



THE LOACH EMBRYO SURVIVAL RATE ON THE VARIOUS DEVELOPMENTAL STAGES AFTER IN-VITRO MEDIUM INCUBATION

Mixon K.; Institute of freezing biology & medicine affiliated to the national academy of sciences of Ukraine, Kharkiv

This article highlights the experimental research results on the loach embryo survival rate during the various developmental stages after in-vitro medium incubation. The loach embryo survival test was executed during the 5 developmental stages after in-vitro medium treatment. The procedure lasted 30 minutes. The in-vitro medium was composed by 30% cane sugar, 10% methanol & 2% PEO-3000. The 23 developmental stage proved to be the most chemically resistant to the in-vitro medium. The 33 developmental stage proved to be non-resistant to the freezing protectors. The new in-vitro embryo freezing preservation techniques were elaborated. The test data on the fish embryos were registered.

Key words: embryo, in-vitro freezing preservation, frozen embryo preservation data, loach, fish, freezing protector.

УДК 636.2.082.453.5

ВЛИЯНИЕ СОРБЕНТОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СПЕРМЫ БЫКОВ, ЗАМОРОЖЕННОЙ ПО РАЗНЫМ ТЕХНОЛОГИЯМ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Рецензенты: доктор биол. наук, академик УААН Осташко Ф.И.; канд. с.-х. наук Шигимага В.А.

А.В. Соклакова, А.Б. Сушко, М.С. Савельева

Институт животноводства УААН

М.Е. Романько

Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН

Показаны результаты исследований введения в ингредиентный состав разбавителей сорбентов: атокса и сорбовера в концентрации 0,06%, позволяющие вдвое сократить адаптационно-эквilibрационный период при использовании существующих технологий криоконсервации спермы быков. Исползованные препараты ингибируют развитие во времени интенсивности окислительных процессов, происходящих в фосфолипидах мембран спермиев и разбавителя и повышают устойчивость мембранного аппарата половых клеток к негативному воздействию температурных градиентов, возникающих при крио- и деконсервации спермиев. Присутствие сорбентов в разбавленной сперме позволяет повысить биологическую полноценность спермы после ее замораживания, характеризующееся увеличением показателей качества оплодотворяющей способности.

Ключевые слова: сперма, быки-производители, сорбенты, разбавитель, деконсервация, выживаемость, активность.

Одним из методов крупномасштабного создания и пополнения криобанка элитных пород крупного рогатого скота является метод глубокого (до -196 °C) замораживания спермы быков-производителей, характеризующийся высокой эффективностью и широким внедрением в практику животноводства многих стран. Однако, несмотря на удачные технологические решения, существенным недостатком его является значительное снижение количества полноценных спермиев после их деконсервации. В настоящее время, при использовании всех существующих технологий криоконсервации спермы потери спермопродукции

под влиянием процессов замораживания – оттаивания составляют 40-60 % [1, 3] вследствие возникновения аномалий мембранных структур половых клеток, что приводит к нарушению функциональной полноценности и снижению оплодотворяющей способности спермы. Одним из факторов, обуславливающих низкую сохранность этого ценного генетического материала, является образование в нем в процессе крио- и деконсервации токсического комплекса продуктов перекисного окисления липидов (перекисей различного происхождения, атомарного кислорода, водорода), губительно действующих на половые клетки, отрицательно влияя на их метаболизм, а со временем и на их оплодотворяющую способность [2]. Не исключено, что возникновение и развитие в динамике этих отрицательных процессов начинается и имеет место уже в начальном, адаптационно-эквilibрационном периоде технологического процесса подготовки спермы к криоконсервации, усиливаясь со временем. Одним из методов решения этой проблемы, на наш взгляд, является усовершенствование ингредиентного состава разбавителей благодаря введению в их состав препаратов - сорбентов антиоксидантного действия, способных нормализовать метаболические процессы, повышая стойкость клеток к негативным физико-химическим факторам, возникающим при их крио- и деконсервации.

Материалы и методы исследований. В исследованиях была использована сперма быков украинской красно-пестрой и черно-пестрой голштинской пород, полученная на искусственную вагину, на базе экспериментально-методическом племпредприятии института Животноводства УААН. После получения, визуальной и микроскопической оценок сперма была разбавлена средами, соответствующими действующим технологиям замораживания (Харьковская, Французская, Японская) [1, 4]. Концентрация спермы в каждой технологической упаковке составляла 15 млн/мл. В качестве антиоксидантов были использованы в концентрации 0,06% сорбенты: «Атокс» (действующее вещество – аэросил А-300) и «Сорбовер» (действующее вещество – вермикулит пористый). Расфасовка спермы проводилась в различные технологические упаковки (облицованные гранулы, пайеты и необлицованные гранулы) согласно рекомендации соответствующих технологий криоконсервации спермы. Адаптационно-эквilibрационный период для разбавленной спермы в опыте и контроле составлял 0, 1, 2, 3, 4 часа (n=75). Контрольными образцами была сперма, не содержащая опытных сорбентов. Качественные показатели деконсервированной спермы определяли согласно действующих методических рекомендаций. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов вариационной статистики [5]. Все опыты были проведены на разделенных эякулятах. Оплодотворяемость коров в группах-аналогах определяли по результатам оплодотворения животных после первого осеменения спермой опытной или контрольной групп.

Результаты исследований. Анализируя уровень качественных показателей замороженно-оттаяной спермы с содержанием сорбентов (табл.), следует отметить положительное действие сорбентов в опытных образцах на сохранность спермиев после действия на них высоких температурных градиентов, возникающих при крио- (0,32 °C /с) и деконсервации (15,6 °C /с) спермы. Уровень показателей качества, характеризующих жизнеспособность спермиев во

**Качественные показатели спермы, содержащей сорбенты, замороженной по различным технологиям при разной
длительности адаптационно-эквilibрационного периода**

Длительность адаптационно- эквilibрационного периода, час	«Атокс»			«Сорбовер»			Контрольные образцы (без сорбентов)		
	активность, (баллы)	показатель абсолютной выживаемости (Sa) усл. ед	выживаемость (часы)	активность, (баллы)	показатель абсолютной выживаемости (Sa) усл. ед	выживаемость, (часы)	активность, (баллы)	показатель абсолютной выжи- ваемости (Sa) усл. ед	выживаемость (часы)
Пайеты (Французская технология) n=25									
0	1,8±0,3	3,2±1,1	2,6±1,0	2,1±0,5	3,3±1,1	2,7±0,5	1,3±0,5	1,7±0,5	2,0±0,5
1	2,7±0,2	4,8±1,5	3,0±0,5	2,7±0,4	5,7±1,2	3,7±0,3	2,5±0,5	5,2±1,1	2,8±0,4
2	4,8±0,2	29,2±1,7	9,3±0,3	4,8±0,3	32,5±1,4	10,4±1,1	4,5±0,4	23,2±1,8	8,5±0,5
3	4,3±0,2	23,3±1,8	8,2±0,5	4,5±0,2	23,3±1,2	8,3±0,7	4,2±0,2	20,7±0,8	7,6±0,6
4	3,7±0,3	19,8±2,3	7,5±0,7	3,7±0,6	19,5±0,8	8,2±0,4	3,3±0,3	10,8±1,5	4,8±0,2
Необлицованные гранулы (Японская технология) n=25									
0	1,5±0,5	3,2±1,3	0,5±0,1	1,5±0,5	2,8±1,1	2,7±0,3	0,8±0,3	1,4±0,4	1,4±0,1
1	2,2±0,6	4,8±1,4	3,7±0,3	2,3±0,6	6,7±0,9	4,3±0,5	1,3±0,7	3,7±0,3	3,2±0,3
2	5,5±0,5	29,7±2,3	9,2±0,6	5,1±0,5	28,8±2,1	8,3±1,2	4,3±0,5	24,2±1,2	7,3±0,6
3	4,8±0,5	24,2±1,8	8,2±0,8	4,5±0,3	24,2±2,0	8,1±1,4	4,4±0,1	17,8±1,3	6,1±0,4
4	3,8±0,2	17,3±2,1	7,1±0,9	3,7±0,8	16,8±1,3	6,7±0,7	3,3±0,2	12,7±0,5	5,5±0,5
Облицованные гранулы (Харьковская технология) n=25									
0	1,7±0,3	2,5±0,6	2,0±0,3	2,0±0,3	3,5±0,3	2,0±0,5	1,0±0,5	2,5±0,3	2,0±0,3
1	4,5±0,3	29,5±2,3	9,1±0,9	2,5±0,5	14,7±1,5	9,6±0,7	2,3±0,3	6,8±0,5	4,0±0,5
2	5,1±0,3	35,3±2,6	10,1±1,3	4,5±0,3	34,3±2,4	9,5±1,3	4,2±0,3	18,5±1,2	6,5±0,5
3	4,5±0,5	31,5±2,7	10,2±1,2	4,5±0,5	28,5±2,8	9,3±1,4	4,1±0,4	17,5±1,5	6,3±0,7
4	4,0±0,5	29,8±1,8	9,3±0,7	4,5±0,4	31,5±1,7	9,2±1,3	4,0±0,5	14,5±1,7	5,0±0,5

Примечания: Разность значений достоверна при $p \leq 0,05$ относительно уровня значений соответствующих показателей в контрольных и опытных образцах.

всех опытных образцах, замороженных по различным технологиям, был выше в сравнении с уровнем аналогичных показателей в контроле, что указывает на повышенную стойкость половых клеток к негативному влиянию низких температур при их криоконсервации. Так, при использовании сорбента «Атокса» в концентрации 0,06 % активность спермиев через два часа эквilibрации и дальнейшего замораживания в пайетах и оттаивания была на 0,5-1,5 балла выше в сравнении с аналогичными показателями спермы в контроле (в зависимости от длительности адаптационного периода 3-4 часа при 3-4 °C), а абсолютный показатель выживаемости (Sa) и выживаемость клеток при 38 °C на 9,5-18,4 усл.ед и на 2,7-4,5 часа соответственно больше. При использовании в качестве технологических упаковок спермы – необлицованных и облицованных гранул качественные показатели были также выше: активность на 1-1,2 балла, Sa - на 17-20,8 усл.ед, t - на 3,1-5,1 часа больше чем в контроле. Внесение в сперму препарата «Сорбовер» также увеличивает сохранность спермиев после их крио- и деконсервации. Так, качественные показатели жизнеспособности половых клеток сохраняли тенденцию к увеличению после замораживания в среде с содержанием «Сорбовера». В контрольных образцах жизнеспособность спермиев после их криоконсервации в обычных средах, без содержания сорбентов, была ниже, чем в опыте.

Сравнительный анализ уровня качественных показателей спермы после замораживания в разбавителях, содержащие опытные сорбенты в концентрации 0,06 % не выявил преимущества какого-либо испытываемого препарата. Разность показателей активности, абсолютного показателя выживаемости деконсервированной спермы в опытах не достоверна ($t_d \leq 0,1$ при $p \leq 0,05$).

Таким образом, приведенные данные (см. табл.) свидетельствуют о положительном влиянии изучаемых сорбентов на метаболические процессы, происходящие в половой клетке в течении всех технологических циклов (эквilibрации, крио- и деконсервации) при использовании всех технологий замораживания.

Исследованиями, проведенными нами ранее [6] совместно с лабораторией биохимии ИЭКВМ УААН, было доказано, что данные сорбенты обладают высокими антиоксидантными свойствами, являясь активными ингибиторами процессов развития перекисного окисления липидов спермиев и способствуют снижению интенсивности образования токсических продуктов окисления фосфолипидов спермиев и разбавителя. Из полученных экспериментальных данных следует также, что адаптационно-эквilibрационный процесс подготовки спермы к низкотемпературному анабиозу имеет большую длительность и поражение мембранного аппарата спермиев продуктами перекисного окисления фосфолипидов мембран половых клеток и желточного разбавителя происходит уже в подготовленном периоде, усиливаясь после крио- и деконсервации клеток. Введение сорбентов в разбавленную сперму сдерживает образование и скорость накопления этих негативных для клетки веществ и повышает стойкость мембран на протяжении всех этапов технологической обработки. Одновременно следует отметить, что на протяжении всего времени исследования мы не выявили спада подвижности или агглютинации спермиев [7]. Наоборот, был зарегистрирован высокий уровень жизнеспособности половых клеток, что свидетельствует о нетоксичности биогенно-стимулирующего и ингибирующего действия исследуемых сорбентов. Изучение уровня оплодотворяющей способности спермиев после криоконсервации в разбавителе, содержащем сорбенты, подтвердило, что присутствие «Атокса» и «Сорбовера» в ингредиентном составе сред для разбавления и замораживания спермы повышает жизнеспособность

спермиев и их биологическую полноценность, что положительно отражается на уровне оплодотворяемости коров. Так, оплодотворяемость опытных животных после первого осеменения спермой с содержанием «Атокса» и «Сорбовера» в концентрации 0,06 % составляла соответственно 72 и 67%. В контрольных образцах этот показатель имел величину, равную 60 %.

Выводы:

1. Введение препаратов «Атокса» и «Сорбовера» в ингредиентный состав разбавителей спермы повышает биологическую полноценность и резистентность спермиев к негативному действию значительных температурных градиентов, возникающих при крио- и деконсервации спермы и ингибирует развитие во времени перекисных процессов окисления клеточных и внеклеточных липидов, что позволяет сократить длительность адаптационно-эквilibрационного периода до двух часов (против 3-4 часов рекомендованных по инструкциям) при использовании различных технологий криоконсервации половых клеток.

2. Использование сорбентов «Атокса» и «Сорбовера» в концентрации 0,06 % как составляющих разбавителя позволяют увеличить оплодотворяемость коров после первого осеменения в среднем на 15,8 %.

Бібліографічний список

1. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Ф.И. Осташко.- К.: Аграрна наука, 1995.-С. 184.

2. Наук В.А. Структура и функция спермиев с.-х. животных при криоконсервации / В.А. Наук.- Ленинград: Агропромиздат, 1998.-С.165.

3. Кушнір В.М. Удосконалений спосіб обробки і криоконсервації сперми бугаїв у відкритих гранулах і герметичних упаковках / В.М. Кушнір, О.Н. Марченко.- К.: Нива, 1996.-С.63.

4. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: метод. рек. - Х., 1990.-47 с.

5. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н.А. Плохинский.- Москва: Колос, 1969.-С. 256.

6. Вплив низьких температур за умов криоконсервації на стан процесів пероксидації у зразках розрідженої сперми бугаїв-плідників / [Романько М. Є., Стегній Б.Т., Соклакова О.В., Ушкалов В.О.]. // НТБ ІБТ ДНДКІ вет.препар.та корм.добавок.- Л., 2005.- Вип.6.- С.378-384.

7. Влияние сорбентов на качественные показатели и уровень перекисного окисления липидов спермы быков-производителей / [Сушко А.Б., Соклакова А.В., Савельева М.С. та ін.]. // НТБ, №90: Матеріали міжнародної конференції "Стан і перспективи розвитку біотехнології відтворення тварин", 29 березня 2005.-Х.:ІТ УААН.- С.157-161.

ВПЛИВ СОРБЕНТІВ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ СПЕРМИ БУГАЇВ, ЗАМОРОЖЕНОЇ ЗА РІЗНИМИ ТЕХНОЛОГІЯМИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

Соклакова О.В., Сушко О.Б., Савельєва М.С., Інститут тваринництва УААН

Романько М.Є., Інститут експериментальної та клінічної ветмедичини УААН

Наведено результати досліджень уведення до інгредієнтного складу розріджувачів сорбентів: «Атоксу» та «Сорбоверу» у концентрації 0,06 %, даючи змогу удвічі скоротити адаптаційно-еквilibраційний період із вико-

ристанням існуючих технологій кріоконсервування сперми бугаїв. Використані препарати інгібують розвиток у часі інтенсивності окислювальних процесів фосфоліпідних мембран спермій та розріджувача, що підвищують стійкість мембранного апарата статевих клітин до негативної дії температурних градієнтів, які виникають при кріо- і деконсервації спермій. Присутність сорбентів у розбавленій спермі дає змогу підвищити біологічну повноцінність сперми після її заморожування, що характеризується збільшенням показників якості запліднювальної здатності.

Ключові слова: сперма, бугай-плідники, сорбенти, розріджувач, деконсервація, виживаність, активність спермій.

ABSORBENT IMPACT ON THE BULL SPERM VIABILITY FROZEN ACCORDING TO THE VARIOUS FREEZING PRESERVATION TECHNIQUES

Soklakova A., Sushko A., Savelyeva M. ; Institute of animal science, UAAS

Romanko M.; Institute of experimental & clinical veterinary medicine, UAAS

This article highlights the experimental research results on the absorbent administration to the chemical composition of dilution media. The absorbent included Atocks & Sorbover. The absorbents were administrated by 0,06% concentration. The semen adaptation & diffusion equilibrium span was 2-fold impaired by the above-mentioned absorbents application. The absorbents are administrated during freezing preservation of the bull semen according to the update techniques. The preparations inhibit oxidation intensity in the phosphorous lipids & dilution media. They also up resistance capacity of the reproductive cells of the membranes to the unfavorable effect of temperature gradients. The temperature swaps occur during freezing and thawing method application. The absorbents in the diluted semen enable to improve its biological characteristics after freezing procedure. The sperm is characterized by fertilizing capacity boost.

Key words: absorbent, dilution media, adaptation, diffusion equilibrium, freezing and thawing method, diluted semen, oxidation intensity, resistance capacity, reproductive cell.