

ють десятки і навіть сотні тисяч високопродуктивних нащадків. У результаті роль спадковості плідників у генетичному поліпшенні молочних порід великої рогатої худоби сягнула 90—95%, у вівчарстві — 70—80.

Таким чином, плідники-поліпшувачі у прямому розумінні стали золотим фондом тваринництва. Продуктивність 17321 дочки бугая Лінкольна 384785 голштинської породи становила 9416 кг молока, 4,0% жиру та 377 кг молочного жиру.

Творчий внесок автора глибокого заморожування сперми плідників сільськогосподарських тварин І.В. Смирнова у біологічну науку має неоціненне значення і залишається основним методом відтворення великої рогатої худоби, овець, свиней та інших видів тварин у третьому тисячолітті більш ніж у 100 країнах світу.

Українська академія аграрних наук

Інститут розведення і генетики тварин УААН

УДК 636.453.53

Н.З. ЖИЛЬЦОВ, А.Д. СУБОТИН, А.С. ГОЛУБЬ, А.В. ЧИЧИЛОВ

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ СЕМЕНИ БЫКА

В последние годы исследователи в области глубокого замораживания семени сельскохозяйственных производителей направили свои усилия на разработку методов замораживания семени барана, хряка, жеребца, в то же время совершенствование метода замораживания семени быка, особенно в технологии разбавления и охлаждения (синтетические среды, эквивибрация), просто прекратилось.

Отсюда среда ГЛЦЖ (В.Ф. Турбин, 1967) до сих пор является основной для разбавления и замораживания семени быка.

© Н.З. Жильцов, А.Д. Суботин, А.С. Голубь, А.В. Чичилов, 2001

Розведення і генетика тварин. 2001. Вип. 34

Дело в том, что почти 30 лет ученые усиленно работали в области разработки технологических линий по промышленной расфасовке семени быков в пластиковые соломинки или облицованные гранулы (французская, башкирская, байсогольская, харьковская технологии).

Однако исследователи в области замораживания семени барана, хряка, жеребца испытали множество веществ, которые позволили, в конце концов, разработать методы замораживания семени указанных выше производителей.

Интересно, что в средах для указанных производителей успешно использовали динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (хелатон), которая в 1972 г. на ЦСИО была введена в среду для замораживания семени быка. Она давала прекрасные результаты по активности и живучести оттаяного семени, однако оплодотворяемость коров и телок от такого семени снизилась. Поскольку результаты работы были признаны неправомерными с определенными оргвыводами, хелатон, естественно, был удален из сред, а сам препарат стал запретным для семени быка почти четверть века.

Однако этот же хелатон позволил решить проблему глубокого замораживания семени хряка, а комплексонаты магния, меди, кальция и цинка практически дали возможность получать приемлемые для практики результаты ягнения от глубокозамороженного семени барана.

Правда, в 80-х годах В.К. Милованов и Л.С. Жильцова (1985) пытались ввести в среды для быка указанные выше комплексонаты и получили положительные результаты в колхозе "Сельская жизнь" Тульской области, но дальше указанные авторы не пошли, поскольку стресс от хелатона все еще давил над сознанием чиновников Минсельхоза СССР.

В 1998 г. в своих исследованиях по тематике отдела биологии А.В. Чичилов обнаружил повышенную нуклеазную активность в семени быка за счет желтка куриного яйца, чего он не обнаружил в семени хряка и барана, что, несомненно, можно объяснить присутствием в средах для этих видов хелатона и комплексонатов. Эти исследования проведены по теме, свя-

занной с попытками трансформирования спермиев сельскохозяйственных животных.

В последние годы появились работы и целые кандидатские диссертации, посвященные трансформированию сперматозоидов (Багиров Вугар, 1997; Щит Г., 1998), в которых показано, что глубокое замораживание может трансформировать ДНК живчиков.

Такие предпосылки заставляют исследователей искать пути снижения в синтетической среде нуклеазной активности за счет замены полностью или частично желтка куриного яйца вытяжкой из желтка или лецитина желтка с использованием холина. А поскольку в последние годы появился препарат бетаин, который получают из сахарной свеклы по технологии компании "Финшуга" (это вещество превращения холина в митохондриях клетки), есть возможность ввести это вещество в синтетические среды для семени быка, как источник метильных групп. Бетаин имеет тесную связь с обменом метионина, он на 10—15% сохраняет метионин за счет прекращения изъятия метильных групп из этой аминокислоты, и следовательно, он как бы выступает защитником метионина при процессах метилирования в живой клетке.

Кроме того, бетаин является регулятором осмоса при стрессовых процессах и обладает определенным антибактериальным воздействием.

Таким образом, можно констатировать, что холин и бетаин могут с успехом использоваться в синтетических средах для семени быка как криопротекторы и защитники обменных процессов в живчиках при глубоком замораживании. В связи с этим, несомненно, большой интерес вызывает возможность использования в синтетической среде в качестве неэлектролитов аминокислот — лизина, метионина и глицина. Причем эти аминокислоты можно ввести на фоне уже используемых углеводов (глюкоза, лактоза, сахароза).

Целью наших исследований являлось дальнейшее совершенствование технологии глубокого замораживания семени быка и повышение результативности осеменения коров и те-

лок замороженным семенем. Для достижения поставленных целей планировалось решить следующую задачу: разработать новую синтетическую среду для замораживания семени быка, которая бы обеспечила снижение нуклеазной активности в семени перед замораживанием, повышение биологической полноценности живчиков и их оплодотворяющей способности.

Определение нуклеазной активности в семенной плазме и суспензии сперматозоидов путем электрофореза в агаре дало интересные результаты. Например, в среде 199 и 3% цитрата натрия со спермией хряка в течение двух часов не было замечено следов проявления нуклеазной активности. В свежей семенной плазме быка нуклеазная активность начинает проявляться после одночасовой инкубации, и в разбавленном семени хряка средой для замораживания семени активность нуклеаз также проявляется после часа инкубации. А вот в семенной плазме барана и быка наблюдалась очень высокая нуклеазная активность уже в первую минуту инкубации. В опытах замечено, что активность нуклеаз повышает добавление желтка куриного яйца в среду для замораживания и сделан вывод о том, что при отсутствии в средах реагентов, снижающих нуклеазную активность (тот же хелатон, как в среде для хряка), желток может быть опасным для хромосомальной ДНК живчиков с точки зрения её деградации. Активность желтка куриного яйца может привести к деградации определенной части ДНК сперматозоида.

В данной работе наряду с определением нуклеазной активности раствора куриного желтка и среды для замораживания в целом были изучены также активность амилазы, пероксидазы, протеазы, каталазы и липазы (табл. 1).

Было установлено, что амилазная активность среды находится на одном уровне с активностью семенной плазмы. Активность липазы отсутствовала как в одной, так и в другой среде. Активность пероксидазы и протеазы отмечалась в среде для замораживания и отсутствовала в семенной плазме. Наибольшее различие наблюдалось по активности нуклеаз.

В соответствии с планом работ по использованию новых

1. Определение ферментативной активности стандартной среды для замораживания семени быка и семенной плазмы

| Показатели | Семенная плазма | Среда для замораживания |
|-------------|-----------------|-------------------------|
| Амилаза | 40 ед. В | 40 ед. В |
| Пероксидаза | Отсутствует | 4,2 мг/мл |
| Протеаза | Отсутствует | 1,0 мг/мл |
| Каталаза | 0,02 ед. | — |
| Липаза | Отсутствует | Отсутствует |
| Нуклеаза | 5% | 90% |

синтетических сред для замораживания изучалась нуклеазная активность в средах с добавками лактозы, холин-хлорида, комплексонов меди (табл. 2). Было установлено, что наименьшая степень нуклеазной активности среды наблюдалась в случае добавок комплексонов меди и холин-хлорида.

Совершенствование синтетической среды проводилось путем введения в состав новых компонентов, посредством установления биологического уровня исследуемых аминокислот методами встречных рядов и треугольника. Расчетные изотонические растворы: для лизина — 4,8% (А); для метионина — 3,9% (В); для бетаина — 4,4% (С).

Из 20 опытов по определению живучести в смесях по методу треугольника с интервалом 20% изотонических растворов указанных выше аминокислот установлено, что смеси изотонических растворов А, В и С наиболее благоприятны для живчиков быка в 12-й и 17-й пробирках (табл. 3).

2. Нуклеазная активность стандартной среды для замораживания семени быка с добавками

| Ингредиенты | Деградация контрольного образца ДНК, % |
|----------------------------------|--|
| Лактоза | 94 |
| Лактоза + холин 0,2 мл | 64 |
| Комплексонат меди | 50 |
| Комплексонат меди + холин 0,2 мл | 3 |
| Комплексонат меди + холин 0,1 мл | 20 |

3. Соотношение растворов А, В и С в пробирках с оптимальной живучестью

| Номер пробирки | А | В | С |
|----------------|----|----|----|
| 12 | 20 | 60 | 20 |
| 17 | 0 | 80 | 20 |

Итак, после разбавления семени быка средой, состоящей из лизина, метионина и бетаина при указанных в таблице соотношениях, сохраняется подвижность живчиков в пределах 50%, в остальных же 19 сочетаниях семя гибнет немедленно после разбавления.

Если считать пробирки 12-ю и 17-ю синтетическими средами, то их состав представлен в табл. 4.

4. Состав сред из аминокислот на 100 мл воды

| Ингредиенты | № 12 (г) | № 17 (г) |
|-------------|----------|----------|
| Лизин | 0,96 | — |
| Метионин | 2,34 | 3,12 |
| Бетаин | 0,88 | 0,88 |

Выявленные зоны биологического уровня на треугольнике с интервалом 20% позволили определить живучесть семени по схеме треугольника с интервалом 10%. Как показали исследования живучести в пробирках 12-й и 17-й по 10%-му треугольнику, биологические уровни изотонических растворов исследуемых аминокислот, по всей видимости, лежат в пределах от 0 до 10%.

Исходя из вышесказанного, были предприняты попытки смоделировать синтетическую среду на основе комплексоновой среды Л.С. Жильцовой (1986) за счет снижения уровня изотоничности (табл. 5).

Данные табл. 6 свидетельствуют, что создание изотонии среды за счет частичной замены комплексонов приводит к негативным результатам по подвижности семени после оттаи-

5. Соотношение уровня изотоничности среды комплексонатной с вариациями изотонических растворов А, В и С в пределах уровня от 10% и ниже

| Номер пробирки | Уровень изотонического раствора, % | | | | Подвижность | | |
|----------------|------------------------------------|-------|----------|---------|-------------|--------------|------------|
| | комплексонатная среда | лизин | метионин | бетанин | разбавление | эквilibрация | оттаивание |
| 1 | 80 | 3 | 10 | 7 | 0,6 | 0,6 | 0,2 |
| 2 | 80 | 2 | 10 | 8 | 0,6 | 0,6 | 0,25 |
| 3 | 90 | 2 | 4 | 4 | 0,6 | 0,6 | 0,25 |
| 4 | 90 | 1 | 5 | 4 | 0,6 | 0,6 | 0,25 |
| Контроль | 100 | 0 | 0 | 0 | 0,8 | 0,8 | 0,5 |

Примечание: Подвижность неразбавленного семени — 0,8.

вания в сравнении с контролем. В следующем опыте мы пытались смоделировать среду, исходя из объемных введений незначительного количества исследуемых аминокислот А, В и С.

Проведенные исследования дали возможность нам смоделировать синтетическую среду (новую), состоящую из комплексонатов, аминокислот и витаминов. Замораживание семе-

6. Живучесть семени быка при добавлении к комплексонатной среде разных уровней изотонических растворов аминокислот А, В и С

| Номер пробирки | Объемное соотношение в пробирках, мл | Активность, % | | | |
|----------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------|------------------|----------------------------|
| | | после разбавления | после эквilibрации | после оттаивания | после двух часов при 37 °С |
| 1 | 0,9К+0,1А | 80 | 80 | 40 | 20 |
| 2 | 0,9К+0,8В | 80 | 80 | 40 | 20 |
| 3 | 0,8К+0,1А+0,1В | 80 | 80 | 40 | 20 |
| 4 | 0,7К+0,1А+0,1В+0,1С | 70 | 80 | 40 | Еп |
| 5 | 0,85+0,05А+0,05В+0,05С | 80 | 80 | 50 | 30 |
| 6 | 0,8К+0,05А+0,1В+0,05С | 80 | 80 | 50 | 40 |
| 7 | 1,0К | 80 | 80 | 50 | 20 |

Примечание: После шести часов инкубирования оттаявшего семени только в 5-й и 6-й пробирках были подвижные живчики (Еп).

7. Качество семени быка, замороженного и оттаявшего в разных средах

| Номер среды | Подвижность после раз- бавления, % | Подвижность после оттаи- вания, % | Выживаемость, ч | Сохранность акросом, % |
|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|------------------------|
| 3 (лактоза+ комплексонаты) | 80 | 55—60 | 10,0 | 84,1 |
| 5 (сахароза+ комплексонаты) | 80 | 60 | 10,0 | 87,5 |
| 1 контрольная (лактоза) | 80 | 55—60 | 9,0 | 80,5 |

ни в разработанной среде имеет определенное преимущество перед стандартной лактозной средой по активности живчиков после оттаивания и особенно по скорости движения (большее число живчиков в дозе для осеменения с суперактивностью, а также по живучести оттаявшего семени при температуре тела). Живучесть семени больше в опытной среде на два часа по сравнению с контролем (лактозная среда).

Более высокая сохранность акромального чехлика живчиков после замораживания в новой среде также свидетельствует о более высоких протекторных свойствах новой среды.

Нами также разработаны для замораживания семени быка среды (табл. 7) на основе комплексонатной среды с добавлением сахаров (лактоза, сахароза).

Из данных табл. 7 видно, что лучшая подвижность, выживаемость и сохранность акросом после замораживания и оттаивания были в сахарозной среде с комплексонатами. В новой среде с аминокислотами заморожено 150 доз семени, а также 100 доз в среде № 5. Указанное семя использовалось в производственной проверке оплодотворяющей способности в хозяйствах Подольского района Московской области.

От первого осеменения спермой, замороженной в опытной среде, получена стельность 55%, в контроле — 45%, и хотя разница статистически не достоверна ($n=30$), полученные результаты вселяют надежду на перспективность избранного направления по совершенствованию технологии глубокого замораживания семени быка.