



УДК 636.3.082.453.5

ВИКОРИСТАННЯ БЕЗАЗОТНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ СПЕРМИ БАРАНІВ

Рецензенти: д.-тор б. наук, професор Бугров О.Д.; канд. с.-г. наук Сушко О.Б.

А.В. Безвесільна, Г.С. Тихона

Інститут тваринництва УААН

Проведені дослідження з впливу лактозо-жовткового, глюкозо-трис-хелатно-жовткового та глюкозо-натрій-калій-фосфорнокисло-жовткового середовищ, способів фасування та технологій збереження на якісні показники деконсервованої сперми баранів-плідників сокільської породи та полварс. Встановлено, що за фізико-хімічними показниками лактозо-жовткове середовище є оптимальним для розрідження сперми баранів. Показано, що використання азотної (мінус 196 °С) та безазотної (мінус 135 °С) технологій збереження сперми та різних видів її фасування не впливають на якісні показники деконсервованої сперми.

Ключові слова: барани-плідники, сперма, розріджувач, азотна та безазотна технологія.

Нині у вівчарстві є потреба у відновленні поголів'я овець. Вона зумовлена унікальними біологічними особливостями цього виду тварин: багатоплідність, відносно короткий інтервал відтворення генерацій, здатність у ранньому віці перетравлювати протеїн корму з високим вмістом клітковини [5]. Відновлення вівчарства та перетворення його у конкурентоспроможну галузь є необхідним етапом відродження сільського господарства. Один із шляхів інтенсифікації вівчарства – використання біотехнологічних методів, які забезпечують найбільш повну реалізацію генетичних ресурсів [1, 5]. Найбільш перспективним біотехнологічним методом для швидкого й якісного відтворення поголів'я овець є метод штучного осіменіння деконсервованою спермою баранів-плідників.

Визначну роль у збереженні запліднювальної здатності сперми при її заморожуванні та відтаванні відіграють синтетичні середовища, в особливості їх компоненти, які захищають тонкі структури спермій (мембрани та акросому) від несприятливих дій низьких температур. Складові середовища мають усувати несприятливі фізико-хімічні процеси, які відбуваються у спермі при заморожуванні та є основною причиною пошкодження гамет. Для запобігання кристалізації води та солей до середовища додають дисахариди, полісахариди та гліцерин, які сприяють її вітрифікації, що захищає статеві клітини від зіткнення з льодом. Додавання гліцерину до водних розчинів призводить до зниження температури, упорядковуючи структуру води кристалізації солей, крім цього гліцерин легко проникає всередину спермій, знижує осмотичний тиск розчинів, різко уповільнюючи процес кристалізації та сприяє зменшенню розмірів кристалів, які утворюються та знижують рівень кристалізації [3-4, 6].

Для заморожування та збереження сперми самців сільськогосподарських тварин використовують різні хладоагенти, частіше за все – рідкий азот. З кінця 70-х років минулого століття для практичної реалізації тривалого збереження сперми ссавців розроблені та впроваджені у виробництво методи заморожування і збереження їх у рідкому азоті, що відповідають біологічним, ветеринарним та технологічним вимогам.

З економічної точки зору використання рідкого азоту як хладоагенту для збереження сперми плідників пов'язано з великими витратами і технологічними



незручностями. У зв'язку з цим в останній час у результаті наукового пошуку для зниження витрат, запропоновано альтернативну безазотну технологію для кріоконсервації біологічного матеріалу безпосередньо в господарствах із використанням холодильних агрегатів, які працюють від електричної мережі [4, 6-7].

Для успішного використання цього методу на першому етапі потрібно відтворити та удосконалити технологічну базу для отримання та кріоконсервації сперми баранів.

Метою дослідження було встановлення впливу на спермії баранів багато- та малокомпонентних середовищ під час розбавлення та підготовки сперми до глибокого заморожування і подальшого збереження при температурі мінус 135 °С безазотної технології та при мінус 196 °С у рідкому азоті.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили в умовах фізіологічного двору ІТ УААН і на базі лабораторії трансплантації та кріоконсервації ембріонів. У досліджах були використані 5 баранів сокільської породи та полварс. Сперму від баранів одержували на штучну вагину один раз на тиждень триплетною садкою відповідно до інструкції [8].

Якісні показники сперми визначали за загальноприйнятими методиками.

Для розбавлення сперми підібрані середовища за такими рецептами [4]:

1. лактоза - 12,0; жовток курячого яйця - 6,0; дистильована вода - 100,0 (лактозо-жовткове середовище - ЛЖ);

2. глюкоза - 2,4; трис (оксиметил-амінометан) - 0,42; хелатон ЕДТА(Na)₂ - 1,76; жовток курячого яйця - 10,0; дистильована вода - 100,0 (глюкозо-трис-хелатон-жовткове середовище - ГТХЖ);

3. глюкоза - 3,2; натрій фосфатно-кислий - 2,08; калій фосфорнокислий - 0,08; жовток курячого яйця - 10,0; дистильована вода - 100,0 (глюкозо-натрій-калій-фосфорнокисле жовткове середовище - ГНКФЖ).

Після отримання сперми та оцінки її якості проводили розбавлення 1:1 одним із вищевказаних середовищ без гліцерину та інкубували протягом двох годин при температурі 2 - 4 °С, а потім розбавляли тими ж середовищами з додаванням гліцерину у співвідношенні 1:4 із наступною еквілібрацією протягом двох годин. Контролем було середовище без додавання гліцерину.

Далі сперма була заморожена за традиційними технологіями у необлицьованих, облицьованих гранулах та пайетах в об'ємі 0,2 мл із подальшим збереженням її при мінус 196 °С у рідкому азоті та в КНХ-135-20 (кріогенний банк) при температурі мінус 135 °С. Дослідження були проведені на розділених еякулятах. Відтавання замороженої сперми було проведено у 2,9 %-му розчині цитрату натрію тризамішеного п'ятиводневого на водяній бані за температури 38 °С. Після відтавання сперми була визначена активність й виживаність спермій при 38 °С.

Кожного разу визначали концентрацію водневих іонів (рН) середовищ за допомогою іономеру, а осмолярність вимірювали осмометром ОМ-КА-1ц-01.

Результати досліджень. У результаті проведених досліджень встановлено (табл. 1), що оптимальним середовищем є лактозо-жовткове середовище.

Як свідчать отриманні данні (див. табл. 1), що найбільш оптимальним за фізико-хімічними показниками є середовище на основі дисахариду – лактози (лактозо-жовткове ЛЖ). Його рН становила 6,56, а концентрація осмотично активних речовин – 339,5 мОсм/л, що є ізотонічним у відношенні спермій.

Середовища ГТХЖ і ГНКЖ були виготовлені на основі моносахариду - глюкози та сольових компонентів.

**1. Фізико-хімічні показники середовищ для розрідження сперми баранів-плідників**

Середовища	Концентрація водневих іонів (рН)	Концентрація осмотична активних речовин, мОсм/л		Депресія розчину (ΔT), - °C	
		без гліцерину	с гліцерином	без гліцерину	з гліцерином
ЛЖ	6,56	339,5	1440,5	0,630	2,676
ГТХЖ	6,5	321,8	1321,0	0,598	2,454
ГНКЖ	7,8	259,0	1316,0	0,481	2,445

Примітка. середовища: ЛЖ – лактозо-жовткове; ГТХЖ - глюкозо-трис-хелатоно-жовткове; ГНКЖ - глюкозо-натрій-калій-фосфорнокисло-жовткове

Концентрація водневих іонів (рН) у цих середовищах становила – 6,5 та 7,8; осмомолярність 321,8 та 259,0 мОсм/л, що є гіпотонічним для спермійв. При цьому спостерігали різке зниження кількості активних спермійв, а також деформованих спермійв з рухом хвостом вперед та «манежним рухом». Для зниження рН до 6,45 у ГНКЖ середовище була внесена лимонна кислота у кількості 32 мг, що вплинуло на концентрацію осмотичних речовин середовища, яка досягала 259,0 мОсм/л.

Осмомолярність та депресія розчину (ΔT) – точка замерзання його, залежить від відсотка в ньому гліцерину і становить: у контролі без гліцерину 339,5; 321,8; 259,0 мОсм/л та 0,630; 0,598, 0,481 °C; із гліцерину 1440,5; 1321,0; 1316,0 мОсм/л та 2,676; 2,454; 2,445 °C, відповідно.

За даними наведеними в табл. 2 встановлено, що рухливість спермійв у свіжорозрідженій спермі вищевказаними середовищами дорівнювала 9,0 балів, виживаність (t) – у межах від 11,0 $\pm$ 3,2 до 11,5 $\pm$ 0,5 години; абсолютна виживаність (Sa) при температурі +38 °C – від 47,5 $\pm$ 2,2 до 56,6 $\pm$ 2,01 ум.од. При цьому показники абсолютної виживаності спермійв у спермі, розрідженою ЛЖ середовищем, були нижчими на 9 ум.од, ніж у ГТХЖ, ГНКЖ середовищах, різниця достовірна (p<0,5). Після деконсервації сперми показники якості сперми, яка була розріджена ГТХЖ та ГНКЖ середовищами, були вірогідно нижчими за аналогічні якісні показники сперми у ЛЖ середовищі (p<0,01).

2. Якісні показники сперми баранів-плідників, розрідженої середовищами до і після заморожування (M $\pm$ m, n= 32)

Середовище для розрідження сперми	Рухливість, балів	Виживаність, год	Абсолютна виживаність, ум. од
	Свіжорозріджена сперма		
ЛЖ	9,0±0,0	11,5±0,5	47,5±2,2
ГТХЖ	9,0±0,0	11,1±0,6	56,6±2,01
ГНКЖ	9,0±0,0	11,0±3,2	55,5±1,5
	Деконсервована сперма		
ЛЖ	4,6±0,3	7,5±0,3	15,6±1,7
ГТХЖ	1,4±0,2	2,4±0,1	1,3±0,2
ГНКЖ	1,2±0,1	2,0±0,1	0,5±0,2

Якісні показники сперми баранів-плідників при розрідженні випробуваними середовищами перед заморожуванням були однаковими і вірогідної різниці між ними не було (p>0,5).



У деконсервованій спермі баранів-плідників, яка була розріджена ГТХЖ, ГНКЖ середовищами, при мікроскопії спостерігали спермії з маневним рухом, зігнутими, або звернутими у петлю хвостами, що свідчило про гіпотонічність цих середовищ і їх негативний вплив на життєздатність гамет.

Таким чином, випробувані середовища мали однаковий вплив на якісні показники сперми баранів-плідників при її розбавленні перед заморожуванням. Однак, у деконсервованій спермі баранів-плідників ці показники були вищими у ЛЖ середовищі в порівнянні з ГТХЖ, ГНКЖ середовищами, що свідчить про її ізотонічність до сперміїв. Тому для зберігання сперми у замороженому стані ми використовували ЛЖ середовище.

Збереження розрідженої сперми, розфасованої в облицьовані й необлицьовані гранули та пайети, у холодильній камері КНХ-135-20 при температурі – 135 °С та рідкому азоті при температурі – 196 °С не впливає на якісні показники сперми баранів (табл. 3).

3. Якісні показники сперми баранів-плідників при різних технологіях кріоконсервації ($M \pm m$, $n = 32$)

Технологічні упаковки	Якісні показники сперми після деконсервації		
	рухливість, балів	виживаність, год	абсолютний показник виживаності (S_a), ум. од
При – 135 °С в КНХ (дослід)			
Необлицьовані гранули	5,4 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 1,1
Облицьовані гранули	4,9 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,8	20,2 $\pm$ 2,1
Пайети	4,8 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,3	21,2 $\pm$ 1,4
При – 196 °С в рідкому азоті (контроль)			
Необлицьовані гранули	5,4 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 1,3
Облицьовані гранули	4,4 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 1,1
Пайети	4,8 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 1,1	20,3 $\pm$ 1,6

Аналізуючи одержані результати (див. табл. 3) встановлено, що виживаність сперміїв у деконсервованій спермі із необлицьованих, облицьованих гранул та пайет як в КНХ, так і в рідкому азоті була (t) 8,1 $\pm$ 0,3 і 7,3 $\pm$ 0,2; 7,8 $\pm$ 0,3 і 8,1 $\pm$ 0,3; 8,1 $\pm$ 1,1 і 7,8 $\pm$ 0,3 год, абсолютна виживаність (S_a) при температурі 38 °С 19,1 $\pm$ 1,3 і 17,2 $\pm$ 1,1; 18,4 $\pm$ 1,1 і 20,0 $\pm$ 2,1; 20,3 $\pm$ 1,6 ум.од; після деконсервації сперми – 5,4 $\pm$ 0,1 і 5,4 $\pm$ 0,1; 4,4 $\pm$ 0,3 і 4,9 $\pm$ 0,2; 4,8 $\pm$ 0,2 і 4,8 $\pm$ 0,4 бала. Різниця між показниками не вірогідна ($p > 0,5$).

Висновки:

1. Випробувані середовища мали однаковий вплив на якісні показники сперми баранів-плідників при її розбавленні перед заморожуванням, але після деконсервації ці показники були вищі у спермі, яка була розріджена лактозо-жовтковим середовищем.

2. Із проведених досліджень встановлено, що форма упаковки на якісні показники заморожено-відталої сперми не впливає.

3. Якісні показники сперми баранів-плідників при зберіганні у рідкому азоті та холодильній камері КНХ-135 - 20 не мають достовірної різниці.

Бібліографічний список

1. Достижения в кріоконсервировании спермы баранов / Аванов Н.Я. / Зоотехния. - № 2. – 1990. – С.63-65.



2. Среды для разбавления и хранения спермы с/х животных /Балашов Н.Г., Евсюков М.Е. – Москва: МСХ СССР (Главное управление животноводства), 1977.
3. Бугров А.Д. Разработка теории и практики криоконсервации спермы быков-производителей : автореф. дис. на соиск. ученой степени д-ра биол. наук : 03.00.13 /А.Д.Бугров.- Харьков. – 1983. – 40 с.
- 4.Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Осташко Ф.И – К.: Урожай, 1978. – 225 с.
5. Розвиток вівчарства на півдні України /Рябко В.М.// Вісник аграрної науки.- 2002.- № 4.- С. 39-41.
6. Пути снижения экономических затрат при длительном хранении спермы быков-производителей в замороженном состоянии /Сивопляс В.В //Розведення і генетика тварин / Міжвід. тематич. наук. зб. – К.: Аграрна наука, 2001. - № 34. – С. 60-65.
7. Криоконсервация спермы быков-производителей безазотным методом. /А.В. Соклакова, А.Б. Сушко, Ф.И Осташко [и др.] //НТБ, № 96 /ИЖ УААН. – 2008. - С. 379-382.
8. Інструкція зі штучного осіменіння овець та кіз / Відпов. за вип. Ю.Ф. Мельник. – К.: Аграрна наука, 2003. – 39 с.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЗАЗОТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИЕ СПЕРМЫ БАРАНОВ

Безвесильная А.В., Тихона Г.С., Институт животноводства УААН

Проведены исследования по изучению влияния лактозо-желточной, глюкозо-рис-хелатоно-желточной, глюкозо-натрий-калий-фосфорно-кисло-желточной среды, способов фасовки и технологии хранения на качественные показатели деконсервированной спермы баранов-производителей сокольской породы и полварс. Установлено, что по физико-химическим показателям лактозо-желточная среда оптимальна для разбавления спермы баранов. Показано, что использование азотной (минус 196 °С) и безазотной (минус 135 °С) технологий хранения спермы и разных видов ее фасовки не влияют на качественные показатели деконсервированной спермы.

Ключевые слова: бараны-производители, сперма, разбавитель, азотная и безазотная технология.

NITROGEN-FREE TECHNOLOGY USE DURING THE RAM SEMEN FREEZING

Bezvesilnaya A., Tykhona G.; Institute of animal science, UAAS

This article highlights the experimental research results of egg medium pack technique, storage impact on qualitative character of thawed breeding ram semen. The rams belong to Sokalskaya and Polwarth breeds. The egg medium includes lactose, glucose, Na, K,P, tris-chelate- acidic substances. Physical and chemical characteristics of lactose-based egg medium proved to be optimal for the ram semen dilution. Nitrogen (-196°C) and nitrogen-free (-135°C) semen storage and package techniques observed to affect thawed semen quality characteristics.

Key words: breeding rams, semen, dilution, substance, nitrogen and nitrogen-free techniques.