

Исследование влияния концентрированной криозащитной среды на выживаемость и оплодотворяющую способность деконсервированной спермы быков

UDC 547.42:591.463.1.085.54.043

B.M. PAVLENKO

Study of Effect of Concentrated Cryoprotective Medium on Survival and Fertilizing Ability of Frozen-Thawed Bovine Sperm

Приведены результаты исследований по оптимизации криозащитных и санитарных показателей желтоксодержащей среды. Установлено, что концентрирование желтоксодержащей среды и прогрев концентрата при 75°C в течение 30 мин обеспечивает стерильность и стабильность криозащитных свойств при хранении его в условиях комнатной температуры не менее 12 месяцев.

Ключевые слова: эякулят, сперма, желток, сахароза, глицерин, стерилизация, денатурация, спермодоза, криоконсервирование.

Наведено результати досліджень по оптимізації криозахисних і санітарних показників середовища, яке містить жовток. Встановлено, що концентрування такого середовища і прогрів концентрату при 75°C на протязі 30 хв забезпечує стерильність і стабільність криозахисних властивостей при зберіганні його в умовах кімнатної температури не менше 12 місяців.

Ключові слова: еякулят, сперма, жовток, сахароза, глицерин, стерилізація, денатурація, спермодоза, криоконсервування.

The research results on optimization of cryoprotective and sanitary indices of yolk-containing medium were presented. It has been established that concentrating of yolk-containing medium and a concentrate warming at 75°C for 30 min provided sterility and stability of cryoprotective properties at its storage at room temperature conditions for 12 months as minimum.

Key-words: ejaculate, sperm, yolk, sucrose, glycerol, sterilization, denaturation, sperm dose, cryopreservation.

При криоконсервировании спермы одним из компонентов криозащитных сред является желток куриных яиц в концентрациях 20-30%, ограничивающий их срок хранения до одних суток [7, 8, 16, 17]. Часто желток бывает носителем микобактерий туберкулёза [8], возбудителем пуллороза, тифа, чумы, аспергиллёза, микоплазмоза и сальмонеллёза [8, 12], что может вызвать микробную контаминацию генетического материала и затем нарушить репродуктивную функцию самок. Не исключена также дополнительная контаминация сред микрофлорой окружающего воздуха при приготовлении их *ex tempore* в условиях племенных предприятий [2, 9].

Для стерилизации термолабильных биологических сред применяют физические, химические и механические способы: лиофилизацию, пастеризацию, тиндализацию, ультрафильтрацию, ультразвуковую и радиационную стерилизацию, химическую стерилизацию окисью этилена и β-пропилактоном. Однако эти способы неприемлемы для стерилизации желтоксодержащих сред из-за денатурации желтка, перекисного окисления липидов, токсичности и технических сложностей процесса обеззараживания [6, 13].

One of the cryoprotective media components at sperm cryopreservation is 20-30% yolk of chicken eggs restricting their storage term for one day [7, 8, 16, 17]. Often the yolk is the carrier of the Koch's bacillus [8], pullorosis agent, typhus, St. Sebastian's disease, aspergillosis, mycoplasmosis, salmonellosis [8, 12] that may evoke a microbial contamination of genetic material and then disorder a female reproductive function. Other contamination of medium with environmental air microflora at their preparing *ex tempore* under conditions of breeding establishments also is not excluded [2, 9].

For sterilization of thermolabile biological media the physical, chemical and mechanical ways: lyophilization, pasteurization, tinadelization, ultrafiltration, ultrasound and radiation sterilization, chemical sterilization by ethylene oxide and β-propyl acton are used. However these ways are not acceptable for sterilization of yolk-containing media due to yolk denaturation, lipid peroxidation toxicity and technologic problems of asepsis process.

The research aim is the designing of the stored for a long time concentrated cryoprotective medium for freezing of bovine sperm on the base of yolk, glycerol, carbohydrates and a method of its industrial production.

Институт животноводства УААН, г. Харьков

* Адрес для корреспонденции: ул. 7-й Гв. Армии, 3, п.о. Кулинич, Харьковская обл. Украина 62404; тел.: +38 (057) 740-33-16, факс: +38 (057) 740-31-79, электронная почта: it_uaan@bk.ru

Institute of Cattle Breeding of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine

*Address for correspondence: 3, 7th Gv. Armii str., Kharkov region, Ukraine 62404; tel.: +380 57 740 3316, fax: +380 57 740 3179, e-mail: it_uaan@bk.ru

Цель исследований – создание долгохранящейся концентрированной криозащитной среды для замораживания спермы быков на основе желтка, глицерина, углеводов и способа её промышленного производства.

Материалы и методы

Объектами исследований были нативная, замороженная и отогретая сперма быков, криопротекторные среды и их составляющие: желток куриных яиц, лактоза, сахароза и глицерин. Для контроля использовали криопротекторную лактозо-глицерин-желточную среду [9, 10, 14, 15], применяемую для криоконсервирования спермы по Харьковской технологии (лактоза – 8,0; глицерин – 7,0; желток – 30,0 и вода дистиллированная – до 100 мл).

В основу исследований положена гипотеза о возможности достижения стерильности среды концентрированием в желтке углевода и глицерина, обладающих бактериостатическими свойствами при дополнительной температурной обработке.

Для опытов использовали сперму быков-производителей чёрно-пёстрой породы в возрасте 2-7 лет. Объём и количество половых клеток, их подвижность, выживаемость и бактериальную загрязненность определяли согласно действующему стандарту на нативную и замороженную сперму [3].

Температурный шок половых клеток, обработанных опытной средой, вызывали перенесением термостатированного при 18°C образца спермы объёмом 0,1 мл в пробирку, охлаждённую до 0°C [5]. Коэффициент криорезистентности спермиев вычисляли по формуле:

$$R = \frac{a_2}{a_1},$$

где $\frac{a_2}{a_1}$ – отношение подвижности спермиев после криовоздействия к показателю их подвижности до криовоздействия, баллы.

Показатель абсолютной выживаемости деконсервированных спермиев вычисляли по [6]:

$$Sa = a_1 + (at)_n,$$

где a_1 – подвижность спермиев непосредственно после деконсервирования, баллы; a – подвижность спермиев через определённые промежутки времени в условиях инкубирования их при 38°C, баллы; t – время между предыдущим и последующим определением подвижности спермиев, ч.

Концентрирования углеводов и глицерина в криозащитной среде достигали суспензированием дисахаридов (лактозы и сахарозы) и глицерина непосредственно в курином желтке. В полученные суспензии добавляли дистиллированную воду (0; 15,5; 31; 46,5 и 62 мл), что обеспечивало различные

Materials and methods

The research objects were native frozen and thawed bovine sperm cryoprotective media and their components: chicken eggs' yolk, lactose, sucrose and glycerol. For the control we used the cryoprotective lactose-glycerol-yolk medium [9, 10, 14, 15] used for the sperm cryopreservation according to the Kharkov technique (8.0 lactose; 7.0 glycerol, 30.0 yolk and distilled water up to 100 ml).

In the base of the research there was laid the hypothesis on possible achieving the medium sterility by concentrating in the yolk of carbohydrates and glycerol having bacteriostatic properties at other temperature treatment.

For experiments we used 2-7 years aged the sperm of servicing bulls of black-and-white breed. Volume and number of sexual cells their motility, survival and bacterial contamination were examined according to the functional standard on native and frozen sperm [3].

Temperature shock of sexual cells treated with the experimental medium was induced by removal of thermostated 0.1 ml sperm sample at 18°C in the vial cooled down to 0°C [5]. Coefficient of spermatozoa cryoresistance was counted according to the formula:

$$R = \frac{a_2}{a_1},$$

where $\frac{a_2}{a_1}$ – the ratio of spermatozoa motility after

cryoeffect to the index of their motility prior to cryoeffect, points.

Index of the absolute survival of frozen-thawed spermatozoa was counted according to the formula:

$$Sa = a_1 + (at)_n, [6]$$

where a_1 – sperm motility just after freeze-thawing, points; a – sperm motility at intervals during their incubation at 38°C, points; t – the time between previous and following determination of the sperm motility, hrs.

The concentrating of carbohydrates and glycerol with suspension of disaccharide (lactose and sucrose) and glycerol directly in chicken yolk was achieved. Into the obtained suspensions the distilled water (0, 15.5; 31; 46.5 and 62 ml) was added, and thereby provided different extense of lactose and glycerol concentrations in yolk.

The effect of different yolk (15, 20, 25 and 30%) and glycerol (2, 3, 4, 5, 6, and 7%) concentrations was studied in sperm cells during freezing. Solubility extent in yolk for disaccharide and thermal stability level of the obtained thermolabile suspensions in the cryopreservation medium composition was examined. During developing of the medium sterilization method there were determined the temperature limits, not causing the yolk coagulation. Experimental and control media were packed and kept on water bath with exposures of 10,

степени концентрирования лактозы и глицерина в желтке.

Изучали влияние на спермии при замораживании различных концентраций желтка (15, 20, 25 и 30%) и глицерина (2, 3, 4, 5, 6 и 7%) В составе среды консервирования определяли степень растворимости дисахаридов в желтке и уровень термоустойчивости полученных термолабильных суспензий. При разработке способа стерилизации среды устанавливали пределы температур, не вызывающие коагуляции желтка. Опытные и контрольные среды расфасовывали и выдерживали в водяной бане с экспозициями 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин при температурах 60, 65, 70, 75 и 80°C. Гомогенной считали среду, в которой после её гидратации в поле зрения микроскопа равномерно распределялись желточные глобулы. Склеивание их в отдельные конгломераты указывало на температурную денатурацию желтка.

Для сравнительных опытов как основные составляющие усовершенствованной среды использовали нативный желток куриных яиц объёмом 25 мл, в котором растворяли 8,0 г сахарозы. В полученную суспензию вносили 5,0 мл глицерина без добавления воды. После температурной обработки суспензию хранили в концентрированном виде, а непосредственно перед разбавлением спермы концентрат среды дополнительно растворяли дистиллированной водой до уровня оптимальной осмомолярности. При изучении влияния сроков хранения сред на их качество по санитарным показателям и стабильности защитных свойств в изготовленную среду в качестве модельной микрофлоры вносили тест-культуры микроорганизмов *E. Coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bac. Subtilis*, а также вирусы инфекционного ринотрахеита (ИРТ) и вирусной диареи (ВД). В опытные пробы на 1 мл среды вносили по 250 тыс микробных клеток, а вирусов – из расчёта 50 единиц цитопатического действия (ЦПД) в 1 мл среды. Микробиологические исследования опытных сред после заражения проводили общепринятыми методами [1]. Результаты бактериологических исследований учитывали по количеству выявленных в исследуемом материале колониеобразующих единиц (КОЕ), а вирусов – по учтённым единицам ЦПД. Среда герметизировали в стеклянных ампулах и прогревали на водяной бане при температуре 75°C в течение 30 мин. После этого их выдерживали в условиях комнатной температуры 12 месяцев. Качество сред оценивали через каждые 3 месяца определением общей бактериальной загрязнённости и Коли-титра.

Сперму замораживали конвекторным способом, обеспечивающим дозированное высокоскоростное

20, 30, 40, 50 and 60 min at temperatures of 60, 65, 70, 75 and 80°C. The medium was considered as homogeneous, if after its hydration the yolky globules evenly distributed in a microscope vision field. Their agglutination to the isolated conglomerates pointed to yolk temperature denaturation.

For competitive experiments as basic components of the improved medium there was used 25 ml native chicken yolk, where 8.0 g sucrose was diluted, into the obtained suspension 5.0 glycerol was added with no water. After temperature treatment the suspension was stored in as a concentrated one, but just prior to the sperm dilution the medium concentrate was additionally diluted with distilled water up to the optimal osmolarity. When investigating the effect of medium storage terms on their quality on sanitary indices and stability of protective properties in the produced medium as a model microflora the test-cultures *E. Coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bac. subtilis* microorganisms and virus of the infectious rhinotracheitis (VIR) as well as virus diarrhea (VD) were introduced. In the experimental tests per 1 ml medium 250 thousands of microbial cells and viruses were introduced and as for viruses it was assumed as basis 50 units of the cytopathic effect (CPE) in 1 ml medium. Microbiological investigations of experimental medium after infection were performed with the standard methods [1]. There were performed the results of bacteriological research on the number of revealed colony-forming units (CFU) in the material under examination and for the viruses this was done on the recorded CPD units. The media were sealed in glass ampoules and warmed on water bath at 75°C for 30 min. Afterwards they were maintained at room temperature for 12 months. Medium quality was estimated quarterly with determining total bacterial contamination and Coli-titer.

Sperm were frozen with convector method providing dosed high-rate cooling of the sealed sperm doses [11]. Results were statistically processed by Student's method using Statgraph software [5].

Results and discussion

The possibility of decreasing the yolk and glycerol concentrations in cryoprotective medium composition to reduce their toxic effect on sexual cells was studied in the first series of experiments. Maximum cell motility was observed in the media samples with 20-25% yolk concentration. Sperm motility in them made 4.5 points, 7.0 hrs survival at 38°C and 20 rel. units index of absolute survival. Maximum sperm motility was observed during freeze-thawing in the medium with 5% glycerol. In comparison with 7% glycerol concentration after freeze-thawing we observed an increase for the sperm activity by 0.4 points, 0.5 for the survival, 4.3 rel. units for absolute survival index.

охлаждение герметизированных спермодоз [11]. Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента с использованием программного пакета "Statgraph" [5].

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов изучали возможность снижения в составе криозащитной среды концентрации желтка и глицерина для уменьшения их токсического влияния на половые клетки. Максимальную подвижность клеток наблюдали в образцах сред с концентрацией желтка 20-25%. Подвижность спермиев в них составляла 4,5 балла, выживаемость при температуре 38°C – 7,0 ч, а показатель абсолютной выживаемости – 20 усл. ед. Максимальная подвижность спермиев наблюдалась при замораживании-оттаивании в среде с 5% глицерина. По сравнению с 7%-й концентрацией глицерина после замораживания-оттаивания наблюдали повышение активности спермиев на 0,4 балла, выживаемости – на 0,5 ч, показателя абсолютной выживаемости – на 4,3 усл. ед.

Прогревание концентрированной среды до 75°C и хранение на протяжении 30 суток при 4°C не изменяли её криозащитные свойства: подвижность после замораживания-отогрева спермиев оставалась на уровне контроля (стандартная лактозо-глицерин-желточная среда, не подвергавшаяся термической обработке). Активность после разбавления составляла 7,2±0,01 балла, после замораживания-оттаивания – 4,8±0,02 балла, а показатель абсолютной выживаемости спермиев при температуре тела животных – 17,5±0,5 усл. ед.

В процессе изготовления и хранения концентрированных сред выявлена неудовлетворительная растворимость лактозы, проявляющаяся в образовании гетерогенной суспензии и её расслоении.

Анализ физико-химических свойств дисахаридов показал, что наиболее пригодной для изготовления концентрированных криопротекторных сред спермы является сахароза. Поэтому в следующем опыте нами была изучена эффективность замены в исследуемых средах лактозы на сахарозу. При этом после замораживания-оттаивания лучшая выживаемость половых клеток была достигнута при использовании сахарозы. Подвижность спермиев составила 5,0 баллов, выживаемость их при 38°C – 9,2 ч, показатель абсолютной выживаемости спермиев при температуре тела животных – 18,6 усл. ед.

Установлено, что замена лактозы на сахарозу обеспечила гомогенность среды за счет полного растворения сахарозы в желтке. Данные исследований по определению максимально допустимых температур, не вызывающих коагуляции желтка в условиях высокогипертоничных концент-

Warming of the concentrated medium up to 75°C and the storage for 30 days at 4°C, did not change its cryoprotective properties: motility after sperm freeze-thawing remained at the control level (standard lactose-glycerol-yolk medium subjected to thermal treatment). The activity after dilution was 7.2±0.01 points, 4.8±0.02 points after freeze-thawing, and 17.5±0.5 rel. units for the index of the spermatozoa absolute survival at animal's body temperature.

During preparing and storage of the concentrated media unsatisfactory solubility of lactose, manifesting in the formation of heterogeneous suspension and its stratification was found.

Analysis of the physical-chemical properties of disaccharides showed that the most appropriate for preparing the concentrated cryoprotective media of sperm was sucrose. So, in the next experiment the substitution efficiency of lactose to sucrose was studied in the media under study. Herewith after freeze-thawing the highest survival of sexual cells was achieved when using sucrose. Sperm motility was 5.0 points, their survival at 38°C was 9.2 hrs, 18.6 rel. units for absolute survival index of spermatozoa at animal's body temperature.

It has been established that the substitution of lactose to sucrose provided medium homogeneity due to total dilution of sucrose in yolk. Research data for determining of the maximum admissible temperatures, not causing yolk coagulation under high hypertonic sucrose and glycerol concentrations were shown in Table 1.

It has been established that the medium concentrating contributes to an increase of temperature point of yolk coagulation up to 80°C. So, at 75°C a yolk denaturation in the experimental medium did not appear for 30-mins' exposure, meanwhile as in the control it was recorded after 10-mins' exposure at 70°C. The obtained data show the possibility of application for sterilization of the experimental medium either at 80°C for 20 min or for 30 min at 75°C.

Thus, concentrated media in comparison with standard diluters have higher stability to high temperatures that provides a sterilization safety.

According to the obtained data experimental medium was prepared, it was firstly tested as for spermatozoa cryoresistance within the range of positive temperatures and then we determined its efficiency at sperm freezing. It has been established that the spermatozoa diluted with the experimental medium, which was warmed at 75°C for 30 min kept their survival at the control level with non-warmed medium. Motility of spermatozoa diluted of experimental medium after temperature shock decreased from 7.9±0.05 to 5.2±0.05 points and the coefficient of cell cryoresistance was 0.65±0.04. The same results were obtained when using the medium not been subjected to temperature

Таблица 1. Влияние режима термообработки концентрированной среды с желтком на агрегатное состояние разбавителя

Table 1. Effect of thermal treatment regimen of concentrated medium with yolk on diluter aggregate state

Среда Medium	Температура водяной бани, °С Temperature of water bath, °C	Экспозиция среды в водяной бане, мин Medium exposure in water bath, min					
		10	20	30	40	50	60
СГЖК (опыт) SGYCM (experiment)	60	-	-	-	-	-	-
ЛГЖ (контроль) LGY (control)		-	-	-	-	-	-
СГЖК (опыт) SGYCM (experiment)	65	-	-	-	-	-	-
ЛГЖ (контроль) LGY (control)		-	-	-	-	-	-
СГЖК (опыт) SGYCM (experiment)	70	-	-	-	-	-	-
ЛГЖ (контроль) LGY (control)		-	+	+	+	+	+
СГЖК (опыт) SGYCM (experiment)	75	-	-	-	+	+	+
ЛГЖ (контроль) LGY (control)		+	+	+	+	+	+
СГЖК (опыт) SGYCM (experiment)	80	-	-	+	+	+	+
ЛГЖ (контроль) LGY (control)		+	+	+	+	+	+

Примечание: СГЖК – сахарозо-глицерин-желточная концентрированная среда; ЛГЖ – стандартная лактозо-глицерин-желточная среда; (+) – наличие коагуляции желтка; (-) – отсутствие коагуляции желтка.

Notes: SGYCM - sucrose-glycerol-yolk concentrated medium; LGY – standard lactose-glycerol-yolk medium; (+) – presence of yolk coagulation; (-) – absence of yolk coagulation.

раций сахарозы и глицерина, приведены в табл. 1.

Установлено, что концентрирование среды способствует повышению температурной точки коагуляции желтка почти до 80°C. Так, при 75°C денатурация желтка в исследуемой среде не наступала в течение 30-минутной экспозиции, в то время как в контроле она зарегистрирована после 10-минутной экспозиции при температуре 70°C. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения для стерилизации опытной среды при 80°C в течение 20 мин или при 75°C – 30 мин.

Таким образом, концентрированные среды по сравнению со стандартными разбавителями имеют более высокую стойкость к повышенным температурам, что обеспечивает надёжность стерилизации.

С учётом полученных данных была изготовлена исследуемая среда, которую сначала проверили на криорезистентность спермиев в диапазоне положительных температур, а затем определили её эффективность при замораживании спермы. Установлено, что спермии, разбавленные экспериментальной средой, которую прогревали при 75°C в течение 30 мин, сохраняли свою выживаемость на уровне контроля, в котором использовали

treatment with 0.65 ± 0.03 cryoresistance coefficient. Research results prove that concentrated medium after warming at high temperatures (75-80°C) do not lose its cryoprotective properties.

For determining the protective activity of thermally treated medium, the effect on bovine sperm quality indices has been studied during freeze-thawing. Table 2 shows these research results.

Table data show higher survival of frozen-thawed spermatozoa in the experimental SGYCM in comparison with the control. Index of spermatozoa absolute survival in the experiment made 23.8 vs 15.3 rel.units in the control.

Thus, the proposed medium in comparison with standard one provides more efficient protection of the spermatozoa from cryodestructions at their preservation.

In the next experiment we studied sanitary conditions' efficiency of the proposed preparing method of concentrated preservative, i.e. thermal treatment in the conditions of artificial contamination with bacteria and viruses isolated from reproductive tracts of cows with endometritis. Simultaneously we determined the protective from cryodestruction media effect on bovine sperm during deep freezing in liquid nitrogen. Research results are shown in Tables 3, 4.

непрогретую среду. Подвижность разбавленных исследуемой средой спермиев после температурного шока снижалась с $7,9 \pm 0,05$ до $5,2 \pm 0,05$ балла, а коэффициент криорезистентности клеток составлял $0,65 \pm 0,04$. Аналогичные результаты получены при использовании среды, которую не подвергали температурной обработке, с коэффициентом криорезистентности $0,65 \pm 0,03$. Результаты исследований доказывают, что концентрированная среда после прогревания при высоких температурах ($75-80^\circ\text{C}$) не теряет своих криозащитных свойств.

Для определения защитного действия термически обработанной среды изучено её влияние на качественные показатели спермы быка при её замораживании-оттаивании. Результаты этих исследований приведены в табл.2.

Данные таблицы свидетельствуют о получении более высокой выживаемости замороженно – отогретых спермиев в опытной СГЖК среде по сравнению с контролем. Показатель абсолютной выживаемости спермиев в опыте составлял 23,8 (в контроле – 15,3) усл. ед.

Таким образом, предложенная среда по сравнению со стандартной обеспечивает более эффективную защиту спермиев от криоповреждений при их консервировании.

В следующем опыте изучали санирующую эффективность предложенного способа изготовления концентрированного консерванта – термообработки в условиях искусственного загрязнения его культурами бактерий и вирусов, выделенных из половых путей коров, больных эндометритом. Параллельно с этим определяли защитное от криоповреждений воздействие сред на сперму быков при глубоком её замораживании в жидком азоте. Результаты исследований приведены в табл. 3 и 4.

Полученные данные показывают, что концентрирование и нагрев среды обеспечивают высокую выживаемость спермиев и стерильность среды, что может служить основанием для внедрения в практику нового варианта среды и способа её изготовления.

Опыты по определению оплодотворяющей способности спермы в зависимости от использованной для её криоконсервирования среды проведены в сельскохозяйственном кооперативе “Восток” Изюмского р-на Харьковской области.

Применение этой среды дало возможность получить оплодотворение на уровне 76,0%, а при стандартной среде – не более 65,7 %. Кроме того, термическая обработка среды лишает белковые компоненты желтка вредной для спермиев неспецифической иммунологической настроенности [4, 6].

Таблица 2. Влияние термически обработанной исследуемой среды на качественные показатели спермы быков-производителей при её замораживании-оттаивании (n = 10)

Table 2. Effect of thermally treated medium under study on qualitative indices of servicing bulls' sperm during freeze-thawing (n=10)

Показатели качества спермы Sperm quality indices	ЛГЖ (контроль) LGY (control)	СГЖК (опыт) SGYCM (experiment)
Подвижность после разбавления Motility after dilution	$7,3 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,2$
Подвижность после замораживания – оттаивания Motility after freeze – thawing	$4,5 \pm 1,2$	$4,7 \pm 1,2$
Абсолютная выживаемость Absolute survival	$15,3 \pm 0,02$	$23,8 \pm 0,02$
Выживаемость, ч Survival, hrs	$7,5 \pm 0,05$	$9,3 \pm 0,05$

The obtained data show that concentrating and warming of the medium provide high sperm survival and medium sterility that may be the base for practical application of new medium variant of its production method.

The experiments for the determining of sperm fertilizing ability were carried out depending on the used for its cryopreservation medium in “Vostok” agricultural cooperative of Izumskiy district (Kharkov region).

Use of this medium provided 76.0% fertilization and maximum 65.7% at the standard one. In addition, thermal treatment of medium deprives the yolk protein components of damaging for the spermatozoa non-specific immunological directivity [4, 6].

The comparison data of suggested variant with the prototype have been shown in Table 5.

Data of Table 5 indicate that suggested cryoprotective medium for sperm preservation of breeders in comparison with the prototype has the following advantages:

Expenses for purchasing of glass ampoules and for the storage and transportation of produced media too are reduced in 2.5 times.

At the storage and delivery to a consumer of the batches of media in cold season the possibility of failure of sealed glass ampoules with media (cracking) due to a decrease of concentrate freezing point is excluded.

The keeping of stability of sanitary and biological quality of the medium during two years' storage is achieved.

Survival and fertilizing ability of spermatozoa are increased by 17% due to elimination of toxic and microbial factors.

The temperature point of yolk denaturation increases that makes possible the use of higher temperatures

Таблица 3. Влияние термообработки консерванта, искусственно контаминированного тест- культурами микроорганизмов, на его санитарную стабильность при хранении

Table 3. Effect of thermal treatment of preservative artificially contaminated with microorganism test-cultures on its sanitary stability during storage

Тест – культура микроорганизмов Mi croorganism test – cultures	Микробная загрязнённость консерванта (микробных тел в 1,0 см ³) Bacterial contamination of the preservative (mi crobial bodies in 1.0 cm ³)		
	до внесения микроорганизмов before introduction of mi croorganisms	после внесения микроорганизмов after introduction of mi croorganisms	после термообработки и хранения в течение 12 месяцев after thermal treatment and storage for 12 months
<i>E. coli</i>	Стерильно Sterile	250 тыс. м.к./см ³ 250 thousands mi crobial bodies/cm ³	Стерильно Sterile
<i>Proteus vulgaris</i>	–	250 тыс. м.к./см ³ 250 thousands mi crobial bodies/cm ³	–
<i>Staphilococcus aureus</i>	–	250 тыс. м.к./см ³ 250 thousands mi crobial bodies/ cm ³	–
<i>Streptococcus faecalis</i>	–	250 тыс. м.к./см ³ 250 thousands mi crobial bodies/ cm ³	–
Вирус ИРТ IRT Virus	–	ЦПА 50/см ³ CPD 50/cm ³	–
Вирус ВД VD Virus	–	ЦПА 50/см ³ CPD 50/cm ³	–
Контроль (микроорганизмы не вносили) Control (no introduction of mi croorganisms)	–	Стерильно Sterile	–

Таблица 4. Биологическая активность деконсервированной спермы в зависимости от сроков хранения консерванта

Table 4. Biological activity of frozen-thawed sperm depending on preservative storage terms

Подвижность половых клеток после замораживания – оттаивания спермы,баллы, в зависимости от сроков хранения ,мес Motility of sexual cells after sperm freeze – thawing depending on storage terms, months									
0		3		6		9			
Опыт Experiment	Контроль Control	Опыт Experiment	Контроль Control	Опыт Experiment	Контроль Control	Опыт Experiment	Контроль Control	Опыт Experiment	Контроль Control
5,0	4,5	5,0	4,0	4,5	4,0	4,5	4,5	5,0	4,5

Данные сравнения предложенного варианта с прототипом приведены в табл. 5.

Данные табл. 5 свидетельствуют, что предложенная криопротективная среда для консервирования спермы производителей в сравнении с прототипом имеет следующие преимущества.

В 2,5 раза сокращаются затраты на приобретение стеклянных ампул, а также на хранение и транспортировку изготовленных сред. При хранении и поставке потребителю партий сред в холодное время года исключается возможность нарушения герметичности стеклянных ампул со

for the medium warming and provides their reliable sterilization.

Conclusions

It has been established that native yolk provides a complete solubility of sucrose in it and forms homogeneous colloidal solution with glycerol.

It has been established that concentration increase in yolk of sucrose up to 32% and of glycerol up to 20 % makes the conditions for increase of the point of yolk denaturation up to 80°C (65°C in control) that enables the rise in reliability of thermal sterilization of medium.

средой (растрескивание) за счет снижения точки замерзания концентрата. Достигается сохранение стабильности санитарного и биологического качества среды на протяжении двух лет хранения. Повышаются выживаемость и оплодотворяющая способность спермиев на 17% за счет устранения токсичного и микробного факторов. Повышается температурная точка денатурации желтка, что дает возможность использовать более высокие температуры для нагрева среды и обеспечить надежную их стерилизацию.

Выводы

Установлено, что нативный желток обеспечивает полную растворимость в нём сахарозы и образует в комплексе с глицерином гомогенный золь.

Установлено, что повышение концентрации в желтке сахарозы до 32 и глицерина до 20% создаёт условия для повышения точки денатурации желтка до 80°C (65°C в контроле), позволяющие повысить надёжность термической стерилизации среды. Применение концентрирования компонентов желтоксодержащей среды в комплексе с прогревом при 75°C в течение 30 мин обеспечило стерильность предварительно загрязнённой среды и не снизило её защитных свойств при криоконсервировании спермы. Предложенные состав и способ изготовления желтоксодержащей среды позволяют сохранить первоначальные криозащитные и санитарные свойства её в течение 24 месяцев хранения при комнатной температуре (срок наблюдения).

Литература

1. *Балашов Н.Г.* Ветеринарный контроль при искусственном заражении животных.– М.: Колос, 1980.– 272 с.
2. *Варнавский А.Н.* Микробное загрязнение семени сельскохозяйственных животных и меры его устранения // *Животноводство.*– 1963.– №10.– С. 66-68.
3. *ДСТУ 3535-97. Сперма бугаїв нативна.* Технічні умови. – Київ, 1998. – 23 с.
4. *Загаевский И.С.* Источники обсеменения яиц микрофлорой и их дезинфекция // *Птицеводство.*– №6.– 1969.– С. 33-34.
5. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
6. *Милованов В.К.* Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. Монография.– М., 1962.– 696 с.
7. *Осташко Ф.И.* Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота.– Киев: Аграрна наука, 1995.– 180 с.
8. *Осташко Ф.И.* О природе холодового удара живчиков // *Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных: Сб. научных трудов.*– Харьков, 1963.– С. 22-41.
9. *Осташко Ф.И.* Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.– Киев: Урожай, 1978.– 255 с.

Таблица 5. Сравнительная эффективность использования концентрированной долгохранящейся среды
Table 5. Comparative efficiency of use of concentrated medium stored for a long time medium

Показатели Indices	Опыт Experiment	Контроль control
Объем хранящейся среды, мл Volume of stored medium, ml	420	1000
Степень концентрирования Concentrating rate	2,3	0
Количество ампул для расфасовки и хранения среды, шт Number of ampoules for packing and storage of medium, units	8,4	20
Температура кристаллизации среды, °C Crystallization temperature of medium, °C	– 20	– 8
Срок пригодности среды, годы Medium validity term, years	2	–
Выживаемость спермиев после замораживания, % Sperm survival after freezing, %	50	42
Оплодотворяемость коров после первого осеменения, % Fertilization of cows after the first insemination, %	82	65

Use of the concentrating components' of yolk-containing medium jointly with warming at 75°C for 30 min provided the sterility of pre-contaminated medium and did not decrease its protective properties during sperm cryopreservation.

Suggested composition and preparing method for yolk-containing medium make it possible to save original cryoprotective and sanitary properties for 24 storage months at room temperature (observation time).

References

1. *Balashov N.G.* Veterinary control at the artificial infection of animals.– Moscow: Kolos, 1980.– 272 p.
2. *Varnavsky A.N.* Microbial contamination of agricultural animals sperm and methods of its elimination // *Zhivotnovodstvo.*– 1963.– №10.– P. 66-68.
3. *STSU 3535-97. Native sperm of bulls.* State technical standards of Ukraine.– Kiev, 1998.– 23 p.
4. *Zagaevskiy I.S.* Sources of eggs microflora contamination and their disinfecting // *Ptitsevodstvo.*– №6.– 1969.– P.33-34.
5. *Lakin G.F.* Biometry.– Moscow: Vysshaya Shkola, 1990.– 352 p.
6. *Milovanov V.K.* Reproduction biology and artificial insemination of animals: Monography. – Moscow, 1962.– 696 p.
7. *Ostashko F.I.* Reproduction biotechnology of bovine cattle.– Kiev: Agrarna Nauka, 1995.– P.180.
8. *Ostashko F.I.* About character of spermatozoa cold shock // *Artificial insemination of agricultural animals: Coll. of scientific papers.*– Kharkov, 1963.– P. 22-41.
9. *Ostashko F.I.* Deep freezing and long-term storage of servicing bulls' sperm.– Kiev: Urozhay, 1978.– 255 p.
10. *Ostashko F.I., Pavlenko M.P., Pavlenko L.N.* Determining method of anti-shock characteristic of protective components in diluters at the effect of low temperature on spermatozoa // *New in the methods of zootechnic investigations.*– Kharkov, 1992.– P. 138-142.

10. *Осташко Ф.І. Павленко М.П., Павленко Л.М.* Методика визначення антишокових властивостей захисних компонентів в розбавлювачах при дії низьких температур на спермії // Нове в методах зоотехнічних досліджень.– Харків, 1992. – С.138-142.
11. *Павленко Б.М.* Влияние замораживания спермы конвекторным методом на выживаемость и оплодотворяющую способность после деконсервирования // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №2.– С. 173-178.
12. *Павленко М.П.* Усовершенствование и разработка технологии криоконсервации спермы быков-производителей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1981.– 20 с.
13. *Павленко Л.М.* Довгозбережне середовище для криоконсервації сперми бугаїв та способи його виготовлення: Автореф. ... дис. канд. с-г. наук.– Харків, 1999.– 19 с.
14. *Соколов В.Д., Малинин А.И.* О болезнях птиц, передающихся трансвариально // Ветеринария.– 1981. Вып. 8.– С. 66-68.
15. *А.с. СССР №523693. Кл. А61Д7/02.* Способ консервирования спермы животных / Ф.И. Осташко, М.П. Павленко. Заявл. 26.07.1974. Публ. 05.08.1976. Бюл. №29.
16. *Ostashko F.I., Pavlenko M.P., Pavlenko L.N.* Antishock effect of yolk and components in cooling spermatozoa of bull, ram and boar / 10th International Congress of Animal Reproduction and A.I.– Illinois (USA).– 1984.– Vol. 1.– P. 209-211.
17. *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.
11. *Pavlenko B.M.* Effect of sperm freezing with convector method on the survival and fertilizing capacity after freeze-thawing // Problems of cryobiology.– 2007.– Vol.17,№2.– P.173-178.
12. *Pavlenko M.P.* Development and production technologies of servicing bulls' sperm cryopreservation: Authors abstract of the thesis of doctor of biol. science.– Kharkov, 1981.– 20 p.
13. *Pavlenko L.M.* Long-term storage medium for cryopreservation of bovine sperm and methods of its production: Author's abstract of the thesis of doctor of agricul. sciences.– Kharkov, 1999.– 19 p.
14. *Sokolov V.D., Malinin A.I.* About transovarially transmitted avian diseases // Veterinariya.– 1981. Issue 8. – P.66-68.
15. *Author's certificate of the USSA №523693. Cl. A61D7/02.* Cryopreservation method of animals' sperm / F.I. Ostashko, M.P. Pavlenko. Applied 26.07.1974. Publ.05.08.1976. Bull. 29.
16. *Ostashko F.I., Pavlenko M.P., Pavlenko L.N.* Anti-shock effect of yolk and components in cooling spermatozoa of bull, ram and boar / 10th international Congress of Animal Reproduction and A.I.– Illinois (USA).– 1984.– Vol.1.– P. 209-211.
17. *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.

Accepted in 30.03.2007

Поступила 30.03.2007