

М.П. ПАВЛЕНКО

**НОВІ АЛЬТЕРНАТИВНІ АНТИШОКОВІ
КОМПОНЕНТИ РОСЛИННОЇ ПРИРОДИ І ЇХНІЙ
ВПЛИВ НА КРІОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА БІОЛОГІЧНІ
ПОКАЗНИКИ СТАТЕВИХ КЛІТИН БУГАЇВ ПРИ
КРІОКОНСЕРВАЦІЇ У БЕЗЖОВТКОВИХ
СЕРЕДОВИЩАХ**

При консервуванні сперми холодом обов'язковим компонентом кріопротекторного середовища є нативний жовток, багатий фосфоліпідами і ліпопротеїдами, які при взаємодії з плазматичними мембранами сперміїв модифікують їх у напрямі підвищення міцності та стабільності [1, 3]. Адсорбуючись ліпофільними і гідрофільними ділянками плазматичних мембран, ліпоїдні комплекси майже удвічі-втричі потовщують клітинну оболонку, що надає стійкості гаметам до екстремальних температурних, осмотичних, імунологічних, фізико-хімічних і механічних ушкоджень. У зв'язку з цим жовткові розбавлювачі стали основою виробничих технологій консервування сперми тварин. Проте жовток за своїми негативними властивостями відносно сперми (нестандартність, термолабільність, бактеріоносійство, імуноспецифічність і токсичність) не є ідеальним компонентом штучних середовищ, що спонукає до пошуку ефективних його заміників, насамперед із сировинних джерел рослинного походження. Раніше [2] було виділено із соєвих бобів фосфоліпід — ліпозитол і доведено, що він захищає статеві клітини бугая від холодового удару при нульових температурах на одному рівні з лецитином курячого жовтка. Однак, за даними досліджень В. Семенової (1987), використання рослинного фосфоліпіду у формі спиртової витяжки при кріоконсервації сперми не забезпечує

© М.П. Павленко, 2001

кріозахисного ефекту, рівноцінного використанню нативного жовтка, а відтак ці дослідження не набули подальшого розвитку. Пізніше [2] цими авторами було експериментально доведено, що більш ефективними для захисту статевих клітин від температурного шоку є не вільні фосфоліпіди жовтка, а їхні ліпопротеїнові комплекси з умістом до 50 % білків. Вивчаючи це питання, ми вперше успішно заморозили сперму бугая у середовищі, виготовленому на основі ліпопротеїнової витяжки (РАФ-1) із соєвого борошна, що відкрило перспективу для створення дешевих, термостабільних, екологічно чистих і ефективних кріопротекторних середовищ для сперми тварин. У зв'язку з цим метою наших досліджень було розробити методику одержання антишокових компонентів із сировинних джерел рослинного походження і вивчення їхньої дії на спермі бугаїв.

Матеріали і методика досліджень. Для дослідів використовували сперму бугаїв, стандартне лактозо-жовтково-гліцеринове середовище № 1 і безжовткове лактозо-цитратно-гліцеринове середовище № 2, які призначені для кріоконсервації сперми за харківською технологією. Як сировину для одержання антишокового компонента використовували насіння сої, гороху, сочевиці, арахісу і квасолі.

При виготовленні експериментальних середовищ насіння бобових висушували до 1%-ї вологості, після чого його мололи до борошна. Борошно розчиняли бідистильованою водою у співвідношенні 1:3. Екстрактивну масу перемішували протягом 1 год. при кімнатній температурі на магнітному змішувачі, а потім прогрівали на водяній бані при температурі + 65 °С протягом 30 хв. Після цього екстрактивну суміш центрифугували при 7 тис. обертів за хвилину протягом 20 хв. Осад видаляли, а супернатант використовували в дослідях.

Осмотичний тиск супернатанту вимірювали кріоскопічним методом, концентрацію водневих іонів — на іонометрі ЕВ-74 (за ДЕСТ 20909.5—75).

Компенсацію осмотичного тиску проводили додатковим внесенням цукрози в одержані супернатанти, після чого їх ви-

користували як основу для кріопротекторних середовищ. Загальним контролем було лактозо-жовтково-гліцеринове середовище. Одержаними зразками середовищ розбавляли дослідні проби сперми у співвідношенні 1:1, витримували їх при кімнатній температурі протягом 5 хв., після чого додатково розбавляли сперму безжовтковим лактозо-цитратно-гліцериновим середовищем № 2 у співвідношенні 1:10. Оброблену таким чином сперму випробували на кріорезистентність за нашою методикою та на здатність до заморожування в рідкому азоті за харківською технологією. При цьому вивчали вплив заморожування на рухливість спермій після деконсервації, виживаність статевих клітин при температурі +38 °C та її запліднювальну здатність.

Результати досліджень. Установлено, що при екстрагуванні антишокового компонента з насіння бобових у всіх використаних зразках концентрація водневих іонів становила 6,2 — 6,4 од. і відповідала рівню цього показника в жовтково-му розбавлювачі, який був контролем.

При кріоскопії екстрактів, отриманих за описаною методикою, встановлено, що осмотичний тиск тільки в соєвому і сочевичному екстрактах становив 8,2 од. і був на рівні контрольного розбавлювача, що пояснюється високим вмістом у цих бобах осмотично активних речовин. У всіх інших екстрактах дефіцит осмотичного тиску становив: по арахісу — 4,4; гороху — 4,8 і квасолі — 4,9 атм. Ці нестачі ми компенсували до значення 8,2 атм. внесенням в екстракти потрібної кількості дисахариду — цукрози (табл. 1).

Для вивчення кріорезистентності та здатності до глибокого заморожування сперми в отриманих екстрактах нами використано 12 розділених еякулятів бугаїв.

Дослідженнями антишовкових властивостей вказаних фортифікантів встановлено їхню здатність захищати статеві клітини від температурного шоку. В умовах миттєвого зниження температури в інтервалі +28 °C — 0 °C найбільш ефективний захист статевих клітин від ушкоджень забезпечувався при використанні антишовкових компонентів соєвих бобів, со-

1. Показники концентрації водневих іонів та осмотичного тиску (атм.) в екстрактах, одержаних з сировинних джерел рослинного походження

Показники	Контроль жовтка	Рослинні замітники жовтка				
		квасоля	горох	арахіс	сочевиця	соя
Концентрація водневих іонів, рН	6,2	6,2	6,2	6,4	6,3	6,2
Осмотичний тиск:						
після екстрагування	8,2	3,3	3,4	3,8	8,2	8,2
		-4,9	-4,8	-4,8		
після компенсації цукрозою	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2

чевиці та арахісу. При цьому коефіцієнт кріорезистентності становив: $R = 0,83; 0,87$ і $0,82$ од. відповідно (табл. 2).

Дещо нижчу кріорезистентність ($R=0,7$) відмічено в компоненті, одержаному з гороху. Найнижчі захисні властивості ($R=0,38$) відносно спермій проявляє екстракт із бобів квасолі.

Аналогічну залежність ефективності використання цих компонентів відмічено також і при глибокому заморожуванні сперми бугаїв до температури -196 °С. Після заморожування і відтанення в контролі залишалось 42% повноцінних спермій; в екстракті із сої — 41%; сочевиці — 42%; арахісу — 37%; гороху — 35% і квасолі — 20%. Виживаність при температурі $+38$ °С становила 6,0; 8,0; 7,8; 8,0; 8,0 і 3,0 год., а показник абсолютної виживаності був 17,5; 20,2; 19,8; 16,1; 18,5 і 4,0 од. відповідно.

Аналіз експериментальних даних свідчить про те, що всі вивчені компоненти тією чи іншою мірою здатні захищати статеві клітини бугая від температурного шоку при їхній гіпотермії як у зоні плюсових, так і в зоні субнульових температур. Встановлено високу захисну дію від кріоушкоджень статевих клітин компонентів сої, сочевиці, арахісу і гороху, які можуть

2. Вплив рослинних антишокових компонентів на сперму бугаїв при її гіпотермії

Показники	Контроль жовтка	Рослинні заміники жовтка			
		квасоля	горох	арахіс	сочевниця
Оцінка сперми, бали: при одержанні після розбавлення після температурного шоку	8,0 ± 0,001	8,0 ± 0,001	8,0 ± 0,001	8,0 ± 0,001	8,0 ± 0,001
	7,8 ± 0,01	7,8 ± 0,01	7,8 ± 0,01	7,8 ± 0,01	7,8 ± 0,01
	6,7 ± 0,01	3,0 ± 0,02	5,5 ± 0,01	6,4 ± 0,01	6,8 ± 0,01
Коефіцієнт кріо- резистентності сперми (R)	0,85 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,7 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,87 ± 0,01
	4,2 ± 0,01	2,0 ± 0,01	3,5 ± 0,01	3,7 ± 0,01	4,2 ± 0,01
Оцінка сперми після заморожування, бали	6,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5	8,0 ± 0,3	8,0 ± 0,3	8,0 ± 0,2
	17,5 ± 1,0	4,0 ± 0,05	18,5 ± 1,1	16,1 ± 1,2	20,2 ± 1,1
Показник абсолютної виживаності сперми, од. (Sa)					

бути рівноцінними замінниками нативного жовтка у кріопротективних середовищах.

Запліднювальну здатність сперми перевіряли в дослідному господарстві "Українка" і радгоспі "Безлюдівський" Харківської області. Було осіменено 260 корів, з яких запліднилося після першого осіменіння 182 голови (70%). На контролі із 240 голів запліднилося 158 (66,5%).

Отримані дані показують високу ефективність використання антишокових компонентів рослинного походження при кріоконсервуванні сперми бугаїв-плідників.

Висновки. 1. Ліпопротеїнові витяжки із сої, сочевиці, арахісу і гороху проявляють властивість захищати статеві клітини від температурного шоку в умовах миттєвого зниження температури від 28 °С до 0 °С на одному рівні з нативним жовтком.

2. Встановлено пряму залежність осмотичного тиску в екстрактах від температури експозиції і умов екстрагування. Оптимальні параметри екстрагування забезпечуються при безперервному змішуванні екстрактивної суміші протягом 1 год., витримування її при температурі +65°С з наступним розділенням суміші на фракції.

3. Екстракти сої, сочевиці, арахісу і гороху компенсовані за осмотичним тиском дисахаридом сахарозою за наявності кріопротектора гліцерину (5%) забезпечують високу виживаність статевих клітин при заморожуванні до -196°С. При цьому виживаність сперми становила 20,0; 19,8; 16,1 і 18,5 од. і вірогідно не відрізнялася від використання для заморожування стандартного кріопротекторного середовища з умістом 30% жовтка.

4. За умов заміни в кріопротекторних середовищах нативного жовтка антишоковими компонентами рослинного походження забезпечується збереження високої запліднювальної здатності заморожено-відталого сперми після першого осіменіння.

5. Використання рослинного фортифіканта плазматичних мембран замість нативного жовтка дає змогу запобігти за-

брудненню сперми і статевих шляхів самиць збудниками захворювань, які передаються з жовтком, застосувати прості і надійні способи стерилізації, уникнути використання дефіцитного дієтичного жовтка, а також розв'язати проблему централізованого виготовлення кріопротекторних середовищ і постачання їх племінним підприємствам.

1. Милованов В.К., Селиванова О.А. Разбавители для спермы сельскохозяйственных животных // Проблемы животноводства. — 1932. — № 2. — С. 75—86.

2. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных: Монография. — М.: Изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов.— 1962. — 696 с.

3. Осташко Ф.И. О природе холодового удара живчиков // Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. НИИЖ Л. и П. УССР. — Харьков, 1963. — С. 22—41.

Харківський зооветеринарний інститут

УДК 636.2.453.5:57.08

Б.М. ПАВЛЕНКО*

РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ КРІОКОНВЕКТОРНОГО СПОСОБУ ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ

Однією з причин зниження якості сперми при кріоконсервуванні в герметичних упаковках є нерівномірна взаємодія холоду заданої температури з усією поверхнею кожної спермодози, що особливо проявляється при заморожуванні великих партій сперми. Це пояснюється тим, що відомі способи заморожування сперми ґрунтуються на принципі пасивної конвекції холоду, що призводить до інерційності та дестабілізації режиму охолодження спермодоз і, як наслідок, — до розбіжностей у якості деконсервованої сперми.

* Науковий керівник — академік Ф.І. Осташко.