

УДК 636.2.082.453.5

ЭФЕКТИВНОСТЬ ЗАМЕНЫ КУРИНОГО ЖЕЛТКА РАСТИТЕЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ В СОСТАВЕ КРИОПРОТЕКТИВНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ СПЕРМЫ БАРАНОВ

Павленко Б.М.

Институт животноводства НААН Украины

Резюме. Приведены результаты исследований криозащитных свойств бесжелточной среды на основе растительных компонентов сои с целью устранения микробного фактора, возможным переносчиком которого может быть желток куриных яиц. Установлено, что при замене стандартной желтоксодержащей среды на бесжелточную, обеспечиваются качественные показатели спермы после замораживания-оттаивания на уровне с контролем.

Ключевые слова: эякулят, сперма, желток, сахароза, глицерин, стерилизация, денатурация, спермодоза, криоконсервирование.

Актуальность проблемы. Современная индустрия репродукции в молочном скотоводстве базируется на широком внедрении искусственного осеменения коров и телок криоконсервированной спермой. При консервировании спермы холодом, обязательным компонентом криопротективной среды является нативный желток из-за обилия в нем фосфолипидов и липопротеидов, которые, взаимодействуя с плазматическими мембранами спермиев, модифицируют их в направлении повышения прочности и стабильности. [3-5, 9]. Адсорбируясь липофильными и гидрофильными участками плазматических мембран, липоидные комплексы почти в три раза утолщают клеточную мембрану, усиливают устойчивость гамет к повреждению температурным, осмотическим, иммунным, физико-химическим и механическим факторами. [5-8, 9]. Поэтому желточные разбавители стали основой производственных технологий консервирования спермы животных. Вместе с тем, в силу ряда существенных недостатков, желток не является идеальным компонентом искусственных сред. Основным из них является его термолабильность, что лишает возможности надежно стерилизовать желточные среды общедоступными способами [12].

Доказано, что желток во многих случаях является носителем патогенной и условно-патогенной микрофлоры [1, 2]. При снесе яйца несушки, его скорлупа вступает в контакт с множеством загрязненных микрофлорой предметов окружающей среды (клоаки, воздуха, пыли, подстилки и обору-

дование птичника, яичных лотков, рук операторов и других). На скорлупе обнаруживают от нескольких тысяч до 20-23 миллионов микробных клеток [1, 2]. Бактерии, проникая через скорлупу и подскорлупную оболочку яйца, заражают его содержимое, причем, этот процесс происходит очень быстро, в течение 30 минут после снесения яйца несушки.

Установлено проникновение через скорлупу следующих возбудителей: пуллороза, тифа, чумы, аспергиллеза, микоплазмоза, сальмонеллеза и ряда вирусных инфекций [2]. Из яиц, снесенных курами, больными туберкулезом, птичьим гриппом или орнитозом, выделены микобактерии туберкулеза, вирус - H5N1 и возбудитель птичьего хламидиоза - *Chlamydia psittaci*. Не исключена также возможность дополнительной контаминации среды микрофлорой в условиях племенного предприятия при изготовлении ее *ex tempore* [7]. В связи с этим применение желтка в качестве защитного компонентом и криопротекторных сред представляет не контролируемую угрозу микробного загрязнения спермы и распространение при проведении искусственного осеменения вирус-бактериальных заболеваний, вызывающих нарушение репродуктивной функции и бесплодие маточного поголовья.

Вместе с тем, использование рекомендуемых концентраций желтка может оказывать токсическое действие, вызывает агглютинацию половых клеток и снижение их выживаемости при криоконсервировании [6, 12-14, 15]. Сперма, после разбавления желточной средой приобретает негативные физические свойства, проявляющиеся в повышении ее вязкости, оптической плотности и потере прозрачности из-за наличия в желтке большого количества желточных глобул [12]. Это создает серьезные трудности при определении подвижности спермиев методом микроскопии, снижает возможность объективного прогнозирования их оплодотворяющей способности.

Яичный желток также может быть загрязнен токсичными для спермиев остатками фармакологических препаратов, используемых в птицеводстве при проведении лечебно-профилактических мероприятий.

В яичном желтке обнаружены высокие концентрации гормона прогестерона, который может провоцировать преждевременную акросомную реакцию спермиев и снижать их оплодотворяющую способность.

Учитывая изложенное, возникла острая необходимость исключения из состава искусственных сред куриного желтка и поиска равноценных его заменителей из растительных источников.

Цель исследований. Целью исследований являлось повышение санитарно-гигиенического уровня искусственного осеменения овец и защита маточного поголовья от распространения заболеваний, передающихся желтком куриных яиц через замороженную или охлажденную до 0 °С сперму

производителей путём исключения из состава криопротективных сред – желтка и заменой его компонентом растительного происхождения, выделенного из семян сои, а также исследование конвекторного способа замораживания и его влияние на качественные показатели спермы баранов.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в научно-методическом племпредприятии ИЖ 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 овец. Опытная криопротективная среда для спермы будет готовиться по нашей методике, согласно изобретению (патент Украины № 36667 от 10.11.08). В качестве контроля использовалось стандартная среда, предназначенная для замораживания спермы согласно инструкции. Осмотическое давление определялось криоскопическим методом, концентрация водородных ионов потенциометром ЕВ-74. Центрифугирование осуществлялось лабораторной центрифугой ОПН-8. Для замораживания спермы использовался конвекторный способ, обеспечивающий дозированное высокоскоростное охлаждение герметизированных спермодоз [8]. Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента с использованием программного пакета «Statgraph» (16). Биологические показатели спермы определялись по действующим ДСТУ 35.35-97, ГОСТ-2777-88.

Результаты исследований. В процессе исследований с целью замены куриного желтка в опытных средах для разбавления спермы баранов была изготовлена, простерилизована и расфасована партия гидролизата из семян сои. С целью более высокой очистки среды от осадка было увеличено центробежное ускорение до 1500 g.

Таблица 1

Состав стандартной и опытной сред для разбавления спермы баранов перед замораживанием для проведения сравнительного исследования

| Стандартная среда | Опытная среда |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Лактоза – 13,0 | Сахароза – 13,0 |
| Желток – 30,0 | Гидролизат сои – 30,0 |
| Трис – 0,6 | Трис – 0,6 |
| Кислота лимонная – 0,3 | Кислота лимонная – 0,3 |
| Глицерин – 9,0 | Глицерин – 9,0 |
| Вода дистиллированная - 100 | Вода дистиллированная - 100 |

Проведенные сравнительные исследования на влияние бесжелточной среды на биологические показатели спермы баранов после замораживания-оттаивания показали, что качественные показатели спермы разбавленной

этой средой находятся на уровне контроля, что свидетельствует об эффективности принятого решения. В опыте подвижность спермы после оттаивания составляла - 4 балла (а), выживаемость в часах - 6,7 (t); показатель абсолютной выживаемости - 19,3 единицы (Sa), а в контроле соответственно а - 4,0; Sa - 9,1; t - 6,5.

Таблица 2

Сравнительное исследование влияния модифицированной бесжелточной среды на основе соевого гидролизата на качественные показатели спермы баранов после замораживания-оттаивания, n = 8 ($M \pm m$)

| Показатели качества спермы | Контроль | Опыт |
|---|------------|------------|
| Подвижность спермиев после разбавления (а) | 7,0±0,02 | 7,0±0,01 |
| Подвижность спермиев после замораживания - оттаивания (а) | 4,0±0,02 | 4,0±0,02 |
| Показатель абсолютной выживаемости (Sa) | 19,1 ±0,04 | 19,3 ±0,04 |
| Выживаемость в часах (t) | 6,5 ± 0,05 | 6,7 ± 0,05 |

P<0,90

Были проведены исследования по влиянию конвекторного метода замораживания спермы баранов-производителей на качественные показатели спермы после замораживания-оттаивания по сравнению со стандартным методом. В основу разработки положен принцип дозированного вентилирования герметизированных спермодоз холодным паром азота, непосредственно в контейнере [11].

При этом показатели спермы при конвертерном способе замораживания спермы были лучше по сравнению с контролем: по активности после замораживания на 0,5 баллов, выживаемость при 38 °С - на 2,0 ч и по показателю абсолютной выживаемости - на 3 условных единицы.

Таблица 3

Сравнительное исследование влияния конвекторного способа замораживания на качественные показатели спермы баранов

| Показатели качества спермы | Контроль | Опыт |
|---|------------|------------|
| Подвижность спермиев после разбавления (а) | 7,0 ± 0,01 | 7,0 ± 0,01 |
| Подвижность спермиев после замораживания - оттаивания (а) | 4,5 ± 0,41 | 5,0 ±0,41 |
| Показатель абсолютной выживаемости (Sa) | 26,0 ±0,75 | 29,0 ±1,28 |
| Выживаемость в часах (t) | 6,0 ± 0,05 | 8,0 ± 0,05 |

P>0,95

Выводы

1. В результате проведенных исследований установлено, что качественные показатели спермы баранов, разбавленной альтернативным стерильным разбавителем на основе растительных компонентов (гидролизат сои) после замораживания-оттаивания по Харьковской технологии были на уровне с контролем, что указывает на возможность отказаться от использования сред с содержанием желтка.

2. Использование растительного фортификанта плазматических мембран вместо нативного желтка в средах даёт возможность избежать загрязнения спермы и половых путей самок возбудителями болезней, передающихся с желтком, применить простые и надёжные способы стерилизации разбавителей для спермы баранов.

3. Установлена эффективность криоконвекторного способа замораживания спермы баранов. В опыте биологические показатели спермы при ее замораживании – оттаивании были достоверно выше контроля.

Литература

1. Бреславец В.О., Шоміна Н.В., Ракова А.А. Вплив хімічної обробки у другу половину інкубації на мікробну контамінацію та виводимість яєць. // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий науковий збірник – 85. Том 1. Харків -2005. С.164 – 169.
2. Загаевский И. Источники обсеменения яиц микрофлорой и их дезинфекция // Птицеводство. – 1969. - №6. – С.33 – 34.
3. Милованов В.К., Селиванова О.А. Разбавители для спермы сельскохозяйственных животных / Проблемы животноводства – 1932. - №2. – С.75-86.
4. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. Монография. – Изд. с.-х. литературы, журналов и плакатов. Москва. – 1962. – 696 с.
5. Осташко Ф.И. О природе холодового удара живчиков // Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных: Сб. научных трудов / НИИЖ Л и П. УССР. – Харьков. – 1963. – С. 22-41.
6. Осташко Ф.И., Павленко М.П. Способ консервирования спермы животных. – А.С. №523693. – 1974 г.
7. Осташко Ф.И. глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. – К.: Урожай. – 1978. – 255 с.
8. Осташко Ф.І. Павленко М.П., Павленко Л.Н. Методика визначення антишокових властивостей захисних компонентів в розбавлювачах при дії низьких температур на спермії // Нове в методах зоотехнічних досліджень / Інститут тваринництва УААН. – Харків. – 1992. – С.138-142.
9. Павленко М.П. Усовершенствование и разработка технологии

- криоконсервации спермы быков-производителей. Автореферат канд. диссертации. – Харьков, 1981.
10. Павленко М.П., Павленко Л.Н., Осташко Ф.И. Новый фортификант плазматических мембран и его влияние на биологические показатели спермиев быков при консервации // ІЗ'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини 18-20 жовтня 1995 р. – С. 188-189.
11. Павленко Б.М. Конвекторный способ замораживания спермы в облицованных гранулах. Институт животноводства НААН. Сборник №104. – 2011. С.146-153.
12. Павленко Л.М. Довгозбережене середовище для кріоконсервації сперми бугаїв та способи його виготовлення. Автореферат канд. дисертації. – Харків. – 1999. – 19 с.
13. Семенова В.А. Применение низкомолекулярного липопротеина желтка в средах для замораживания семени баранов // Животноводство - №3. – Агропромиздат, Москва. – 1987. – С.51-52.
14. Ostashko F.I., Pavlenko M.P., Pavlenko L.N. Antyshock effect of yolk and components in cooling spermatozooids of bull, ram and boar / 10th International Congress of Animal Reproduction and A.I> - Illinois (USA). – 1984. – V.1. – 209-211.
15. Phillips P.H., Lardy H.A. A yolk-buffered pabulum for the preservation of the bull semen // J. Dairy Sci. – 1940. – Vol.23. – p. 394-396.

**ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАМІНИ КУРЯЧОГО ЖОВТКА РОСЛИННИМИ
КОМПОНЕНТАМИ У СКЛАДІ КРІОПРОТЕКТИВНОГО СЕРЕДОВИЩА
ДЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ БАРАНІВ**

Павленко Б.М.

Інститут тваринництва НААН

Анотація. Наведено результати досліджень кріозахисних властивостей безжовткового середовища, на основі рослинних компонентів сої. Встановлено, що при заміні стандартного жовткового середовища на безжовткове забезпечуються якісні показники на рівні з контролем.

Ключові слова: еякулят, сперма, жовток, сахароза, гліцерин, стерилізація, денатурація, спермодоза, кріоконсервування.

**PERFORMANCE REPLACEMENT CHICKEN YOLK VEGETABLE
COMPONENT OF KRIOPROTEKTYVNOHO ENVIRONMENT FOR
FREEZING SEMEN RAM**

Pavlenko B.M.

Institute of animal NAAN

Summary. Results of researches of cryoprotective properties of the

beszheltochny environment on the basis of vegetable components of soy for the purpose of elimination of the microbic factor the yolk of eggs can be which possible carrier are given. It is established that when replacing the standard zheltoksoderzhashchy environment on beszheltochny, quality indicators of sperm after freezing thawing at level with control are provided.

Key words: ejaculate, sperm, yolk, sucrose, glycerin, sterilization, denaturation, the dose of sperm, cryoconservation.
