Біотехнологія та штучне осіменіння у конярстві

УДК 636.1.082.453.5

ПОРІВНЯЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ ЖЕРЕБЦЯ В РІЗНИХ УПАКОВКАХ

Рецензенти: док-р б. наук, професор Бугров О.Д.; канд. б. наук Лісіна К.Г.

О.Б. Сушко, А.Г. Міщенко, О.В. Ткачов
Інститут тваринництва НААН

Встановлено, що при застосуванні установки "Кріотроп" середня швидкість заморожування сперми жеребців у шприц-тюбах об'ємом 5 мл у діапазоні температур від 0 °С до мінус 10 °С становить біля 4,2 °С/хв, а від мінус 10 °С до мінус 80 °С - біля 23,7 °С/хв. Визначено, що запропонований спосіб заморожування сперми жеребців у шприц-тюбах дає змогу отримувати деконсервовані клітини з рухливістю 3,38±0,18 бала, що відповідає рівню при проведенні кріоконсервації сперми у гранулах та пайєтах об'ємом 0,25-0,5 мл. Розроблено ефективний спосіб адаптації-еквілібрації сперми жеребців в установці "Кріотроп" при температурі плюс 2-5 °С на основі застосування додаткового блока.

Ключові слова: **сперма, жеребці, кріоконсервація, шприц-тюба, швидкість охолодження.**

Загальновідомий метод заморожування сперми жеребця полягає в розміщенні пайєт об'ємом 0,5 мл у парах зрідженого азоту при температурі мінус 130 °С [1]. Крім пайєт об'ємом 0,5 мл можливе застосування пайєт об'ємом 0,25 мл, які теж охолоджуються в парах азоту при температурі мінус 130 °С [2], та облицьованих гранул об'ємом від 0,25-0,5 мл, що заморожуються в каністрах, розташованих у зрідженому азоті при температурі мінус 196 °С [3]. При кріоконсервації сперми жеребців можливе також проведення процесу заморожування статевих клітин у формі відкритих гранул об'ємом 0,25 мл на фторопластовій пластині при температурі мінус 80 °С (рис. 1).

Малі об'єми спермодоз дають можливість отримувати необхідні швидкості охолодження біоматеріалу. Проте, для штучного осіменіння кобил бажано мати деконсервовані спермодози об'ємом 5 мл [4]. Досліди авторів [5] показали можливість і доцільність такого технологічного прийому, при якому застосовували подовжені до 25 см пайєти на 4-5 мл, що охолоджувались у парах зрідженого азоту при температурі мінус 130 °С. Проте, у вирішенні цього завдання ми йшли іншим шляхом, ніж західні дослідники, а саме, змінюючи форму контейнера та спосіб його охолодження.

Тому на певному етапі досліджень потребувалось як теоретичне обґрунтування можливості кріоконсервації в таких контейнерах, як шприц-тюба об'ємом 5 мл, так і практичний доказ ефективності їхнього використання

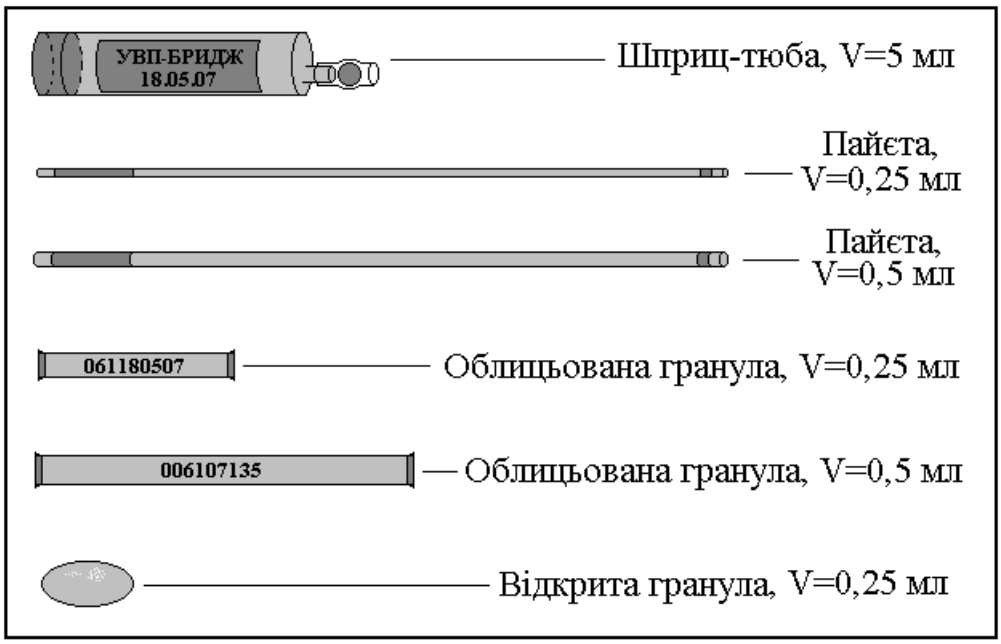


Рис. 1. Зображення різних видів упаковок для кріоконсервації сперми жеребців.

на підставі фізіологічних показників сперми після заморожування-відтавання, при чому в порівняльному аспекті.

Мета роботи полягала у проведенні порівняльної оцінки ефективності заморожування сперми жеребців у різних упаковках.

Матеріали та методи досліджень. У дослідах використовували сперму жеребців української верхової та тракененської порід. Еякуляти отримували за допомогою ізотермічної штучної вагіни [6]. Процедура відмивання від секретів додаткових статевих залоз (гелю) включала видалення плазми після центрифугування (g=800) протягом 20 хвилин, забор супернатанту і розбавлення осаду сперміїв із лактозо-хелато-цитратно-жовтковим середовищем [7] із доведенням до концентрації 100 млн. сперміїв/мл.

При використанні шприц-тюб об'ємом 5 мл (500 млн. сперміїв) сперму заморожували шляхом прямого внесення термоблока „Кріотроп" у зріджений азот з одночасним зрошуванням дрібно розпиленим азотом (експериментальна технологія) (рис. 2). У контрольних групах заморожування сперми в формі пайєт об'ємом 0,25-0,5 мл (25-50 млн. сперміїв) проводили в парах азоту при температурі мінус 130 ^{o}C (рис. 3), у формі облицьованих гранул об'ємом 0,25-0,5 мл (25-50 млн. сперміїв) – за Харківською технологією [3].

У другій частині досліджень, що стосувалися створення нового обладнання для охолоджування та еквілібрації сперми жеребців, застосовувався метод конструкторського моделювання з наступним випробуванням дослідного зразка.

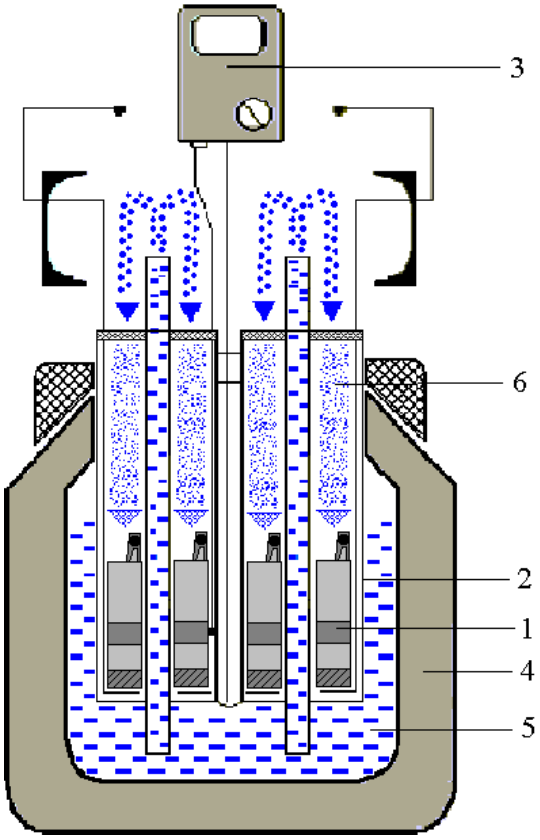


Рис. 2. Заморожування сперми в шприц-тюбах об'ємом 5 мл за допомогою пристрою "Кріотроп" прямим зануренням у зріджений азот (експериментальна технологія): 1 – шприц-тюба, 2 - термоблок „Кріотроп", 3 - прилад для вимірювання температури, 4 - посудина Дюара, 5 - зріджений азот, 6 - дрібнорозпилений азот.

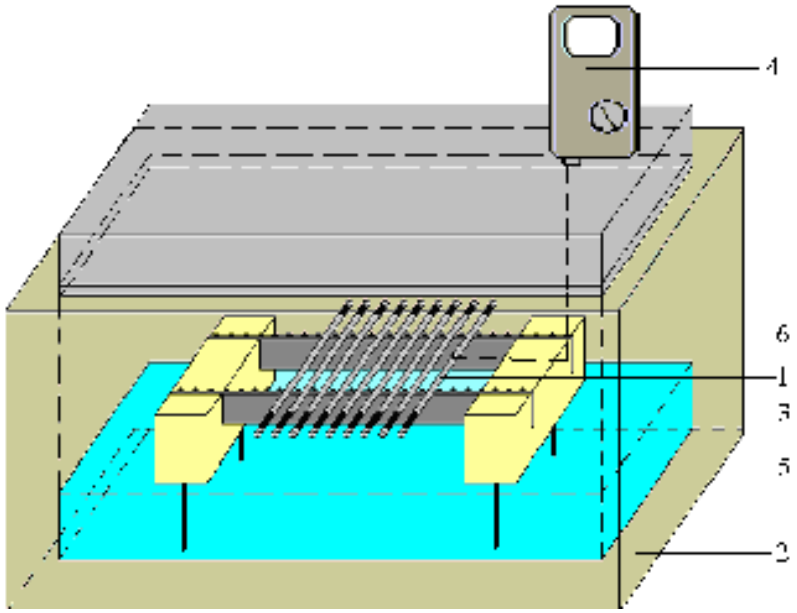


Рис. 3. Заморожування сперми в пайєтах об'ємом 0,25-0,5 мл (базова технологія): 1 - пайєти, 2 - термоізолююча камера, 3 - штатив для пайєт, 4 - прилад для вимірювання температури, 5 - зріджений азот, 6 - пари азоту.

При цьому, на відміну від інших форм, відкриті гранули сперми об'ємом 0,25 мл (25 млн. сперміїв) заморожували на фторопластовій пластині при температурі мінус 80 °С. Усі досліди проводили на розділених еякулятах. Відтавання й оцінку сперми жеребця в балах проводили при температурі 37 °С.

Результати досліджень. Дослідження термодинаміки показали, що, незважаючи на відносно великий об'єм сперми в шприц-тюбі (5 мл) при запропонованому методі заморожування ("Кріотроп"), режим охолодження був близьким до такого, як показано у роботі [1] (8-10 °С/хв та 20-25 °С/хв від 0 °С до мінус 10 °С та від мінус 10 °С до мінус 80 °С, відповідно) і знаходився в межах норм, які вважаються оптимальними для отримання нормальних фізіологічних показників сперми після деконсервації (рис. 4).

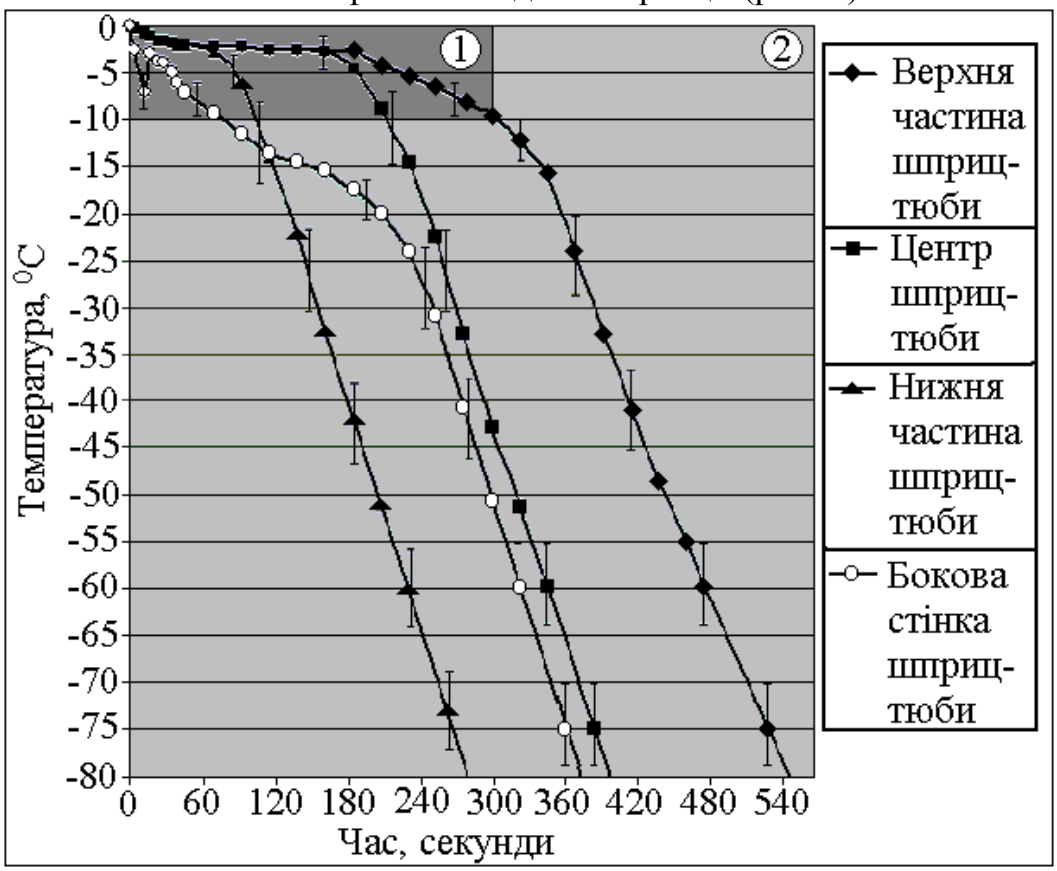


Рис. 4. Швидкість заморожування сперми жеребця в різних точках шприц-тюби за допомогою установки "Кріотроп": 1 – швидкість заморожування від 1 до 8 °С/хв, 2 – швидкість заморожування від 14 до 27 °С/хв.

Так, середня швидкість для сперми в шприц-тюбах у діапазоні від 0 до мінус 10 °С становила близько 4,12 °С/хв, від мінус 10 °С до мінус 80 °С – близько 21,25 °С/хв. При цьому спостерігається певний розкид швидкості охолодження сперми в різних точках шприц-тюби. Для порівняння в табл. 1 показано швидкості заморожування пайєт, облицьованих гранул та відкритих гранул різного об'єму.

1. Швидкості заморожування сперми жеребців при використанні різних видів контейнерів (M±m)

Спосіб заморожування	Вид контейнера (точка вимірювання)	Швидкість, °С/хв			Час від 0 °С до мінус 80 °С, хв, M±m (min÷max)
		0 °С ÷мінус 10 °С, M±m (min÷max)	мінус 10 °С ÷ мінус 80 °С, M±m (min÷max)	0 °С ÷мінус 80 °С, M±m (min÷max)	
Пари зрідженого азоту	Пайєти 0,25 мл (центр)	22,0±0,5 (21÷23)	61,0±0,5 (60÷62)	52,5±0,4 (51÷54)	1,5±0,1 (1,5÷1,6)
	Пайєти 0,5 мл (центр)	9,0±0,3 (8÷10)	24,4±0,5 (23÷26)	19,6±0,2 (19÷20)	4,1±0,1 (4,0÷4,2)
Харківська технологія	Облицьована гранула 0,25 мл (центр)	10,0±0,5 (9÷11)	25,5±0,5 (24÷27)	21,5±0,4 (20÷21)	3,5±0,1 (3,5÷3,6)
	Облицьована гранула 0,5 мл (центр)	8,0±0,5 (7÷9)	23,5±0,5 (22÷25)	18,5±0,4 (18÷19)	5,1±0,1 (5,0÷5,2)
Фторопл. пластина	Відкрита гранула 0,25 мл	22,0±0,5 (21÷23)	56,5±0,5 (55÷58)	39,5±0,4 (38÷40)	2,1±0,1 (2,0÷2,1)
Пряме внесення термоблока „Кріотроп" у зріджений азот (мінус 196°С)	Шприц-тюба 5 мл (верх)	1,7±0,2 (1÷2)	19,4±0,2 (19÷20)	8,8±0,1 (8,6÷8,9)	9,1±0,1 (9,0÷9,3)
	Шприц-тюба 5 мл (центр)	2,7±0,2 (2÷3)	24,6±0,2 (24÷25)	13,4±0,2 (13÷14)	6,6±0,2 (6,5÷6,8)
	Шприц-тюба 5 мл (низ)	5,6±0,2 (5÷6)	26,4±0,2 (26÷27)	17,3±0,2 (17÷18)	4,6±0,1 (4,5÷4,8)
	Шприц-тюба 5 мл (периферія)	6,7±0,3 (6÷8)	14,7±0,2 (14÷15)	12,6±0,2 (12÷13)	6,5±0,1 (6,3÷6,6)

Слід зазначити, що швидкості заморожування сперми жеребця у відкритих гранулах та пайєтах об'ємом 0,25 мл були більшими в 1,5-3 рази ніж при застосуванні інших видів контейнерів: пайєт об'ємом 0,5 мл, облицьованих гранул об'ємом 0,25-0,5 мл та шприц-тюб об'ємом 5 мл, в яких швидкості заморожування сперми жеребця були досить близькими одна до одної. Також було вивчено вплив різних контейнерів при кріоконсервації сперми жеребців на якісні показники деконсервованого біологічного матеріалу (табл.. 2).

Найнижчі показники якості деконсервованої сперми жеребця отримано при використанні відкритих гранул. Вважаємо, можливо це було внаслідок того, що сперму у формі відкритих гранул розморожували при контакті з розчином цитрату натрію, який і вплинув на характеристики спермііів.

Запропонований спосіб заморожування сперми жеребців у шприц-тюбах дає змогу отримувати якісні показники деконсервованих клітин на рівні з іншими методами. Крім того, розроблені упаковки мають перевагу при кріоконсервації, яка виражається у збільшеному об'ємі окремої спермодози,

2. Якісні показники деконсервованої сперми жеребців, замороженої в різних видах контейнерів (M±m)

Технологічна форма	Число еякулятів, n	Рухливість заморожено-відталої сперми (а), бали	Виживаність сперміїв при температурі 37 °С (t), години	Показник абсолютної виживаності (S_a), ум. од
Шприц-тюба, V=5 мл	8	3,38 ±0,18	3,38±0,48	9,03±1,26
Пайєта, V=0,5 мл	8	3,38 ±0,18	3,38±0,48	8,38±0,95
Пайєта, V=0,25 мл	8	3,25 ±0,19	2,81±0,28	8,16±0,87
Облицьована гранула V=0,5 мл	8	3,25 ±0,19	2,81±0,28	8,81±0,92
Облицьована гранула, V=0,25 мл	8	3,25 ±0,19	2,81±0,28	8,78±0,95
Відкрита гранула, V=0,25 мл	8	3,25±0,19	2,56±0,24	7,22±0,98

що заморожується (5 мл), і це реалізується за допомогою пристрою “Кріотроп”.

Тому при заготівлі виключається необхідність дрібнофасувально-маркувального обладнання, а при штучному осіменінні одна шприц-тюба зі спермою є однією дозою для осіменіння, і, таким чином, створення спермодози не потребує об’єднання кількох розгерметизованих пайєт чи гранул.

Також технологічний регламент визначає наявність процесу еквілібрації сперми жеребця перед заморожуванням, який крім витримки для врівноваження концентрацій захисних речовин в клітинах та середовищі, передбачає поступове охолодження спермодоз та їх витримку при субнульових температурах (2-5 °С) протягом 1-1,25 години. Для цього традиційно використовується лабораторне або побутове компресійне холодильне обладнання з хладоновою системою охолодження. Проте, таке обладнання може бути громіздким та не завжди доступним при роботі в кінних заводах в експедиційних умовах. В зв’язку з цим, проведено дослідно-конструкторську роботу, в результаті якої запропоновано та випробувано додатковий блок для охолодження та еквілібрації спермодоз, що працює за принципом змішування холодних парів азоту з теплим повітрям лабораторного приміщення (рис. 5).

При цьому блок встановлюється на ту ж посудину Д’юара (1), за допомогою якої пізніше проводиться заморожування сперми жеребця. У термоізоляційній камері (2) розміщують спермодози (9), які встановлюють у вертикальному положенні на спеціальній сітці (8). Портативним компресором (6) створюється потік теплого повітря, який через трубку (7) подається на дзеркало зрідженого азоту, інтенсифікуючи випаровування холодних парів азоту. Дросельними заслінками (3), які встановлені в термоізоляційній камері (2), регулюється потік теплого повітря із лабораторної кімнати. При цьому холодні пари та тепле повітря змішується в термоізоляційній камері (2) у зоні розміщення спермодоз (9). Контрольним прибором із термопарою, голівка якої



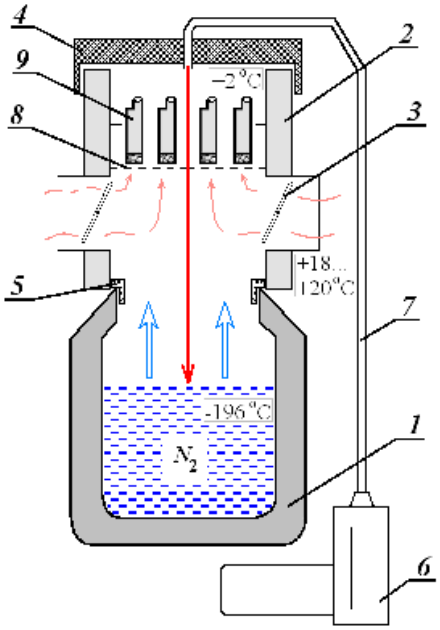


Рис. 5. Установка "Кріотроп" із блоком для еквілібрації-адаптації сперми жеребців: 1 - посудина Д'юара, 2 - термоізоляційна камера, 3 - дросельна заслінка; 4 - термоізоляційна кришка, 5 - з'єднувальна муфта, 6 – компресор, 7 - трубка подачі повітря, 8 – сітка, 9 - шприц-тюба, ↓ - струмінь повітря, ⇑ - пари азоту.

розміщена в контрольній спермодозі-імітації, визначається швидкість зниження температури біоматеріалу.

Швидкість охолодження спермодоз задається на рівні 1,5-2 °С/хв для запобігання температурному шоку сперми. Після досягнення субнульової температури в розрідженій спермі, остання витримується на цьому рівні протягом необхідного для еквілібрації відрізку часу (у нашому випадку 1час 15 хвилин).

Було порівняно технологічний прийом, при якому використовувалися два блоки – блок адаптації-еквілібрації та блок заморожування, і раніше апробований спосіб зі застосуванням еквілібрації-адаптації в холодильнику та блоку заморожування. Ефективність застосування розробленого способу з використанням двоблокової установки для температурної адаптації-еквілібрації та кріоконсервації сперми жеребців була рівною з раніше випробуваним методом. Проте „двоблоковий" метод дає змогу значно компактизувати технологічну лінію та замінити холодильне обладнання, що за необхідності може бути використане в експедиційних умовах роботи. При проведенні досліджень використано 12 еякулятів жеребців. Основні показники в досліді склали в середньому: рухливість сперми - 3,6 бала, виживаність при 37 °С - 2,9 години, показник абсолютної виживаності - 8,5 умов. од, показник кріорезистентності (збереження статевих клітин після кріоконсервації) - 58,5%. У контролі показники були абсолютно рівними.

Висновки:

1. Встановлено, що при застосуванні установки "Кріотроп" середня швидкість заморожування сперми жеребців у шприц-тюбах об'ємом 5 мл дорівнює 4,2 ^{o}C/хв у діапазоні температур від 0 ^{o}C до мінус 10 ^{o}C та 23,7 ^{o}C/хв від мінус 10 ^{o}C до мінус 80 ^{o}C. Визначено, що в діапазонах температур від 0 ^{o}C до мінус 10 ^{o}C та від мінус 10 ^{o}C до мінус 80 ^{o}C швидкості заморожуванні сперми жеребця в пайєтах, облицьованих гранулах об'ємом 0,5 мл становлять 8,0-9,0±0,5 ^{o}C/хв та 23,5-24,4±0,5 ^{o}C/хв, пайєтах, облицьованих гранулах та відкритих гранулах об'ємом 0,25 мл - 10,0-22,0±0,5 ^{o}C/хв та 25,5-61,0±0,5 ^{o}C/хв відповідно.

2. Визначено, що найвищими показниками якості володіє деконсервована сперма жеребців, яка була заморожена у шприц-тюбах об'ємом 5 мл та пайєтах об'ємом 0,5 мл. Рухливість, виживаність та показник абсолютної виживаності деконсервованої сперми жеребця, що заморожена в шприц-тюбах об'ємом 5 мл, становили 3,38 ±0,18 %, 3,38±0,48 години та 9,03±1,26 умов. од, у пайєтах об'ємом 0,5 мл - 3,38 ±0,18 %, 3,38±0,48 години та 8,38±0,95 умов. од відповідно.

3. Запропонований пристрій "Кріотроп" може бути використаний для проведення ефективної адаптації-еквілібрації сперми жеребців перед заморожуванням, що реалізується завдяки застосуванню додаткового блоку.

Бібліографічний список

1. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the prence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry / R. V. Devireddy, D. .J. Swanlung, T. Olin [et all] // Biology of reproduction. – 2002. - № 66. - P. 222-231.

2. La methode des paillettes en plastique adapt la generalization de la congelation / Cassou R. // C.R. Acad. Agric. - 1964. - № 50. - P. 881-887.

3. Осташко Ф.И. Павленко М.П., Кузнецов Г.Н. Харьковская технология криоконсервации спермы животных / Осташко Ф.И.? Павленко М.П., Кузнецов Г.Н.// Теор. и прикл. аспекты биотехнол. - К., - 1991. - С. 32 - 33.

4. Сушко О. Б. Метод кріоконсервації сперми жеребців з використанням компактизованих шприц-тюбів / О. Б. Сушко // Вісник аграрної науки. – К.; травень, 2007. – С. 43-45.

5. Mottershead J. Thawing and preparing frozen semen for artificial insemination / "Canadian Morgan", - Jan/Feb, - 2000 issue. – www.equine-reproduction.com.

6. Пат. 31026 від 25.03.2008 Пристрій для отримання сперми жеребців / Сушко О.Б. Новиков О.О. - u200711907; заявл. 29.10.2007; UA31026U, Бюл. № 6, 8 с.

7. ГОСТ 24163-80. Среда лактозо-хелато-цитратно-желточная (ЛХЦЖ) для хранения спермы жеребцов.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЗАМОРАЖИВАНИЯ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦА В РАЗНЫХ УПАКОВКАХ

Сушко А.Б., Мищенко А.Г., Ткачев А.В., Институт животноводства НААН

Установлено, что при применении установки "Криотроп" средняя скорость замораживания спермы жеребцов в шприц-тюбах объемом 5 мл в диапазоне температур от 0 °С до минус 10 °С составляет около 4,2 °С/мин, а от минус 10 °С до минус 80 °С - около 23,7 °С/мин. Определено, что предложенный способ замораживания спермы жеребцов в шприц-тюбах позволяет получать деконсервированные клетки с подвижностью 3,38±0,18 балла, что является на уровне при проведении криоконсервации спермы в гранулах и пайетах объемом 0,25-0,5 мл. Разработан эффективный способ адаптации-эквилибрации спермы жеребцов в установке "Криотроп" при температуре плюс 2-5 °С на основе применения дополнительного блока.

Ключевые слова: сперма, жеребцы, криоконсервация, шприц-тюба, скорость охлаждения.

COMPARATIVE ANALYSIS EXECUTION ON FREEZING PRESERVATION EFFICIENCY OF STALLION SEMEN STORED IN VARIOUS PACKS

Sushko O., Mishchenko A., Tkachov O.; Institute of animal science, NAASU

This article highlights the experimental research results of comparative analysis execution on freezing preservation efficiency of stallion semen stored in various packs. Medium freezing preservation speed of stallion semen in 5ml volume insemination tubes proved to constitute 4,2℃/min by 'Kryotrop' apparatus application. Temperature ranges from 0℃ to minus 10℃. Approximate freezing preservation speed equals 23,7℃/min within temperature range from -10℃ to -80℃. The proposed freezing preservation method of stallion semen in the insemination tubes considered to secure thawed cell formation. Motility rate forms 3,38±0,18 according to adopted grading. The above-mentioned motility rate corresponds the standard for freezing preservation operation execution in the granules and 0,25±0,5ml volume pallets. Efficient adaptation technique was elaborated for stallion semen equilibration in 'Kryotrop' apparatus by temperature +2-5℃. The method was developed on the basis of supplementary block application.

Key words: semen, stallions, freezing preservation, insemination tube, freezing speed.