

## 5. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 636.22/.28.082.453.53:57.086.13

DOI 10.36016/VM-2019-105-15

### РЕЗУЛЬТАТИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ БУГАЇВ У РОСЛИННОМУ ФОРТИФІКАНТІ З ВИКОРИСТАННЯМ СОРБЕНТУ

Павленко Л. М, Стегній Б. Т., Дідик Т. Б., Павленко Б. М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: [pabbex@gmail.com](mailto:pabbex@gmail.com)

Представлені результати виготовлення та використання фітофортифіканту цитоплазматичних мембран спермійів на основі гідролізату бобових з додатковою очисткою сорбентами для кріоконсервації спермійів бугаїв як альтернативи жовтковим розріджувачам. Метою досліджень було досягнення біобезпечності, тобто уникнення інфекційних гінекологічних захворювань, збудники яких можуть передаватись з жовтком, підвищення рівня запліднюючої здатності самиць після їх штучного осіменіння та створення умов для розробки нових довгозбережливих кріопротективних розріджувачів. Встановлено, що зерна бобових та їх гідролізати містять токсичний елемент нікель, який негативно впливає на цитоплазматичну мембрану спермійів. Для зменшення цього впливу нами була проведена робота з вивчення дії різних сорбентів

**Ключові слова:** біобезпечність, екстракт сої та сочевиці, заплідненість, корови, кріоконсервація, сорбенти, сперма бугаїв, фіторозріджувач

Сучасна індустрія репродукції в молочному скотарстві базується на широкому впровадженні штучного осіменіння корів і телиць глибокозамороженою спермою. При консервуванні сперми холодом, обов'язковим компонентом кріопротективного середовища є нативний жовток через велику кількість в ньому фосфоліпідів і ліпопротеїдів, які, взаємодіючи з плазматичними мембранами спермійів, модифікують їх в напрямку підвищення міцності та стабільності [3–5, 9]. Адсорбуючись ліпофільними і гідрофільними ділянками плазматичних мембран, ліпоїдні комплекси майже у три рази потовщують клітинну мембрану, що підсилює стійкість гамет до пошкодження температурним, осмотичним, імунним, фізико-хімічним і механічним факторами [5–8, 9]. Тому жовткові розріджувачі стали основою виробничих технологій консервування сперми тварин. Разом з тим, внаслідок ряду суттєвих недоліків, жовток не є ідеальним компонентом штучних розріджувачів. Основним його недоліком є термолабільність, що позбавляє можливості надійно стерилізувати жовткові розріджувачі загальнодоступними способами [10].

Доведено, що жовток у багатьох випадках є носієм патогенної та умовно-патогенної мікрофлори [10]. При знесенні яйця несучкою, його шкаралупа вступає в контакт з безліччю забруднених мікрофлорою предметів навколишнього середовища (клоаки, повітря, пилу, підстилки та обладнання пташника, яєчних лотків, рук операторів та інше). На шкаралупі виявляють від декількох тисяч до 20–23 мільйонів мікробних клітин [1, 2]. Бактерії, проникаючи через шкаралупу та підшкаралупну оболонку яйця, заражають його, причому, цей процес відбувається дуже швидко, впродовж 30 хвилин після знесення яйця несучкою. Встановлено проникнення через шкаралупу наступних збудників: пуллорозу, тифу, чуми, аспергільозу, мікоплазмозу, сальмонельозу та ряду вірусних інфекцій [2]. З яєць, знесених курами, хворими на туберкульоз, пташиний грип або орнітоз, виділені мікобактерії туберкульозу, вірус H5N1 і збудник пташиного хламідіозу — *Chlamydia psittaci*. Не виключена також можливість додаткової контамінації розріджувача мікрофлорою в умовах племінного підприємства при виготовленні його *ex tempore* [7]. У зв'язку з цим, застосування жовтка в якості захисного компонента кріопротективних розріджувачів становить неконтрольовану загрозу мікробного забруднення сперми і поширення вірус-бактерійних захворювань під час проведення штучного осіменіння, що призводить до порушення репродуктивної функції, абортів, мертвонародженості та безпліддя.

Разом з тим, використання рекомендованих концентрацій жовтка може бути токсичним, що призводить до аглютинації статевих клітин і зниження їх виживаності під час кріоконсервації

[6, 10, 13, 14], втрати прозорості через наявність у жовтку великої кількості жовткових глобул [10]. Ячний жовток так само може бути забруднений залишками фармакологічних препаратів, токсичних для спермій, що використовують у птахівництві при проведенні лікувально-профілактичних заходів. У ячному жовтку виявлені високі концентрації гормону прогестерону, який може провокувати передчасну акросомну реакцію спермій і знижувати їх запліднюючу здатність.

Враховуючи викладене, виникла гостра необхідність виключення зі складу штучних середовищ курячого жовтка та пошуку його заміників з компонентів рослинної природи [8, 12].

Встановлено, що зерна бобових та їх гідролізати містять токсичний елемент нікель, який негативно впливає на цитоплазматичну мембрану спермій [11]. Для зменшення цього впливу нами була проведена робота щодо підбору оптимального співвідношення гідролізатів і порівняння дії різних сорбентів для очищення розріджувача.

**Мета роботи** — захист маточного поголів'я від розповсюдження захворювань, які передаються жовтком курячих яєць через заморожену або охолоджену до  $0^{\circ}\text{C}$  сперму плідників. Підвищення санітарно-гігієнічного рівня штучного осіменіння корів шляхом заміни в розріджувачі компонентів тваринного походження (жовток курячих яєць, лактоза) на рослинні (різні гідролізати бобових) та удосконалення його якості шляхом додаткового очищення сорбентами. Визначення запліднюючої здатності сперми, замороженої у дослідному рослинному фортифіканті з використанням сорбенту.

**Матеріали та методи.** Об'єкт досліджень — нативна, заморожена та деконсервована сперма бугаїв. Досліди проводили на розділених еякулятах. Сперма бугаїв-плідників була отримана та кріоконсервована за Харківською технологією у відділі біотехнології репродукції Інституту тваринництва НААН. Оцінка якості сперми нативної та замороженої була проведена за ДСТУ 35.35-97, ДСТУ 87.78-2018.

Рослинний розріджувач сперми був отриманий із борошна сої та сочевиці червоної методом водно-гліцеринової екстракції згідно винаходу (патент України № 36667 від 10.11.2008 р.). Далі розріджувач був стерилізований методом пастеризації [10]. Термообробку дослідного середовища проводили на водяній бані. В якості контролю було використано стандартне жовткове середовище, призначене для заморожування сперми бугая за харківською технологією [9].

Для дослідження запліднюючої здатності сперми законсервованої в розріджувачі з антишоковими, протективними компонентами рослинної природи було заморожено в дослідному та контрольному розріджувачах по 70 спермодоз і відправлено у господарство. Результати дослідів визначали за такими біологічними показниками: рухливість сперми після відтаювання в балах (а), виживаність в годинах (t).

У господарстві для осіменіння було сформовано 2 групи корів, дослідна та контрольна, по 15 голів за принципом пар аналогів, яких осіменяли маночервікальним способом. Результати запліднюючої здатності визначали за відсутністю повторного стану охоти впродовж 90 діб і ректальними дослідженнями.

**Результати досліджень.** У ході досліджень установили кращу ефективність заморожування сперми бугая у фіторозріджувачі.

За результатами проведених досліджень були отримані наступні результати: у зразку № 1 (екстракт сої): а —  $3,56 \pm 0,18$ ; t —  $4,50 \pm 0,38$  годин; у зразку № 2 (80 % сої: 20 % сочевиці): а —  $4,0 \pm 0,2$ ; t —  $7,2 \pm 0,5$  годин; у зразку № 3 (70 % сої: 30 % сочевиці): а —  $4,5 \pm 1,3$ ; t —  $7,8 \pm 0,4$ ; у контролі: а —  $4,0 \pm 1,3$ ; t —  $7,5 \pm 0,3$  годин.

Отримані дані свідчать про те, що біологічні показники сперми після деконсервації були кращими при використанні гідролізатів бобових у співвідношенні 70 % сої та 30 % сочевиці червоної.

Також були проведені пошукові дослідження щодо оптимізації безжовткових розріджувачів шляхом додавання в них сорбентів у процесі їх виготовлення та наступним їх видаленням шляхом центрифугування з метою підвищення якісних показників сперми (табл.).

В якості сорбентів використовували активоване вугілля стандартне, діоксид кремнію та високодисперсний діоксид кремнію. Сорбенти додавались у відношенні 3 % від об'єму середовища. За результатами досліджень кращі показники виявились у сперми, розрідженої середовищем з використанням діоксиду кремнію високодисперсного.

Таблиця — Якісні показники сперми в залежності від використання різних сорбентів

Показники сперми	Контроль № 1 з екстрактом сої (70 %) та сочевиці (30 %)	Очищення активованим вугіллям стандартним	Очищення діоксидом кремнію	Очищення діоксидом кремнію високодисперсним	Контроль № 2 ЛЖГР (Харківська технологія)
Рухливість (а), бали	4,5 ± 1,3	3,9 ± 1,1	4,9 ± 1,2	5,57 ± 1,0	4,0 ± 1,3
Показник абс. вижив. (Sa)	16,8 ± 1,2	11,2 ± 1,1	17,2 ± 1,3	19,2 ± 1,1	15,8 ± 0,2
Виживаність (t), години	7,8 ± 0,4	5,0 ± 0,5	7,9 ± 0,3	8,7 ± 0,5	7,5 ± 0,3

Результати досліджень (табл.) свідчать, що біологічні показники сперми після деконсервації були вище у зразках, очищених високодисперсним діоксидом кремнію в порівнянні з контролем № 1 і № 2.

**Висновки.** 1. Найкращі біологічні показники сперми бугая були отриманні при використанні полікомпонентного розріджувача рослинного походження, у складі якого міститься 70 % гідролізату з насіння сої та 30 % — з насіння сочевиці з додатковою очисткою сорбентом високодисперсним діоксидом кремнію. Дослід на визначення запліднюючої здатності сперми, замороженої в дослідному розріджувачі у порівнянні з контролем провели через Зміївський племсервіс у господарстві ім. Гагаріна Зміївського району Харківської області. У господарстві відібрано по 15 голів корів у контролі та досліді за принципом пар-аналогів, тобто одного фізіологічного стану, ваги та годівлі за одним раціоном. Результати запліднення були враховані за відсутності повторної охоти до 90 діб після осіменіння.

2. Заплідненість корів у контролі склала 64,3 ± 1,2 %, а у досліді 68,8 ± 1,1 %, що було вище на 4,5 % за рахунок більшої кількості повноцінних спермій у дослідному середовищі. Механізм захисту розріджувача з сумісними компонентами ліпопротеїнів (сої 80 % + сочевиці червоної 20 % + 5 % гліцерину) при кріоконсервації в тому, що вони надають додаткові властивості сперміям, впливають на цитоскелет і мембранні структури спермій. Це сприяє реакції ооцит–спермій при заплідненні (полісахаридний комплекс), захищають мембрани спермій від перекисної деструкції, яка, зазвичай, підсилюється при кріоконсервації (антиоксидантний комплекс), підвищує енергію ослаблених клітин до рівня фізіологічної норми.

### Список літератури

1. Бреславец В. О., Шоміна Н. В., Ракова А. А. Вплив хімічної обробки у другу половину інкубації на мікробну контамінацію та виводимість яєць. *Ветеринарна медицина : міжвідом. темат. наук. зб.* 2005. Вип. 85, т. 1. С. 164–169.
2. Загаевский И. Источники обсеменения яиц микрофлорой и их дезинфекция. *Птицеводство.* 1969. № 6. С. 33–34.
3. Милованов В. К., Селиванова О. А. Разбавители для спермы сельскохозяйственных животных. *Проблемы животноводства.* 1932. № 2. С. 75–86.
4. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных : монография. Москва : Изд. с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1962. 696 с.
5. Осташко Ф. И. О природе холодого удара живчиков. *Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. НИИЖЛП УССР.* Харьков, 1963. С. 22–41.
6. Осташко Ф. И., Павленко М. П. Способ консервирования спермы животных : а. с. № 523693. 1974.
7. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев : Урожай, 1978. 255 с.
8. Осташко Ф. И. Павленко М. П., Павленко Л. Н. Новый фортификант плазматических мембран и его влияние на биологические показатели спермиев быков при консервации. / *з'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини* (Харків, 18–20 жовтня 1995 р.). Харків, 1995. С. 188–189.
9. Павленко М. П. Усовершенствование и разработка технологии кріоконсервации спермы быков-производителей : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Харьков, 1981. 18 с.
10. Павленко Л. М. Довгозбережене середовище для кріоконсервації сперми бугаїв та способи його виготовлення : автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. Харків, 1999. 19 с.
11. Павленко Л. М., Павленко Б. М., Орбченко О. Л., Дідик Т. Б., Болотін В. І., Бойко В. В., Беседа Н. В. Вивчення фізико-хімічних показників, мікроелементного складу гідролізатів бобових і їх вплив на кріобіологічні параметри сперми бугаїв-плідників. *Ветеринарна медицина : міжвідом. темат. наук. зб.* 2018. Вип. 104. С. 276–280.

12. Павленко Л. М., Павленко Б. М., Павленко М. П. Изучение антишокового действия и санитарных свойств растительных модификаторов, цитоплазматических мембран при консервации спермы быков. *Науково-технічний бюлетень*. 1996. С. 315–321.
13. Ostashko F. I., Pavlenko M. P., Pavlenko L. N. Antychock effect of yolk and components in cooling spermatozooids of bull, ram and boar. *10<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction*. Illinois (USA), 1984. Vol. 1. P. 209–211.
14. Phillips P. H., Lardy H. A. A yolk-buffered pabulum for the preservation of the bull semen. *J. Dairy Sci.* 1940. Vol. 23. P. 394–396.

## THE RESULTS OF CRYOPRESERVATION OF BULL SPERM IN VEGETABLE FORTIFIER USING SORBENT

**Pavlenko L. M., Stegnyy B. T., Didyk T. B., Pavlenko B. M.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine*

*The paper presents results of the production and use of the phytofortificant of cytoplasmic sperm membranes based on legume hydrolysate with additional purification with sorbents for cryopreservation of bull sperm as an alternative to yolk diluents. The aim of the research was to achieve biosafety, that is, to avoid infectious gynecological diseases, agents of which can be transmitted by the yolk, to increase the fertility rate of females after artificial insemination and to create the conditions for the development of new long-term cryoprotective diluents. It has been established that legumes grain and their hydrolysates contain a toxic nickel element that adversely affects the cytoplasmic membrane of sperm. To reduce this influence, we conducted a study of the action of different sorbents. Activated charcoal standard, silicon dioxide and fine silica were used as sorbents. Sorbents were added in relation of 3% of the volume of medium. According to the results of the studies, the best results were in semen, diluted with medium using high-dispersion silicon dioxide*

**Keywords:** cryopreservation, semen of bulls, phyto-diluent, soy and lentil extract, sorbents, biosafety, cows, fertilization

УДК 619:616.98-036.22:578.824.11

DOI 10.36016/VM-2019-105-16

## АКТИВНІСТЬ АНТИРАБІЧНИХ АНТИТІЛ У СИРОВАТКАХ КРОВІ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЗБЕРІГАННЯ

**Рудой О. В., Дзюба Я. М., Полупан І. М.**

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ, Україна, e-mail: [vetmedic@ukr.net](mailto:vetmedic@ukr.net)*

*У статті представлені результати дослідження стабільності титрів антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання. Встановлено, що оптимальною умовою зберігання сироваток крові є заморожування за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ . Заморожування зразків показало стабільність збереження рівня антирабічних антитіл протягом 84 днів. Максимальний термін зберігання сироваток крові за температури  $+4^{\circ}\text{C}$  становив 14 днів. Повторні цикли заморожування-розморожування критично впливали на показники активності антирабічних антитіл, на рівні 3-го циклу титри антирабічних антитіл у сироватках крові були у два-три рази менші ніж вихідні значення*

**Ключові слова:** сироватки крові, антирабічні антитіла, титр антитіл, умови зберігання, температура

Правильний відбір, пересилання й зберігання дослідних проб є необхідною умовою для забезпечення отримання достовірних результатів лабораторних досліджень. Відомо, що «збереженість антитіл» для лабораторних досліджень становить від кількох тижнів до багатьох років, що залежить від властивостей останніх і умов зберігання [1]. Однак для кожного антитіла є як загальні рекомендації, так і свої оптимальні умови щодо зберігання [2].

Нетривале зберігання антитіл відбувається, як правило, за температури  $\leq 4^{\circ}\text{C}$  у стерильних пробірках від одного до декількох тижнів. За більш високих температур відбуваються хімічні реакції, такі як окислення та протеолітична деградація білку, що може бути наслідком мікробного обмінення. Крім того, очищені антитіла за температури  $4^{\circ}\text{C}$  можуть осаджуватись.