

ХАРКІВСЬКИЙ ЕКСПЕДИЦІЙНО–СТАЦІОНАРНИЙ МЕТОД КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ ЖЕРЕБЦІВ

О.Б.Сушко

Інститут тваринництва УААН

Запропоновано оригінальний метод та обладнання для кріоконсервації сперми жеребців у формі шприц-тюбів. Проведено порівняльні випробування та визначено якісні показники деконсервованої сперми при використанні різних технологічних форм. Застосування розробленого методу кріоконсервації у вигляді шприц-тюбів забезпечує рухливість спермій на рівні 3,6 балів, 50 % виживаність спермій після відтавання.

Ключові слова: жеребці, кріоконсервація, кріобанк, заморожувач, шприц-тюба, пайста, сперма, рухливість

Характерною особливістю розвитку племінної справи в конярстві України є відносно невеликий рівень впровадження та застосування сучасних біотехнологічних методів відтворення тварин даного виду. Це особливо сильно відчувається в порівнянні з застосуванням біотехнологічних прийомів розмноження в інших галузях тваринництва. Насамперед це стосується створення і використання в племінній справі кріобанків спермопродукції жеребців. Проте заготівля та тривале зберігання при низьких температурах сперми, значно розширює можливості селекціонерів за рахунок отримання більшої кількості нащадків від видатних плідників, ранньої перевірки репродуктивних здатностей жеребця, накопичення цінного генетичного матеріалу в період найкращого фізіологічного стану в житті тварини. Певною мірою низький рівень застосування методів кріоконсервації сперми і штучного осіменіння коней, пов'язаний з технологічним фактором. Цінні в племінному відношенні плідники розміщені по різних кінних заводах і заготівля від них генетичного матеріалу централізованим методом у стаціонарних умовах пов'язана зі значними економічними витратами, стресами при транспортуванні та необхідністю адаптації тварин до нових умов утримання. Тому одним із можливих механізмів, що буде сприяти більш широкому впровадженню кріоконсервації сперми жеребців і використання її для штучного осіменіння, є впровадження експедиційної або експедиційно-стаціонарної моделі заготівлі даного виду племінного матеріалу. Найважливішим при цьому є розробка відповідних методів і обладнання, що дозволять реалізовувати такі технологічні моделі.

Відоме обладнання для заморожування сперми жеребців у камерах з активною подачею холодного газоподібного азоту. Сперма, розфасована у пайети (полімерні трубки), розміщується на спеціальних штативах у середині камер, куди періодично вприскується порція парів азоту. Недоліком такого технологічного підходу є необхідність постійного автоматичного контролю температури в камері для заморожування, потреба її періодичного підтримання шляхом порційної подачі носія холоду та постійна примусова конвенція парів азоту для їх рівномірного розподілу між спермодозами [1].

Відомі пристрої для заморожування сперми безпосередньо у порожнині посудини Д'юара в парах над поверхнею зрідженого азоту. Один із таких пристроїв здобув широке використання при кріоконсервації сперми жеребців

розфасованої в алюмінієві пакети (плоскі алюмінієві труби) [2]. Пристрій складається з пінопластового поплавка, утримувача (металевого сита), металевого кільця-випарювача та посудини Д'юара зі зрідженим азотом. Алюмінієві пакети зі спермою розміщують на металевому ситі, яке, у свою чергу, розташоване на пінопластовому поплавку. Поплавок з металевим ситом і розфасованою у пакети спермою переносять на поверхню зрідженого азоту. Кільце-випарювач занурюють у зріджений азот для збільшення інтенсивності випарювання останнього. Після цього закривають посудину Д'юара кришкою. Для заморожування використовують посудини Д'юара 50-, 30-, 20-літрового об'єму. Конструкція дає змогу автоматично підтримувати сперму у парах на відстані 20 мм від поверхні зрідженого азоту незалежно від його рівня у посудині. Час витримки сперми у парах азоту складає не менше 5 хвилин, після чого сперму переносять до кріосховища безпосередньо у зріджений азот для зберігання. Достоїнством пристрою є простота застосування. Проте для реалізації методу необхідно мати кріогенні посудини достатньо великого об'єму, що потребує значних витрат зрідженого азоту і може створювати додаткові складнощі при експедиційному характері виконання робіт.

Завдяки розробленій технології заморожування в алюмінієвих пакетах (алюмінієвих трубах) з об'ємом 20-25 мл створено достатньо великий кріобанк сперми жеребців орловської, руської та інших порід. Однак, як відмічають самі оригінатори технології (Всеросійський науково-дослідний інститут конярства) суттєвим недоліком методу є технологічні незручності, пов'язані зі зберіганням спермодоз у формі алюмінієвих пакетів у кріосховищах племпідприємств та особливо у посудинах Д'юара невеликого об'єму на пунктах штучного осіменіння [3].

Дослідно-конструкторська робота, що була проведена нами протягом 2003-2006 років була спрямована на створення методу та дослідно-промислових зразків портативного заморожувача і впровадження методу кріоконсервації сперми жеребців, який можна застосовувати як в стаціонарних, так і експедиційних умовах.

Матеріали та методи досліджень. Дослідні зразки пристроїв для заморожування були виготовлені в біотехнологічному центрі Інституту тваринництва УААН із застосуванням методів дослідно-конструкторського моделювання. Випробування зразків розробленого обладнання здійснювали в лабораторних та виробничих умовах (Харківський та Лозівський кінні заводи) на спермі жеребців верхових порід. При проведенні експериментів застосовували метод розділеного еякуляту. Отримання сперми та видалення секретів (гелю) здійснювали за допомогою розробленого нами обладнання, методом фільтрації безпосередньо у штучній вагіні [4]. Концентрування (згущення) сперми здійснювали шляхом центрифугування при $g=500$ з додаванням до сперми 10 % розріджувача від об'єму еякуляту. Після видалення плазми сперму розбавляли лактозо-хелато-цитратно-жовточним середовищем. Концентрацію спермій виводили до рівня 100 млн/мл. Відтавання спермодоз здійснювали при $T = + 38^{\circ} \text{C}$. Інкубацію сперми після деконсервації проводили при $T = + 37^{\circ} \text{C}$. Визначення рухливості здійснювалося з інтервалом 30 хвилин до припинення сперміями прямолінійно-поступального руху.

Результати досліджень. Запропоновано та випробувано як герметичний контейнер спермодози компактизовані шприц-туби. Шприц-туба є модифікованим полімерним шприцом об'ємом 5 мл, герметично закритим спеціальним кульковим корком (рис.1).

Установка, що була випробувана і пропонується, складається з термоблока із системою вимірювання температури, які змонтовані на 3-літровій посудині Д'юара (рис.2).

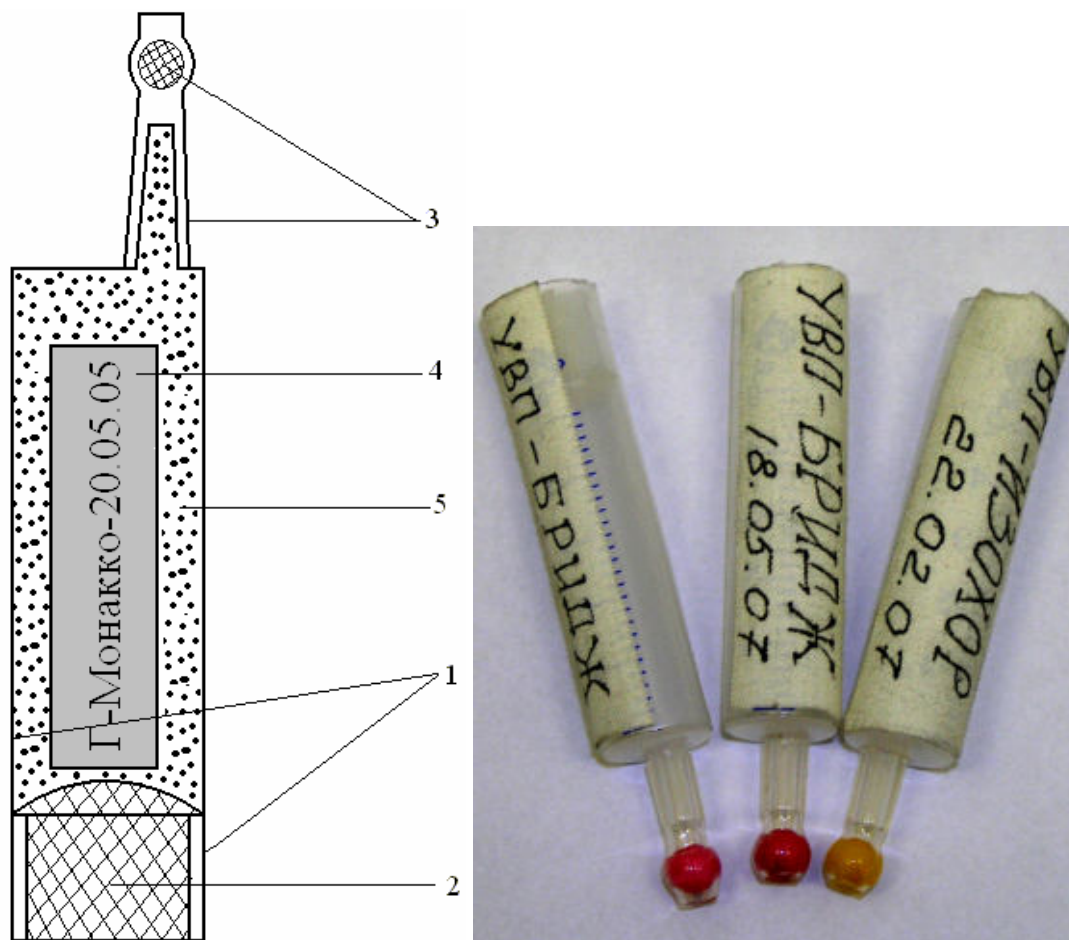


Рис.1. Шприц-тюба компактизована для кріоконсервації сперми жеребця (схема конструкції та загальний вигляд контейнерів):

1 - циліндр; 2 - поршень; 3 - кульковий корок; 4 – маркувальна стрічка; 5-сперма.

Термоблок включає три камери (1) для розміщення шприц-тюб (2). У центрі кожної камери коаксіально розташовані трубки (3), через канал яких забезпечується фонтанна подача розпиленого азоту на початку процесу заморожування. Камери термоблоку змонтовані у термоізоляційній пробці (4), яка забезпечує занурення їх у порожнину посудини Д'юара (5) на певну глибину. Шприц-тюби зі спермою жеребця (спермодози) розташовані на дні камер по периферії у вертикальному положенні. Таким чином, спермодози при заморожуванні знаходяться між стінкою камери і стінкою трубки. Для розміщення їх на дні камери та видалення звідти в порожнині камер встановлені підйомники (6), на ручки яких насаджено кришки (7) для закриття камер. Контроль температури здійснюється за допомогою та електронного приладу з рідкокристалічним екраном (8) термопари (9). Прилад фіксується на стійці (10).

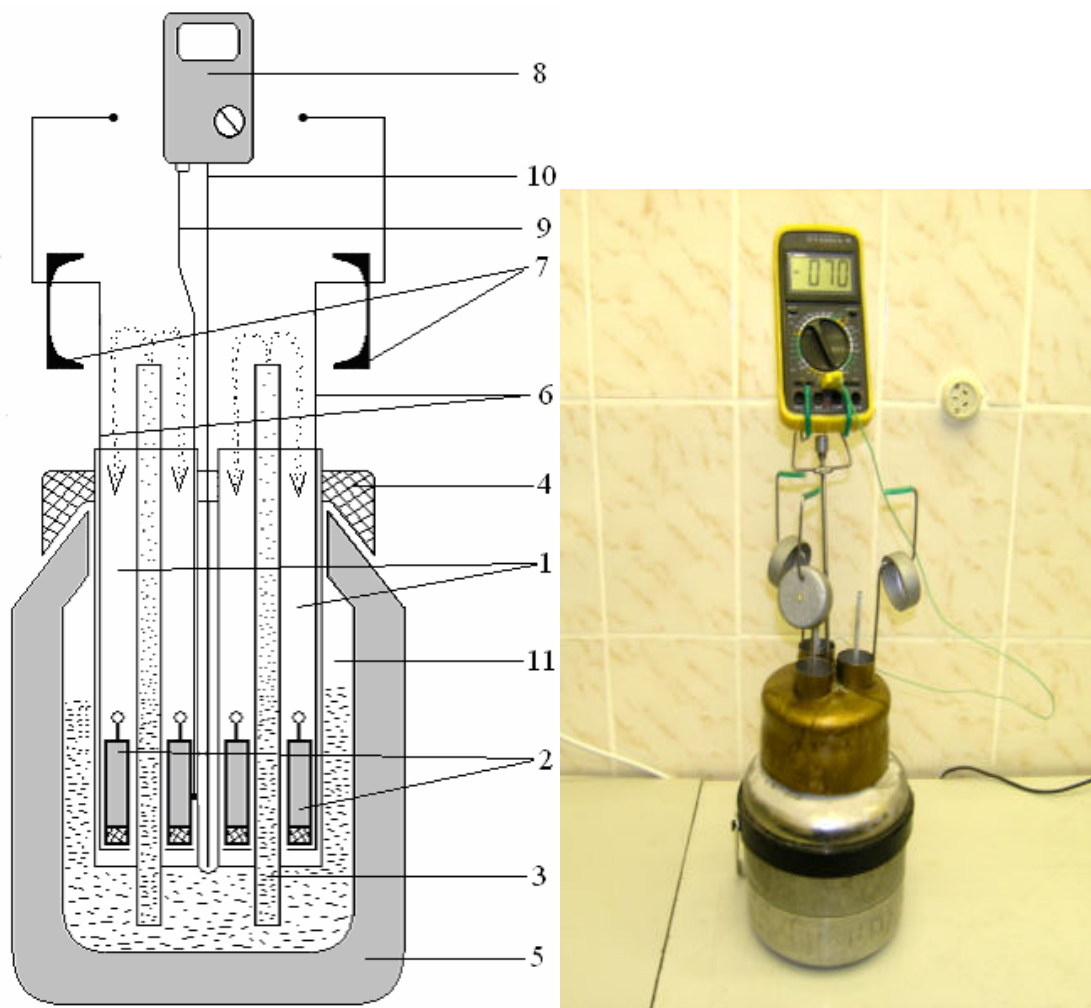


**Рис.2. Установка для заморожування сперми жеребців-плідників
(схема конструкції і загальний вигляд):**

1 - камера; 2 - шприц-тюба; 3 - трубка викиду розпиленого азоту; 4 - термоізоляційний корок; 5 - посудина Д'юара; 6 - підйомник, 7 - кришка камери; 8 - прилад для контролю температури; 9 - термопара; 10 - стійка; 11 - азот рідкий.

Безпосередньо робота з приладом складається з наступних операцій. Посудину Д'юара заливають на 2/3 об'єму рідким азотом. Термоблок охолоджується до температури $+2...+4^{\circ}\text{C}$. Після чого, використовуючи підйомники, у нижню частину камер закладають спермодози. Термоблок зі спермодозами вносять у порожнину посудини Д'юара та занурюють у зріджений азот. Завдяки різниці температури певна кількість азоту в дрібнорозпиленому стані фонтанно викидається через канали трубок у середину камер та попадає безпосередньо на зовнішню оболонку шприц-тюб. По закінченню викиду азоту, через 2-2,5 хвилини, камери закривають кришками. Після цього доступ холоду до спермодоз (теплообмін) забезпечується із периферії через стінки камери та із центру через стінки трубки.

Процес заморожування до температури мінус 70°C триває 15 хвилин. Після 15-25 хвилин шприц-тюби із замороженою спермою виймають за допомогою підйомників та переносять у рідкий азот.

Динаміка зниження температури сперми в шприц-тюбі при даному способі заморожування така. До температури мінус 10 °С - у повільному режимі 2,0 °С/хв. (що забезпечує поступовий процес дегідратації та попереджає внутрішньоклітинну кристалізацію). Від температури мінус 10 °С до мінус 70 °С заморожування відбувається у прискореному режимі 7,0-10,0 °С/хв.

Особливості процедури заморожування (зрошування оболонки сперматозоїдів дрібно розпиленним азотом та пряме внесення термоблоку в зріджений азот) викликані кількома обставинами. По-перше, полімерні стінки шприц-тюби мають значно більшу товщину та низьку теплопровідність, у порівнянні з іншими упаковками – алюмінієвими тубами або пайетами. По-друге, в одному контейнері (шприц-тюбі) заморожується достатньо великий об'єм сперми (наприклад, у порівнянні з пайетами в 10-20 разів більший). По-третє сперма заморожується достатньо товстим шаром (Ø12 мм). При цьому така процедура забезпечує рівномірний характер доступу холоду та нівелює різноякісність сперми як між сперматозоїдами, так і в межах одного контейнера.

Проведено порівняльні випробування запропонованого способу з використанням шприц-тюб та інших (традиційних) технологічних форм. Так, нами випробувані французькі пайети (IMV) об'ємом 0,5 мл (найбільш розповсюджена технологія), пайети об'ємом 0,25 мл, облицьовані гранули об'ємом 0,5 і 0,25мл (Харківська технологія). Випробувано також заморожування сперми жеребця у відкритих гранулах об'ємом 0,25мл на фторопласті (табл. 1).

1. Якісні показники кріоконсервованої сперми жеребців при використанні різних технологічних форм (n=8 еякулятів)*

Технологічна форма (тип контейнера)	Рухливість спермій, бали	Вживаність спермій при t=37 °С, год	Показник абсолютної вживаності, ум. од
Шприц-тюба (запропонована технологічна форма) V=5мл	3,38±0,18	3,38±0,48	9,03±1,26
Пайета V=0,5мл	3,38±0,18	3,38±0,48	8,38±0,95
Пайета V=0,25мл	3,25±0,19	2,81±0,28	8,16±0,87
Облицьована гранула V=0,5мл	3,25±0,19	2,81±0,28	8,81±0,92
Облицьована гранула V=0,25мл	3,25±0,19	2,81±0,28	8,78±0,95
Відкрита гранула V=0,25мл	3,25±0,19	2,56±0,24	7,22±0,98

Примітка: *p > 0,1.

Вивчення якості сперми жеребців після заморожування та деконсервації показало приблизно рівні результати в усіх групах як за рухливістю, так і за часом виживання, незалежно від типу контейнера. Таким чином, якість сперми жеребців замороженої в запропонованій технологічній формі - шприц-тюбах не поступалася відповідним показникам для пайет і облицьованих гранул. Дещо нижчі характеристики відмічені при застосуванні відкритих гранул.

Водночас, несумнівною перевагою запропонованого способу є можливість швидкої герметизації та маркування спермопродукції жеребців без застосування спеціального обладнання, що дає змогу використовувати метод як елемент

експедиційної моделі заготівлі племінного матеріалу. Крім того, для утворення однієї спермодози (тобто дози сперми, необхідної для одного осіменіння кобили) у „пайетних” технологіях та технологіях дрібної грануляції необхідне об’єднання багатьох пайет, що потребує додаткових санітарних заходів для належного здійснення процедури інсемінації. При використанні запропонованого нами методу одна шприц-тюба з концентрованою спермою є однією спермодозою і може герметично стикуватися з інструментом для штучного осіменіння.

Виробниче випробування розробленого обладнання і способу, якому присвоєна робоча назва „Харківський експедиційно-стаціонарний метод отримання і кріоконсервації сперми жеребців (ХЕСМ)” проводилися в умовах Харківського кінного заводу на 5 жеребцях української верхової породи. При цьому середня рухливість спермійів після деконсервації спермодоз складала 3,6 бала, виживаність при $T=37^{\circ}\text{C}$ дорівнювала 2,9 години, показник абсолютної виживаності склав 8,5 умов.од., збереженість статевих клітин після глибокого заморожування (кріорезистентність) - 58,5 %. Слід відмітити, що мінімальний рівень відбору еякулятів для кріоконсервації за показником рухливості нативної сперми складав 5 балів. Зважаючи на відносно добру збереженість спермійів після глибокого заморожування, можна припустити, що підвищення мінімальних вимог до нативної сперми на 2-3 бали, тобто до рівня 7 балів, буде супроводжуватись суттєвим поліпшенням якості кріоконсервованого біоматеріалу.

Розробка захищена патентами України №25286 „Контейнер для кріозберігання і використання сперми жеребця” та №25823 „Пристрій для кріоконсервації сперми жеребців”.

Висновки:

1. Запропонований метод кріоконсервації сперми жеребця в формі шприц-тюб забезпечує рухливість спермійів на рівні 3,6 бала (36% спермійів із прямолінійно-поступальним рухом) та збереженість статевих клітин після заморожування на рівні не менше 50 %.

2. Розроблене портативне обладнання для кріоконсервації сперми жеребців може використовуватись як при стаціонарній, так і при експедиційній моделі заготівлі племінного матеріалу.

3. Використання спермодоз збільшеного об’єму в формі шприц-тюб, не поступається пайетам і гранулам за якісними показниками деконсервованої сперми (рухливість, виживаність, показник абсолютної виживаності).

Бібліографічний список

1. Mottershed J. Frozen semen preperation and use – [www. equine-reproduction. com/articles/frozen semen 2. htm](http://www.equine-reproduction.com/articles/frozen%20semen%20.htm)
2. Рекомендации по замораживанию и длительному хранению в жидком азоте спермы жеребцов-производителей – Москва: Колос, 1978.
3. Науменкова В.А., Васильев О.В. Различные подходы к решению проблемы искусственного осеменения кобыл замороженным семенем: Сб. докладов научно-производственной конференции и координационного совещ., посвященного 100-летию со дня Скаткина П.Н., Дивово, 2004.-С.21-23.
4. Сушко О. Нові технологічні засоби для отримання та кріоконсервації сперми жеребців-плідників // Тваринництво України. – 2003. - №4. - С.16-19.

ХАРЬКОВСКИЙ ЭКСПЕДИЦИОННО–СТАЦИОНАРНЫЙ МЕТОД КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ

А.Б. Сушко, ИЖ УААН

Предложен оригинальный метод и оборудование для криоконсервации спермы жеребцов в форме шприц-тюб. Проведены сравнительные испытания и определены качественные показатели деконсервированной спермы при использовании разных технологических форм. Использование разработанного метода криоконсервации в форме шприц-тюб обеспечивает подвижность спермиев на уровне 3,6 балла, 50 % выживаемости спермиев после размораживания.

Ключевые слова: жеребцы, криоконсервация, криобанк, замораживатель, шприц-тюба, пайета, сперма, подвижность.

KHARKIV FREEZING PRESERVATION TECHNIQUE OF THE STALLION SEMEN BY THE SYRINGE TUBE APPLICATION

O. Sushko , the Institute of animal science, UAAS

This article highlights the experimental research results on the syringe tubes application by freezing preservation of the stallion semen. The equipment for freezing preservation was elaborated. The comparative analysis of the semen was fulfilled. & qualitative characteristics of the sperm were defined by the various techniques use. Qualitative characteristics were identified by thaw. The new elaborated method application of freezing preservation procures motility & sperm survival rate boost. Motility rate equals 3,6 degree & survival rate amounts 50% after thaw respectively.

Key words: stallions, freezing preservation, refrigerated tank, chiller, syringe tube, inseminating tube, sperm, motility.

УДК: 575.222.75:591.3

СОХРАНЕНИЕ ЗАРОДЫШЕВОЙ ПЛАЗМЫ ПТИЦ

М.Т.Тагиров, А.В.Терещенко

Институт птицеводства УААН

Дан анализ современного состояния проблемы сохранения зародышевой плазмы птиц. Рассмотрены такие объекты, как бластодермальные клетки, эмбриональные стволовые клетки и первичные зародышевые клетки с точки зрения их использования в качестве материала для криоконсервации. Дана оценка методам использования химерных посредников для реализации генетического потенциала сохраняемого материала, выделены преимущества и недостатки данных методов, намечены основные направления их дальнейшего усовершенствования.

Ключевые слова: первичные зародышевые клетки, химеры, генетические ресурсы, криоконсервация, культивирование клеток.

Не вызывает сомнения тот факт, что наилучший способ сохранения генетических ресурсов птиц – это создание коллекционных стад, где не только тщательно следят за определенными генетически закрепленными признаками, но и сама птица имеет возможность приспосабливаться к меняющимся кормовым и технологическим условиям. К сожалению, в последние годы во всем мире наблюдается тенденция сокращения финансирования и государственной