

* У більшості з 12 досліджених бугаїв при від'ємній температурі ($-2-10^{\circ}\text{C}$) спостерігалась деяка затримка еякуляції, а в окремих випадках — незначне прискорення.

У дощову погоду еякуляція у більшості бугаїв прискорювалась. Однак це могло бути пов'язано з деяким зниженням температури повітря.

З наших дослідів випливає, що на станціях штучного осіменіння необхідно вести постійні спостереження за реакцією бугаїв на підставних тварин з метою виявлення бугаїв-фаворитів, при використанні яких статеві рефлекси проявляються найбільше.

ДЕЯКІ ПИТАННЯ ТЕХНІКИ ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ У ГРАНУЛАХ¹

АФІФІ АБДЕЛЬ-ХАМІД ЕЛЬ-МЕНУФІ

Українська сільськогосподарська академія

Метод тривалого зберігання сперми бугаїв у замороженому стані набув значного поширення. Однак він потребує удосконалення, оскільки під час заморожування і відтаювання гине близько 50% спермій, що завдає безсумнівних збитків племінній справі.

Вживання і загибель спермій залежить від багатьох факторів, які вивчено ще недостатньо. Це, зокрема, режим попередньої обробки сперми (склад розріджувачів), техніка розбавлення, тривалість адаптації, режими заморожування і відтавання.

Мають також значення видові та індивідуальні особливості плідників і навіть особливості окремих еякулятів одного й того ж плідника.

Для вивчення цих питань ми провели дослідження на спермі бугаїв чорно-рябої і симентальської порід, які належали Українському науково-дослідному інституту розведення і штучного осіменіння великої рогатої худоби. Сперму одержували раз у п'ять днів за допомогою дуплетних садок за стандартною методикою, оцінювали, розбавляли лактозо-гліцеріно-жовтковим середовищем (ЛГЖ) звичайного складу в співвідношенні від 1:1 до 1:3 (залежно від концентрації і активності спермій), а потім після 20—30-хвилинної витримки при кімнатній температурі поміщали в холодильник для 4—6-годинної адаптації при температурі $+2-4^{\circ}\text{C}$. Заморожували сперму у вигляді гранул об'ємом 0,1 мл на фторопластовій пластині при температурі $-120-130^{\circ}\text{C}$. Після 24—48-годинного зберігання в рідкому азоті гранули відтаювали в 1 мл теплого ($+40^{\circ}\text{C}$) розчину цитрату натрію (2,9%) і визначали активність (в термостаті при $+38^{\circ}\text{C}$) та переживаність спермій (при

¹ Науковий керівник — проф. І. В. Смирнов.

такій же температурі), враховуючи абсолютний показник переживаності за В. К. Миловановим (1962).

Температуру фторопластової пластини вимірювали за допомогою спеціальної температури, плоский спай якої щільно фіксували на поверхні пластини.

Залежно від мети того чи іншого дослідження загальну методику відповідно змінювали, про що повідомляється при викладі результатів дослідження.

Вплив ступеня розбавлення сперми вивчали на 10 розділених еякулятах. Дані таблиці 1 показують, що активність і переживаність спермій підвищуються із збільшенням ступеня розбавлення сперми. Можливо, це пояснюється прискоренням кристалізації води в міжклітинному середовищі і більш повним видаленням води із спермій, що згідно з теорією І. В. Смирнова (1949) полегшує вітрифікацію протоплазми спермій. Вплив концентрації гліцерину в спермі, розбавленій лактозо-гліцеринно-жовтковим середовищем, на активність і переживаність спермій після відтавання вивчали на 12 розділених еякулятах. Кінцева концентрація гліцерину в розбавленій спермі становила 0, 2, 5, 6 і 8%, адаптація тривала 2 год. З даних таблиці 2 виходить, що оптимальна концентрація гліцерину — 2%, досить висока активність і переживаність спостерігається і при 4% гліцерину. Цікаво, що при наявності жовтка і повному виключенні гліцерину активність та переживаність спермій були порівняно високими.

Дослідами щодо вивчення впливу вмісту жовтка в розбавленій спермі на результати заморожування (табл. 3) не встановлено чітких закономірностей. Активність і переживаність спермій практично однакові при вмісті жовтка в межах 10—25%, лише при 5 і 30% спостерігалось деяке зниження цих показників.

Вплив тривалості адаптації розбавленої сперми від 10 бугаїв при температурі +2 — 4°C на її якість вивчали після відтавання. Дані таблиці 4 показують, що при об'ємі охолодженої і розбавленої сперми 2 мл для адаптації цілком достатньо 40 хв. За цей час температура знижується до +8°C і спермі встигають перейти в стан неповного анабіозу, що необхідно для успішного їх заморожування (І. В. Смирнов, 1949). Щоб з'ясувати, з якою швидкістю від-

1. Вплив ступеня розбавлення сперми ЛГЖ розріджувачем на активність і переживаність спермій після відтавання ($M \pm m$)

Ступінь розбавлення	Активність, бали	Абсолютний показник переживаності
1:1	4,12 ± 0,08	18,99 ± 0,70
1:2	4,38 ± 0,08	22,44 ± 0,80
1:4	4,78 ± 0,08	25,68 ± 0,92
1:9	5,02 ± 0,06	28,54 ± 0,87

2. Вплив концентрації гліцерину в розрідженій спермі на активність і переживаність спермій після відтавання

Вміст гліцерину, %	Активність, бали	Абсолютний показник переживаності	Вміст гліцерину, %	Активність, бали	Абсолютний показник переживаності
0	2,71 ± 0,17	12,97 ± 1,57	6	3,94 ± 0,09	23,01 ± 1,35
2	4,71 ± 0,09	32,38 ± 1,60	8	3,63 ± 0,11	18,38 ± 1,01
4	4,31 ± 0,09	27,26 ± 1,37			

3. Вплив концентрації жовтка у розрідженій спермі на активність і переживаність сперміїв після відтавання ($M \pm m$)

Вміст жовтка, %	Активність, бали	Абсолютний показник переживаності	Вміст жовтка, %	Активність, бали	Абсолютний показник переживаності
5	3,60±0,13	20,32±1,62	20	4,27±0,08	28,58±1,27
10	4,27±0,07	27,18±1,16	25	4,03±0,07	25,85±1,40
15	4,25±0,08	28,12±1,18	30	3,50±0,11	18,30±1,36

4. Вплив тривалості адаптації на активність і абсолютний показник переживаності сперміїв після відтавання ($M \pm m$)

Тривалість адаптації, хв	Породи бугаїв				По обох породах	
	чорно-ряба		симентальська		активність сперміїв, бали	переживаність
	активність сперміїв, бали	переживаність	активність сперміїв, бали	переживаність		
30	4,57±0,05	22,52±1,09	4,93±0,11	30,37±1,06	4,75±0,07	26,44±1,04
60	4,53±0,10	22,33±0,89	4,90±0,12	29,88±1,21	4,72±0,09	26,11±1,02
240	4,40±0,07	22,23±1,17	4,77±0,12	30,37±1,23	4,58±0,08	26,30±1,13

бувається охолодження різних об'ємів розбавленої сперми, провели спеціальний дослід з використанням термопари для вимірювання температури. Виявилось, що температура 1 мл сперми падає до +6°C за 30 хв, 2 мл — за 60, 5 мл — за 70 і 15 мл — за 80 хв. Якщо охолоджувати більші об'єми сперми, час адаптації доведеться подовжити до 2—4 год, щоб бути впевненим у настанні анабіозу сперміїв.

На 20 еякулятах вивчено вплив температури фторопластової пластини на активність і переживаність сперміїв після заморожування та відтавання. Об'єм гранул (0,1 мл), тривалість адаптації (4—6 год), умови зберігання і відтавання сперми у всіх випадках були однакові, різною була лише температура пластини. З даних таблиці 5 видно, що оптимальною температурою пластини є 180—190°C. При температурі —70—80°C результати значно погіршувались. Ця закономірність спостерігалась по обох породах.

На багатьох станціях по штучному осіменінню застосовують спрощений спосіб охолодження фторопластових пластин. Пласти-

5. Вплив температури заморожування на активність і абсолютний показник

Температура пластини, градуси	Чорно-ряба	
	активність сперміїв, бали	переживаність
—180—190	4,67±0,12	20,28±1,00
—120—130	4,37±0,12	18,49±0,98
—70—80	3,79±0,09	15,38±0,74

ни занурюють на декілька хвилин у рідкий азот, а потім виймають звідти, кладуть на стіл і накачують в лунки адаптовану сперму. При цьому, очевидно, умови заморожування сперми будуть неоднаковими, оскільки пластини нагріваються поступово. Ми досліджували цю особливість, вимірюючи температуру поверхні пластин за допомогою термомпари. Попередньо пластину занурювали в рідкий азот на 10 хв, а потім поміщали над його поверхнею на відстані 3—4 см. Виявилось, що через 15 с після виймання з рідкого азоту температура пластини становила 190°C, через 30 с — 174, 60 с — 160, 90 с — 144, через 2 хв — 134, 3 хв — 122, 4 хв — 112, 5 хв — 104, 10 хв — 81 і через 15 хв — 68°C. Якщо пластину занурювали в азот на 3 хв, температура її підвищувалась значно швидше і вже через 2 хв рівнялась — 125°C. Очевидно, при накачуванні сперми на пластину, що лежить просто на столі, більшість гранул буде замерзати не при оптимальній температурі.

Оскільки швидкість замерзання і відтавання гранул може залежати не тільки від температури фторопластової пластини, а й від об'єму гранул, ми провели два досліді щодо вивчення впливу цих факторів на активність і переживаність спермій після відтавання. В першому досліді (18 еякулятів) визначали час, необхідний для повного замерзання гранул. У другому досліді (4 еякуляти), крім того, фіксували час повного відтавання гранул.

Результати дослідів (табл. 6) показали, що активність і переживаність спермій залежить як від температури пластини, так і від об'єму гранул. Однак між тривалістю замерзання гранул і результатами заморожування немає прямої залежності. Можливо, це пояснюється значним впливом швидкості відтавання, що зумовлена об'ємом гранул. Це підтверджується даними другого досліді: при відтаванні гранул більшого об'єму (0,3 мл) не в 1, а в 2 мл теплового розчину цитрату натрію швидкість розморожування дещо підвищувалась і відповідно поліпшувались показники сперми.

Привертає увагу й те, що при всіх температурах заморожування краща активність спермій спостерігалась після відтавання гранул об'ємом 0,05 мл, а переживаність — при об'ємі 0,1 мл. Таким чином, визначення переживаності спермій після відтавання (при температурі 38°C) дає більш правильне уявлення про якість спермій, ніж разове визначення їх активності.

В останні роки в літературі з'явилось багато повідомлень (І. В. Смирнов, О. Є. Бруенко, 1971, та ін.) про те, що на актив-

переживаності спермій після відтавання у бугаїв різних порід ($M \pm m$)

Симентальська		По обох породах	
активність спермій, бали	переживаність	активність спермій, бали	переживаність
5,50±0,10	30,52±0,82	5,00±0,10	24,38±0,94
5,06±0,10	27,30±0,99	4,65±0,09	22,02±0,90
4,62±0,09	24,50±0,77	4,13±0,08	19,03±0,79

6. Вплив температури заморожування та об'єму гранул на активність і переживаність сперміїв після відтавання ($M \pm m$)

Температура пластины, градуси	Об'єм гранул, мл	Активність, бали	Абсолютний показник переживаності	Час до повного замерзання гранул, с	Тривалість повного відтавання гранул, с
<i>Перший дослід</i>					
—180—190	0,1	4,55±0,06	23,99±0,81	37,3	—
	0,2	4,11±0,06	17,69±0,59	55,9	—
—120—130	0,1	4,34±0,05	21,08±0,63	49,0	—
	0,2	4,05±0,06	16,63±0,71	66,6	—
—70—80	0,1	4,03±0,05	19,14±0,57	67,5	—
	0,2	3,67±0,06	14,39±0,67	81,9	—
<i>Другий дослід</i>					
—180—190	0,05	5,33±0,13	14,46±1,10	23,1	15,4
	0,1	4,71±0,16	24,19±0,81	37,7	21,0
	0,3	3,29±0,14	12,23±0,41	62,7	50,9
	0,3*	3,67±0,11	17,54±0,84	62,7	41,9
—120—130	0,05	5,00±0,12	16,88±0,80	30,9	—
	0,1	4,21±0,07	21,27±0,74	48,8	—
	0,3	2,92±0,06	8,96±0,45	72,4	—
	0,3*	3,42±0,12	13,85±0,95	72,4	—
—70—80	0,05	4,54±0,13	12,64±0,77	39,8	—
	0,1	3,67±0,09	16,29±0,70	64,3	—
	0,3	2,08±0,12	5,94±0,30	88,0	—
	0,3*	3,04±0,13	10,73±0,72	88,0	—

* Гранули відтавали в 2 мл розчину цитрату.

ність і переживаність сперміїв значно впливає швидкість відтавання гранул. Для вивчення цього питання ми провели дослід на 10 розділених яйцукатах. Сперму заморожували у формі гранул об'ємом 0,1 мл на фторопластовій пластині при температурі —120—130°С і після добового зберігання в рідкому азоті кожному гранулу відтаювали у флаконі з 1 мл розчину цитрату натрію, температура якого становила від 5 до 90°С. При температурі від 5 до 50°С флакони витримували на водяній бані до повного розтавання гранул, а при температурі від 60 до 90°С флакони зараз же після занурення гранул у розчин переносили у воду, температура якої становила 35°С, щоб запобігти перегріванню сперміїв. Температуру розчину цитрату після занурення в нього гранул реєстрували за допомогою мініатюрної термомарки.

При температурі від 5 до 70°С спостерігалась пряма залежність активності і переживаності сперміїв від швидкості відтавання (табл. 7). Деяко зменшувались ці показники при температурі 80 і 90°С, що можна пояснити деяким перегріванням сперміїв, оскільки після внесення гранул у розчин температура останнього була надто високою (48—55°С). Очевидно, при більш швидкому перенесенні у водяну баню з температурою 35°С (або при понижений температурі бані) перегріванню можна запобігти.

7. Вплив температури відтавання на активність і переживаність спермійв ($M \pm m$)

Температура розчину, градуси		Тривалість повного відтавання, с	Активність спермійв, бали	Абсолютний показник переживаності	Температура розчину, градуси		Тривалість повного відтавання, с	Активність спермійв, бали	Абсолютний показник переживаності
до занурення гранул	після повного відтавання гранул				до занурення гранул	після повного відтавання гранул			
5	3	188	$1,50 \pm 0,06$	$2,60 \pm 0,17$	60	38	19	$4,65 \pm 0,09$	$26,48 \pm 0,92$
20	14	58	$2,83 \pm 0,09$	$8,25 \pm 0,59$	70	42	17	$5,18 \pm 0,09$	$30,11 \pm 1,00$
40	30	21	$4,15 \pm 0,10$	$20,11 \pm 0,83$	80	48	15	$4,55 \pm 0,09$	$23,69 \pm 0,95$
50	33	16	$4,50 \pm 0,10$	$24,14 \pm 0,83$	90	55	13	$3,82 \pm 0,11$	$18,03 \pm 0,95$

Привертає увагу майже ідеальний збіг характеру зміни активності спермійв при різних режимах відтавання із змінами їх переживаності. Поліпшення показників сперми при підвищених температурах відтавання найпростіше пояснюється з позицій гіпотези про можливість вітрифікації протоплазми клітин. При вищих швидкостях нагрівання в сперміях не встигають відбутись процеси девітрифікації (повторне утворення кристалів) в небезпечному температурному інтервалі від -40 — -50°C до нуля.

Одержані нами дані про вплив об'єму гранул на результати заморожування також підтверджують гіпотезу вітрифікації. Проте встановлені нами закономірності виражені менш чітко. Очевидно, дуже низька температура замерзання певною мірою пригнічує вплив об'єму гранул. Наші дані свідчать про ефективніше заморожування сперми бугаїв при низьких температурах у гранулах малого об'єму. Оптимальним для заморожування сперми бугая є об'єм гранул 0,1 мл. Звичайно, це твердження справедливе тільки для способів заморожування сперми в гранулах і при застосуванні тих розріджувачів та ступенів розбавлення, які ми використовували. При зміні цих умов можна одержати й інші дані.

У наших дослідях досить чітко проявився вплив породної різниці. Так, сперма бугаїв симентальської породи виявилась більш стійкою проти глибокого заморожування, ніж сперма бугаїв чорнорябої породи.