

ЗАНЯТТЯ № 23

Тема заняття *Зберігання сперм .* *лекція*

План заняття

1. Способи зберігання сперми.
2. Короткочасне зберігання сперми.
3. Довготривале зберігання сперми.

Література: основна / І. Карташов І.І., Шарапа Г.С. «Штучне осіменіння тварин з основами акушерства».-К.: Вища школа,1992

Завдання додому (самостійна робота) Підручник 92-94.

Зберігання сперми і його практичне значення

Розробка способів зберігання сперми поза організмом була і залишається однією з центральних проблем. Вона ґрунтується на глибокому вивченні життєдіяльності спермій.

Спермії відрізняються від інших клітин організму активністю процесів дисиміляції, що призводить до порівняно швидкого витрачання поживних речовин і загибелі. Другою причиною загибелі спермій у процесі зберігання їх поза організмом є отруєння молочною кислотою та іншими продуктами обміну речовин. Тривалість зберігання спермій пов'язана з їхньою якістю використання явища анабіозу для економного витрачання запасів поживних речовин.

Зберігання сперми поза організмом застосовується на всіх племпідприємствах. Сперму зберігають з метою: максимального використання цінних племінних плідників; здійснення правильного племінного добору тварин незалежно від їхнього територіального розміщення; правильного використання плідників за встановленим графіком, щоб уникнути гальмування статевих рефлексів і зниження якості сперми. Є кілька методів зберігання сперми: нетривале зберігання сперми бугаїв, баранів, кнурів і жеребців при температурі 2-5 °С або при кімнатній температурі; тривале зберігання в рідкому азоті сперми бугаїв, баранів і жеребців.

Для зберігання можна використовувати тільки сперму доброї і середньої якості. Спермії з еякулятів зниженої якості швидко втрачають запліднювальну здатність, через що зростає кількість перегулів і яловість маток.

Щоб зберегти життєздатність і запліднювальну здатність спермій протягом тривалого часу, треба загальмувати процеси обміну речовин у сперміях, сповільнити

або зовсім припинити їхній рух. При інтенсивному обміні речовин спермії швидко витрачають запаси поживних речовин, причому у спермі нагромаджуються шкідливі продукти їхнього розпаду.

Є два основних способи сповільнення обмінних процесів: зниження температури і додавання до сперми речовин, що гальмують рух спермій (вугільної, винно-кам'яної та деяких інших органічних кислот, а також хелатону). Слід додати, що останній спосіб дає найкращий ефект також при зниженій температурі зберігання.

Надто швидко охолодження сперми може призвести до загибелі спермій від холодового удару. Тому охолоджувати сперму треба з певною швидкістю, зазначеною в описі окремих методів зберігання. Як правило, при охолодженні в сперму вводять жовток курячого яйця, який трохи пом'якшує холодовий удар.

Зберігаючи сперму за тим чи іншим методом, не можна порушувати встановлений температурний режим. Будь-яке, хоч би короточасне підвищення чи зниження температури, відхилення від рекомендованого рівня зумовлюють ослаблення або навіть загибель спермій.

Обробляти сперму перед зберіганням і зберігати її треба, суворо додержуючись санітарно-гігієнічних вимог щодо чистоти посуду, приміщень тощо. Сперму слід зберігати в темряві. Методи зберігання сперми плідників удосконалюються, і на зміну нетривалому зберігання прийшов спосіб тривалого зберігання сперми в замороженому стані.

Сануючі речовини (антибіотики, хіміотерапевтичні речовини) додають у розріджувачі з метою гальмування росту мікробів, а ферменти і гормони - для підвищення скорочення м'язів матки, більш швидкого просування спермій тощо.

Способи зберігання сперми

Залежно від специфіки роботи племоб'єднань, їхнього матеріально-технічного забезпечення та умов роботи пунктів у господарствах застосовують нетривале або тривале зберігання сперми плідників.

Нетривале зберігання сперми. Сперму бугая, барана, жеребця і кнура, розбавлену глюкозоцитратно-жовтковим чи хелатоновим розріджувачами,

зберігають при температурі 2-5 °C або 16-20 °C протягом 1-3 діб. Сперму бугая і барана транспортують у харчових термосах з широкою шийкою, сперму жеребців - у

спеціальних термосах-ящиках або харчових термосах з широкою шийкою. Для зберігання і транспортування сперми кнурів використовують термоси-ящики та побутові сумки-холодильники.

Розбавлену сперму бугая і барана розфасовують і зберігають у простерилізованих скляних флаконах і ампулах.

Важливою умовою зберігання розбавленої сперми є поступове її охолодження і підтримання постійного температурного режиму за допомогою термосів. Розбавлену сперму поступово охолоджують до кімнатної температури (18-25°C). Наповнені спермою флакони чи ампули вставляють у гумовий або поліетиленовий мішечок і підв'язують міцною ниткою. Потім обгортають шаром вати і упаковують у поролоніві амортизатори для рівномірного охолодження в термосах до температури 2-5 °C.

На дно термоса кладуть шар вати і до половини його засипають кусочками льоду. Потім у нього вставляють підготовлену сперму і зверху засипають шаром льоду.

Термос закривають пробкою і кришкою. Щоб вийняти упаковану сперму із термоса, треба потягти за кінець нитки, яка знаходиться зверху. При використанні збереженої сперми у разі потреби в термос періодично до-бавляють кусочки льоду.

Сперму на пунктах штучного осіменіння можна зберігати в холодильниках при температурі 2-5 °C. Розбавлена сперма бугая при правильному зберіганні придатна для осіменіння самок протягом 2-3 діб, а барана - до 24-36 год. Для осіменіння допускається сперма бугая з активністю спермійів не менш як 7 балів і барана 8 балів.

Сперму кнура можна використовувати нерозбавленою протягом 2-3 год після її одержання. Сперму, розбавлену хелатоновими середовищами, розфасовують у поліетиленові флакони або скляні ампули. Отвори посудин тимчасово закривають пергаментним папером або целофаном, фіксуючи їх

гумовим кільцем. На пункти сперму доставляють у спеціальних термосах, де її зберігають у погрібцях-термосах при температурі 16-20 °C і використовують протягом 3 діб.

Для оцінки рухливості спермійів слід користуватися підлужним розчином (натрію хлориду - 450 мг, глюкоза - 3 г, сода двовуглекисла - 50-70 мг і вода

дистильована - 100 мл). Рухливість сперміїв при осіменінні свиноматок повинна бути не менш як 6 балів.

Розбавлену і перевірену сперму жеребця розфасовують в ампули чи скляні баночки об'ємом 50-100 мл, закривають пробками, які фіксують гумовими кільцями. Упаковану сперму ставлять у мішечки, а потім у термос з льодом і зберігають при температурі 2-5 °С, періодично додаючи кусочки льоду через бічні отвори.

Рухливість сперміїв при використанні сперми повинна бути не менш як 5 балів.

Довготривале зберігання сперми в рідкому азоті. Наприкінці 40-х років Г. В. Смирнов вперше заморозив сперму кролів, жеребців, баранів і бугаїв. У 1950-1961 рр. на території України він одержав перших телят і ягнят при осіменінні корів і вівцем'яток замороженою спермою. Сперму заморожували у твердій вуглекислоті (-79°C), в рідкому кисні (-183 °С) і в рідкому азоті (-196°C). Останнім часом широкого практичного застосування набув метод заморожування і зберігання сперми за допомогою азоту.

Метод тривалого зберігання сперми плідників у замороженому стані дає змогу рівномірно за графіком використовувати бугаїв протягом року і створювати запаси сперми. Заморожена сперма використовується за селекційним планом незалежно від місця перебування плідника, кліматичних умов тощо. З'явилась можливість міждержавного обміну спермою плідників та її використання навіть після їхньої загибелі. Сперму в замороженому стані можна зберігати протягом місяців і років, якщо дотримуватися рекомендованого температурного режиму.

Заморожування і зберігання сперми бугая Розроблено кілька технологій заморожування сперми бугаїв. Найбільш поширено такі технології: заморожування в гранулах на фторопластовій пластині, в облицьованих гранулах (Ф. І. Осташко та ін.), в соломинках (П. І. Пакенас та ін.). Для заморожування беруть високоякісну сперму. Активність сперміїв бугая повинна бути не нижча за 8 балів, а концентрація - не нижча за 0,7 млрд/мл; сперма жеребця - відповідно 6 балів і 150 млн/мл.

Заморожування сперми у формі гранул. Сперму заморожують після її оцінки і розбавлення лактозгліцериново-жовтковим середовищем (лактоза - 11,5 г; гліцерин - 5 мл; жовток курячого яйця - 20 мл; спермосан - 50 тис. ОД., вода дистильована -100 мл). Розбавляють у співвідношенні 1:1 - 1:3 і охолоджують при температурі 2-5 °С протягом 4-5 год у холодильнику (еквілібрація). Після цього сперму знову перевіряють на активність.

У лунки фторопластової пластини сперму розфасовують після відповідної підготовки пластин.

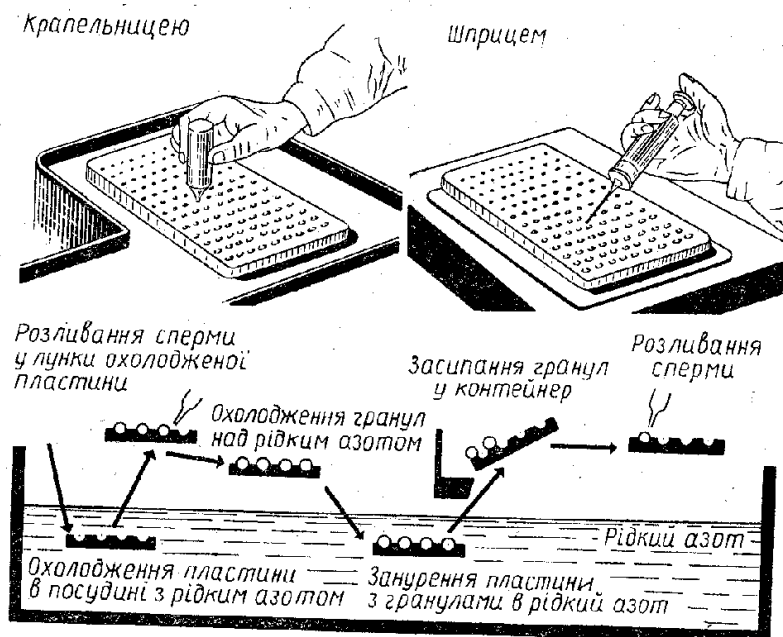


Рис. 14. Технологічна схема гранулювання сперми бугая.

Сперму наносять на незаражену променями бактерицидних ламп пластину по 0,15-0,2 мл за допомогою градуйованої піпетки, шприца або автоматичного пристосування. Спочатку пластини охолоджують у рідкому азоті протягом 8-10 хв, або до припинення кипіння азоту. Для цього використовують спеціальні ванни. Пластина охолоджується до мінус 160-170 °С.

Через кілька секунд після того, як в останній лунці сперма затвердіє, пластину опускають на відстань 5-10 см від рідкого азоту і витримують протягом 2-3 хв, а потім занурюють у нього на 1-2 хвилини. Далі пластину виймають назовні, збирають гранули за допомогою лопаточки в туби, каністри, пластмасові стаканчики чи марлеві мішечки і переносять у посудину Дьюара для карантинування, зберігання і транспортування.

До кожної туби чи іншої посудини із гранулами бугая прикріплюють етикетку з номером плідника, породою, датою заморожування сперми, кількістю доз і т. ін. Гранулу розморожують в 1 мл 3 %-го розчину натрію лимоннокислого.

Цей метод порівняно простий, забезпечує високу активність спермійв після розморожування гранул, набув широкого практичного застосування. Але він має ряд

недоліків, пов'язаних з порушенням цілісності гранул у процесі зберігання, мікробною забрудненістю спермодоз при використанні тощо.

Заморожування сперми в облицьованих гранулах за харківською технологією.

Сперму заморожують після її розбавлення середовищем 1 (11%-й розчин лактози або сахарози - 63 мл; гліцерин - 7 мл; жовток курячого яйця - 30 мл) у співвідношенні 1:1, а після 5-10-хвилинної витримки при температурі 18-22 °С - середовищем 2 (лактоза або сахароза - 6 г; натрій лимоннокислий тризаміщений п'ятиводний - 1,4 г; гліцерин - 5 мл; вода дистильована - 100 мл). У дозі розбавленої сперми повинно бути 15 млн. рухомих спермій.

Сперму беруть у спермоприймач одноразового використання конічної форми, який закінчується циліндричною пробірною, всередині якої є відрізок трубчастої муфти. Еякулят герметизують приладом «Молния» і передають до

лабораторії. Після оцінки якості сперми, відповідної обробки спермоприймач фіксують у прорізах штатива. Для розбавлення сперми використовують два пристрої, які заповнюють середовищами.

Один пристрій з середовищем 1 вміщують у термостат при температурі 35 °С, а другий - з середовищем 2 - використовують при кімнатній температурі.

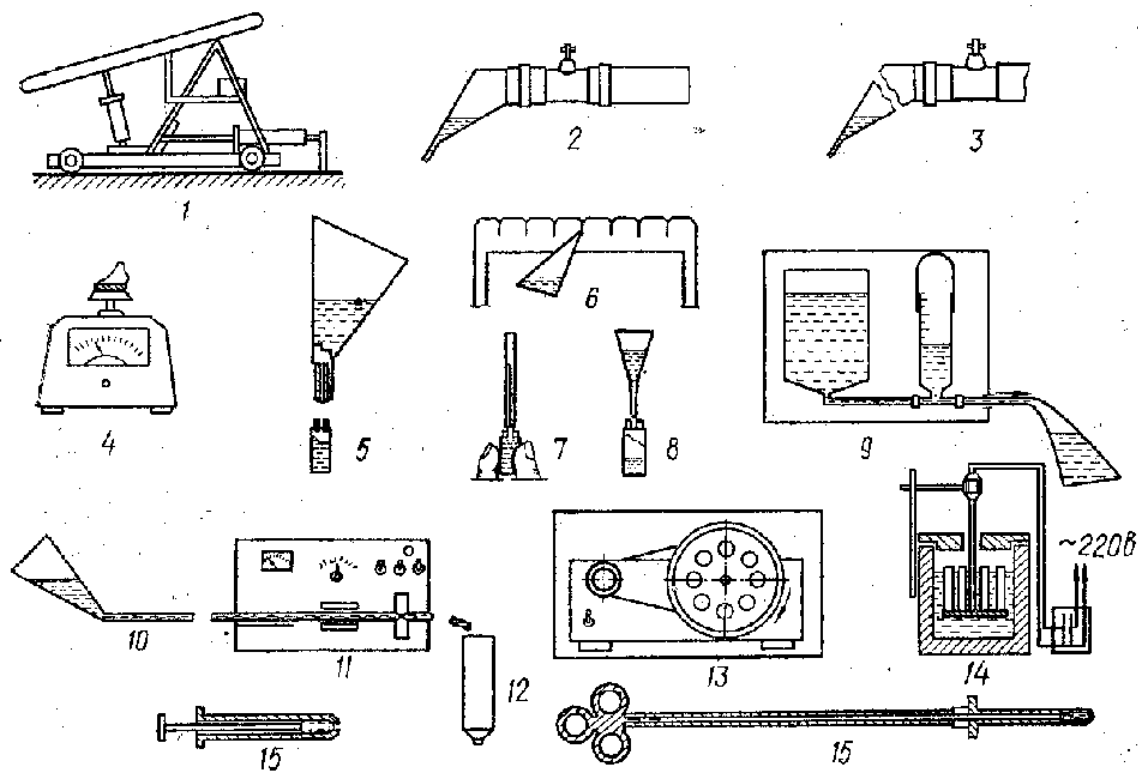


Рис. 15. Схема харківської технології асептичного одержання, обробки, консервації та використання сперми:

1 — механічне чучело для садки бугаїв; 2 — штучна вагіна; 3 — відокремлений від пристрою спермоприймач з сякулятом; 4 — визначення маси еякулята; 5 — відокремлений чохол-пробірка з пробєю сперми; 6 — штатив для фіксації спермоприймача; 7 — взяття проби в мікропіпетку; 8 — взяття проби для мікроскопії; 9 — пристрій для асептичного розбавлення сперми безпосередньо у спермоприймачі; 10 — перефасування розбавленої сперми у полімерну трубку; 11 — автомат АРС-2 для герметизації сперми у вигляді облицьованих гранул; 12 — розфасування гранул у туби; 13 — апарат для охолодження й еквілібрації сперми; 14 — апарат для заморожування сперми; 15 — інструменти для осіменіння спермою в облицьованих гранулах.

За допомогою з'єднувальної муфти спермоприймач з'єднують з тонкою полімерною трубкою, яку заповнюють розбавленою спермою. Заповнена трубка за допомогою автомата ПРЖ-1 розділяється на герметичні спермодози по 0,25 мл.

Дози маркують за допомогою спеціального автомата, який робить кілька позначок (шифр підприємства, порода, шифр і номер бугая, дата взяття сперми). Потім спермодози вміщують у маркіровані алюмінієві туби, які

закривають поролоновими пробками. Заповнені спермодозами туби загвинчують в обойми приладу для адаптації, еквілібрації і заморожування сперми. Прилад вміщують у холодильник при температурі 2-4 °С і протягом 4-5 год обойма обертається з швидкістю 5-10 об/хв. Після цього обойму за допомогою спеціального стержня занурюють на 8-10 хв у рідкий азот до верхнього кінця туб для заморожування сперми, а через 5 хв обойму з тубами повністю занурюють у рідкий

азот посудини Дьюара з широкою шийкою для тривалого зберігання. Облицьовану сперму розморожують у воді при температурі 38-40 °С.

Заморожування сперми в пайєттах широко застосовується з деякими особливостями в багатьох країнах світу. Після оцінки і розбавлення сперми синтетичним лактозофруктозорафінозомагнієво-гліцериножовтковим середовищем її охолоджують у водяному термостаті до 22 °С. Сперму розфасовують у поліпропіленові соломинки в дозах по 0,25 мл після маркірування за допомогою автомата.

А після цього пайєтти переносять у машину МУС із заздалегідь підготовленою і наливою в спеціальні місткості спермою. Наповнені соломинки надходять у спеціальний пристрій машини, де закупорюються з обох кінців скляними кульками.

Потім сперму ставлять у штативах і пластмасових коробочках у спеціальний холодильник при постійній-температурі 4°С. Завдяки цьому сперма поступово охолоджується від 22 °С до 4 °С з швидкістю 0,3-0,5 °С за 1 хв. Після охолодження сперму при температурі 4°С витримують у холодильнику 3-4 год і направляють на заморожування. Його проводять у стаціонарному сховищі в газоподібному азоті на мідній пластині завтовшки 1,5-2 мм при температурі мінус 120-130 °С протягом 5 хвилин. Одночасно заморожують до 750 спермодоз. Температурний режим контролюють автоматично потенціометром КСП – 4 за допомогою термопари.

Після заморожування сперму в пайєттах збирають у пластмасові стакани і зберігають у стаціонарному сховищі.

Перед використанням соломинки із спермою розморожують у водяній бані при 38-40 °С протягом 10 секунд.

Заморожування сперми жеребця. Після одержання її оцінки сперму жеребця розбавляють у співвідношенні 1:3 лактозоцитратно-жовтковим середовищем. Заморожують у формі гранул здійснюють на поверхні сухого льоду або в алюмінієвих пакетах у парах азоту. Якщо сперму заморожують у формі гранул, її наносять у лунки сухого льоду об'ємом 0,2 мл. Заморожування триває 5-6 хв, а потім гранули збирають і упаковують в алюмінієві труби чи пластмасові стакани (по 125-130 гранул або 25 мл у дозі) і зберігають у посудині Дьюара з рідким азотом.

Коли сперму заморожують у пакетах, їх спочатку охолоджують, потім заповнюють спермою по 25 мл, закатують і міцно затискують кінець труби. Труби повинні бути відповідно маркірованими і не містити повітря.

Заморожування відбувається на тримачах, які розміщують на поплавках так, щоб сперма була на відстані 10-12 мм від поверхні рідкого азоту. Пакети із спермою витримують у парах рідкого азоту протягом 5-7 хв і переносять у рідкий азот для зберігання.

Сперму розморожують у водяній бані при температурі 38-40 °С.

Заморожування сперми барана. Після розбавлення сперму перемішують і виливають у флакони або поліетиленову крапельницю, закривають пробками і переносять по 6 шт. у місткості з 50 мл води при температурі 24-25 °С, а потім у холодильник з температурою плюс 2 °С. При цьому відбувається рівномірне охолодження сперми до 2 °С за 2 години.

Після двогодинного витримування в холодильнику сперму заморожують у вигляді гранул на охолодженій до мінус 80-90 °С фторопластовій пластині. Об'єм гранули становить 0,2 мл. Через 5-7 хв після розливання сперми гранули збирають у місткості для їхнього збереження в рідкому азоті.

Обладнання для заморожування, зберігання і транспортування сперми Для заморожування, зберігання і перевезення сперми на племпідприємствах використовують складну кріогенну техніку. Це - пристосування і апаратура для заморожування, посудини, сховища і транспортні резервуари з азотом тощо. Посудина Дьюара - це резервуар типу «посудина в посудині», міжстінний простір якого заповнений теплоізоляційним матеріалом і в якому створено вакуум. У нижній частині внутрішньої посудини розміщено камеру з адсорбентом для поглинання газів. Посудину зверху закривають кришкою з пробкою із пенопласту.

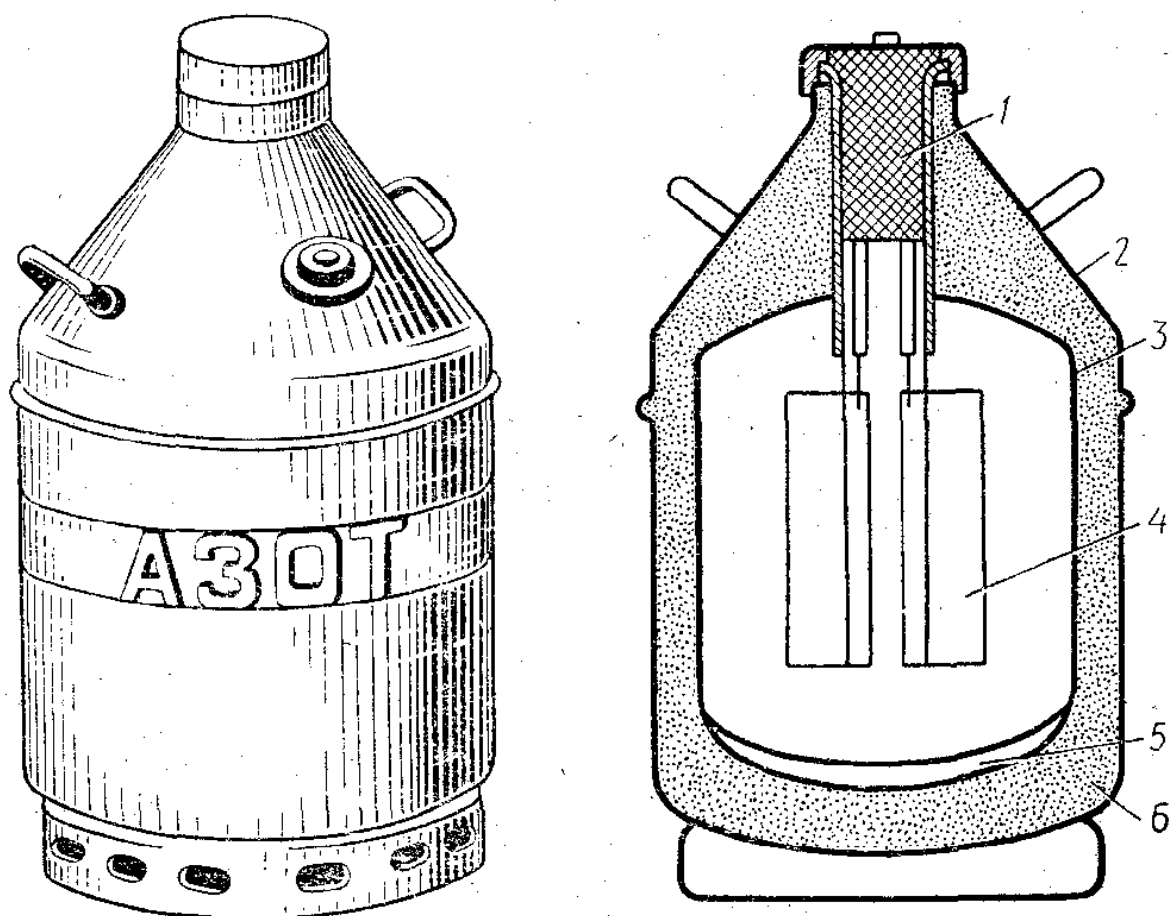


Рис. 19. Посудина Дьюара «Харків-34 А»:

1 — пробка; 2—3 — зовнішня і внутрішня посудини; 4 — cavity; 5 — камера адсорбенту; 6 — теплоізоляційний матеріал.

Є кілька типів посудини Дьюара. Найчастіше користуються посудинами СДС-5, СДС-20, СДС-30, СДС-50, «Харків-30», «Харків-34А», АТ-6 та ін. Їх використовують для зберігання і перевезення замороженої сперми. Ці посудини характеризуються своїми технологічними особливостями, які описано в паспортах. Запаси сперми на племпідприємствах зберігаються в стаціонарних сховищах типу ХСЖА, КВ-6202, ХБ-0,5, ХБ-02 та ін.

Азот перевозять у спеціальних транспортних місткостях типу ТРЖК, змонтованих на автомашинах (УПА).

До цистерни обов'язково додають комплект рукавів завдовжки 2,5 м і різного діаметра (18-40мм), захисні окуляри, рукавиці тощо. На племпідприємствах повинно бути кілька фторопластових пластин, якщо сперму заморожують у формі гранул. Повинна бути і відповідна апаратура, необхідне обладнання для заморожування

сперми в облицьованих гранулах за харківською технологією, в соломинках - за байсогальською або французькою чи іншою технологією.

Техніка безпеки. При заморожуванні сперми та ро-

При заморожуванні сперми та роботі з кріогенним обладнанням потрібно суворо дотримуватися техніки безпеки відповідно до вимог спеціальної інструкції на кожний технологічний процес.

У приміщенні, де проводиться робота з рідким азотом, повинна бути надійна вентиляція. Люди працюють у спецодягу, використовують окуляри, рукавиці тощо. Особливу уважність слід виявляти під час розморожування облицьованих гранул, пайєтт або пакетів, оскільки можливі розриви їх. До роботи працівників допускають тільки після відповідного інструктажу та забезпечення їх необхідним одягом.

Азот у посудину Дьюара заливають поступово, через металеву лійку або за допомогою шланга, кінець якого опускають до дна посудини. Ставити посудину з азотом потрібно далі від теплого місця, а зберігати із закритою кришкою з пробкою, переносити вдвох і т. ін.

Дози сперми із посудини дістають тільки заздалегідь охолодженим металевим корнцангом або довгим пінцетом, кінці якого обтягують гумовою або поліетиленовою трубкою.

Категорично забороняється залишати на відігріванні посудину, що втратила вакуум, у приміщенні з людьми та герметичне закривати посудину чи сховище з азотом. У разі перевезення посудин з азотом їх потрібно надійно закріплювати.

Робітники, які працюють з рідким азотом, повинні періодично виходити на свіже повітря. Особливо високі вимоги техніки безпеки ставляться до людей при роботі з транспортними цистернами та резервуарами з азотом. Ці люди вивчають інструкцію і проходять практичне навчання.

Транспортування сперми. Сперму плідників перевозять у закріплені за племпідирпемством господарства всіма видами транспорту, але найчастіше автомобілями.

Основні вимоги, яких обов'язково треба дотримувати при будь-якому способі перевезення, такі: запобігати сильним струшуванням і збовтуванням сперми; підтримувати в термосах потрібну температуру і не допускати швидкого витрачання охолодників (льоду, рідкого азоту); запобігати пошкодженням термосів і посуду з

спермою; не перевертати термоси і посуд з спермою догори дном; точно маркірувати посуд з спермою, вказуючи номер або кличку плідника і дату взяття сперми, а також прикладати до транспортованої сперми накладні (ордери), де зазначено адреси, номери посуду і плідників; дотримуватися правил техніки безпеки і санітарних вимог.

Сперму бугаїв і баранів при температурі зберігання 2-5 °С перевозять у продуктових або пластмасових термосах, що мають широку шийку, їх ставлять один на одний, а простір між ними заповнюють поролоновими прокладками чи сірою ватою. Якщо температура повітря нижча за мінус 5 °С, то термоси вкривають ватяним покривалом.

Розбавлену сперму кнурів транспортують у термосах різних типів: «Харків-10-3», поролоновий термос, термос-ящик та інші, де дотримується температура на рівні 16-20 °С. Під час транспортування флакони щільно закривають і розгерметизовують за місцем завезення в господарство.

Розбавлену сперму рекомендують використовувати протягом 2-3 днів, якщо є не менш як 60 % сперміїв з прямолінійним поступальним рухом.

Сперму жеребців перевозять тільки розбавленою, оскільки в нерозбавленому стані вона швидко стає не придатною для використання. Найчастіше її транспортують у продуктових термосах з широкою шийкою при

температурі 2-5 °С.

Заморожену сперму плідників транспортують у посудинах Дьюара місткістю 6-50 л, що використовуються для зберігання сперми в рідкому азоті на пунктах штучного осіменіння. При перевезенні сперми, розфасованої в каністрах, пластмасових стаканчиках або мішечках, їх занурюють в азот на дно посудини.