враховувати спермотоксичні властивості препаратів, які використовуються при лікуванні жеребців-плідників, зокрема амоксициліну.

Крім процесу розбавлення сперми підготувати її до глибокого заморожування можливо рядом технологічних прийомів. До них відносяться різні способи інкубації сперми, застосування анаеробних умов, введення антиоксидантів. З метою кращої переживаності сперміїв при кріоконсервуванні використовують також різні прийоми концентрації сперми (фільтрацію, відстоювання, центрифугування), а також способи розбавлення сперми. Нині розроблено три варіанти кріопротекторної обробки сперми: 1 – без концентрації сперматозоїдів; 2 – з їх концентрацією; 3 – діалізом.

*Морфометрична характеристика голівки сперміїв жеребців.* Мінливість промірів головки сперматозоїда – високоіндивідуальний показник, який може бути чуттєвим біомаркером, пов'язаним з репродуктивним потенціалом, структурою хроматину та стійкістю сперматозоїдів до кріоконсервації. Доведено, що мінливість промірів головки сперміїв бугаїв вірогідно пов'язана з аномальною структурою хроматину. Також відомо, що зміни в морфологічній структурі хроматину можуть бути індуковані зовнішніми факторами – особливостями утримання та використання бугаїв.

Досліджено 9 еякулятів, зображення яких були переведені у графічний формат для подальшого аналізу. Вимірювання проводилися за допомогою програми для морфометричних досліджень TpsDig (© 2004 by F. James Rohlf) на мазках нативної сперми, зафарбованих еозином, на препаратах живої сперми та на мазках розмороженої сперми. Враховувалися такі показники: морфологічна форма спермія, довжина голівки, ширина голівки, довжина медіальної частини (шийки) та дистальної частини (джгутика), вираховувалося співвідношення “довжина голівки/ширина голівки”.

Встановлено, що внаслідок кріоконсервації відносна кількість морфологічно нормальних сперміїв вірогідно знизилася ( $p < 0,001$ ) в переважній більшості за рахунок пошкодження голівок сперміїв. Середні проміри голівок морфологічно нормальних сперміїв після кріодеконсервації вірогідно менші ( $p < 0,01$ ), порівняно з морфологічно нормальними сперміями нативної сперми. Проміри голівок сперміїв на зафарбованих сухоповітряних мазках вірогідно менші ( $p < 0,01$ ) за препарати з живої сперми в середньому на 15%.

*Зв'язок показників сперми жеребців та її кріостійкості з біохімічними і гематологічними показниками крові.* Одним із



перспективних досліджень у випадках низької кріорезистентності сперматозоїдів ми вважаємо вивчення зв'язку між показниками крові і сперми жеребців.

Залежно від віку всіх досліджених жеребців було розподілено на чотири групи, За рухливістю і виживаністю спермій визначено кріостійкість сперми та досліджено біохімічні показники крові коней.

За результатами аналізу біохімічних і гематологічних досліджень крові жеребців встановлено, що у жеребців старшого віку (15 років і старше) наявність патологічних процесів в організмі, які характеризуються вираженим лімфоцитозом, зниженим рівнем глобулінів, низькою кількістю еритроцитів і гемоглобіну, підвищеним значенням С-реактивного білку і збільшенням кількості паличкоядерних нейтрофілів призводить до зниження якості та кріостійкості сперми, яке також відбувалось при наявності явищ аутоінтоксикації (підвищення кількості еозинофілів, підвищення концентрації сечовини та  $\alpha$ -амілази).

*Фасування сперми жеребців* для кріоконсервації пропонується здійснювати в полімерні соломинки (пайети) обсягом 0,5 мл на комплектах французького обладнання або їх аналогів. Для функціонального забезпечення цієї технології певне значення мають фасувально-закупорювальні системи та маркірувальні апарати. Тому фасування цінних еякулятів жеребців об'ємом 0,5 мл відбувається на напівавтоматичній фасувально-закупорювальній системі SFS 133 (рис. 3) з нанесенням відповідної інформації на пайети принтером EasyCoder фірми Minitüb.



Рис. 3. Напівавтоматична фасувально-закупорювальна система SFS 133 сперми жеребців

Використання термічного методу переносу друку на соломинку, на відміну від раніше застосовуваних струйних та роликкових

принтерів, дозволяє наносити 1300 маленьких “крапочок”, що гарантує нанесення різних символів, логотипів та штрих-кодів у якісному друці (300 DPI), а маркування при цьому легко читається, надруковані дані не змазуються і не тускніють. Крім того такий принтер на соломинках обсягом 0,25 та 0,5 мл дозволяє надрукувати до 3 строк при потужності 3,6 тис. соломинок/годину.

**Висновки.** Науково обґрунтовано та удосконалено технологію кріоконсервації сперми жеребців за комплексом послідовних етапів: особливістю статевої поведінки жеребців та одержання від них сперми на штучні вагіни різних модифікацій з використанням підставної кобили або фантому; збереження життєздатності сперміїв (використання розбавників, антибіотику, ступеня мікробної контамінації сперми); стійкістю сперміїв до кріоконсервації за морфометричною характеристикою голівки сперматозоїдів, біохімічними і гематологічними показниками крові та сперми; фасування сперми у 0,5 мл поліетиленових соломинках, яка передбачає герметичність і безпечність упаковки та економічність зберігання у кріоконтейнерах.

Впровадження даної технології забезпечує оптимальні морфологічні показники (не більше 20% аномальних сперміїв), рухливість сперміїв (не менше 30% сперміїв з прямолінійно поступальними рухами); виживаність у термостаті при 38°C не менше 4-х годин; запліднюючу здатність кріодеконсервованої сперми у контрольованих статевих циклах кобил на рівні 60% від першого осіменіння.

#### Список використаної літератури

1. Атрощенко М.М. Количественный и видовой состав микроорганизмов, выделяемых из спермы жеребцов-производителей, используемых в ручной случке / М.М. Атрощенко // Коневодство и конный спорт. – 2008. – № 5. – С. 5-7 .
2. Васильева О.В. Сравнительный анализ отечественных и зарубежных подходов к проблеме замораживания спермы жеребцов: автореф. дис. на соискание учен. степ. кандидата биол. наук: спец. 03.00.13 “Физиология” / О.В. Васильева. – Дивово, 2007. – 36 с.
3. Гончаренко І.В. Методичні аспекти отримання сперми від жеребців-плідників / І.В. Гончаренко, Н.П. Платонова, О.М. Кадацький // Науковий вісник Львівського НУВМтаБ ім. С.З. Гжицького: Зб. наук. пр. Серія “Сільськогосподарські науки”. – Львів, 2010. – Т. 12. – № 3(45). – Ч. 3. – С. 31-37.
4. Ескин Г.В. Качество замороженно-оттаянной спермы при разной технологической обработке перед замораживанием / Г.В. Ескин, А.Г. Нарижный // Зоотехния. – 2007. – № 6. – С. 25-27.
5. Рекомендации по замораживанию и длительному хранению в жидком азоте спермы жеребцов-производителей // Сборник нормативных документов по оценке племенного материала. – ВНИИ плем., 1999. – Т. 3. – С. 62-67.