

Результати осіменіння маточного поголів'я спермою, обробленою різними кремнеземами, наведено у табл. 2. Найефективнішим виявилось застосування кремнеземів марок АФ і АС.

*Національний аграрний університет*

УДК 636. 2.31. 082. 453

П.А. КРУГЛЯК\*, С.Д. МЕЛЬНИЧУК,  
М.В. МАРЕНЕЦЬ, О.І. СМІРНОВА, М.П. ЖУРАВЕЛЬ

### СПОСІБ ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ ІНАКТИВОВАНИХ СПЕРМІЇВ БУГАЇВ ПРИ ТЕМПЕРАТУРІ +2 — +15 °С

Метод глибокого заморожування статевих клітин плідників сільськогосподарських тварин, відкритий І.В. Смирновим [1—3], розв'язав проблему раціонального використання найцінніших з них у селекції незалежно від відстані та часу заморожування сперми і, безумовно, є відкриттям світового рівня. Окрім цих переваг, при впровадженні даного методу відпала необхідність в утриманні великого парку автомобілів, які щодня розвозили сперму, що зберігалася при температурі від 0 до +4 °С. У подальших наукових дослідженнях (С. Полдж, О. Сміт, Л. Роусон, 1952; Н. Нагазе, М. Нива, 1964; Р. Кассу, 1964; Ф.І. Осташко 1969; К. Зіммет, 1972; П. Пакенас, 1972; І. Хабібуллін, 1976 та ін.) розроблено різні технології криоконсервації сперми, які забезпечили широке впровадження цього великого відкриття у біології.

Однак метод глибокого заморожування сперми і нині є незавершеним до кінця, на що вказував у своїх роботах і сам автор. Відомо, що в процесі глибокого заморожування і розмо-

\* Науковий керівник — академік УААН М.В. Зубець.

© П.А. Кругляк, С.Д. Мельничук, М.В. Маренець,  
О.І. Смирнова, М.П. Журавель, 2001

рожування гине 50 % сперматозоїдів, а у значної частини їх порушується акросомний апарат, унаслідок чого останні не беруть участі в заплідненні яйцеклітин.

У цьому плані заслуговує на увагу температурно—хімічний спосіб анабіозу, за якого також різко сповільнюється обмін речовин у клітинах і який не менше привертав увагу багатьох учених, серед них і І.В. Смирнова навіть після захисту його кандидатської дисертації. Суть цього способу консервування статевих клітин полягає у насиченні розріджувача вуглекислим газом, при якому останній, з'єднуючись з водою, утворює вугільну кислоту з малою константою дисоціації, що легко проникає у клітини і, розпадаючись на іони, гальмує дихання і гліколіз. У результаті цього статеві клітини переходять у стан гіпобіозу.

Такого складу розбавлювач був розроблений в університеті штату Іллінойс (США), завдяки чому дістав назву іллінойський. В основний рецепт його входить двовуглекислий натрій, цитрат натрію, хлористий натрій, глюкоза, сульфаніламід та  $\text{CO}_2$ .

У дослідженнях І.В. Смирнова і В.І. Поставної [3] встановлено чітку залежність рухливості і резистентності інактивованих вугільною кислотою спермій від температури зберігання. Найкращі результати одержано при температурі  $+10^\circ\text{C}$ , при якій спермії зберігали запліднювальну здатність протягом чотирьох-п'яти діб. Однак автори не враховували роль карбонатів у середовищі, що не дало можливості вивчити вплив різних рН на показники якості сперми.

У подальших дослідженнях встановлено, що у глибокий стан гіпобіозу статеві клітини самців входять при спільній дії чотирьох факторів — температури, концентрації вуглекислоти та бікарбонатів у ній, рН середовища, — що, на думку авторів, повинно продовжувати тривалість зберігання сперми.

В останнє десятиріччя в окремих регіонах країни впроваджено маршрутно-кільцеву форму організації штучного осіменіння корів і телиць, за якої один технолог об'їжджає щодня за маршрутом 20—30 господарств і осіменяє по 70—100 корів. За

цих умов забезпечується 100%-ве використання сперми бугаїв, уведеної в стан штучного гіпобіозу, внаслідок чого спосіб може бути економічно вигідним, адже статеві клітини не піддаються дії низьких температур і не порушується акросомний апарат.

Метою наукових досліджень було розробити синтетичне середовище, здатне переводити у більш глибокий гіпобіоз сперматозоїди та відпрацювати оптимальну модель співвідношення рН і температури зберіганням сперми, визначити біологічні показники і запліднювальну здатність спермій, інактивованих у такий спосіб та збережених протягом шести-семи діб при плюсових температурах, вивчити вплив штучного гіпобіозу сперми бугаїв-плідників на відтворну здатність великої рогатої худоби.

**Матеріали і методика досліджень.** Дослідження проводили на спермі 12 бугаїв голштинської породи Головного селекційного центру України, яку розбавляли розробленим нами (С.Д. Мельничук, Д.О. Мельничук, А.П. Кругляк, О.І. Смирнова, М.П. Журавель, П.А. Кругляк, М.В. Маренець) бікарбонатно-діоксидвуглецевим середовищем, що включає (мас. %): глюкозу медичну безводну — 2,4, натрій лимоннокислий тризаміщений п'ятиводний — 1,122, жовток курячих яєць — 16,2, натрій двовуглекислий — 0,2 — 0,27, діоксид вуглецю — 0,028 — 0,034 і воду бідистильовану. (Патент 6 А 61 D7/00 № 24696А від 16.12.1997 р.) Після цього клітини вводили у гіпобіотичний стан шляхом введення  $\text{CO}_2$  до такої його концентрації, яка вирівнювала рН сперми до його початкового показника у нативній спермі (6,75). Розбавлену сперму зберігали при температурі  $=+2$  —  $+4$  та  $+10$  —  $+15$  °С. Оцінку якості сперми проводили двічі на добу під мікроскопом за рухливістю гамет до повної їхньої загибелі. Запліднювальну здатність спермій визначали у шести господарствах Київської області. Контролем була сперма цих самих бугаїв із розділених сякулятів і розбавлена ГЦЖ середовищем. Усього було осіменено 196 корів контрольною та 302 корови дослідною спермою.

**Результати досліджень.** Найкращі результати одержано при добавлянні у ГЦЖ середовище бікарбонату натрію у дозі

50 ммоль/л та доведення рН середовища діоксидом вуглецю до рівня 6,7 при температурі зберігання від +2 до +4 °С. При цьому рухливість сперматозоїдів бугаїв дослідної групи утримувалася значно вищою (на 1 бал у перші три доби, на 2 бали — на 4-ту та 5-ту добу та на 3 бали — на 6-ту добу зберігання сперми порівняно з контролем). Вживаність сперматозоїдів за умов гіпобіозу збільшилася від 192 (на контролі) до 216 год. (у досліді), а абсолютний показник виживаності — від 780 до 1078 у.о., або на 30% (табл. 1).

Із 195 корів, осіменених дослідною спермою за перші три дні її використання, запліднюваність у середньому становила 69,3%, а контрольною (196 корів) — 60,7%. Різниця між запліднюваністю корів у дослідній і контрольній групах дорівнювала 8,6% на користь дослідної групи, що статистично вірогідно при  $P < 0,01$ . Рухливість сперматозоїдів контрольної групи після трьох днів зберігання знизилася нижче 6 балів, а відтак ми її не використовували згідно з інструкцією. У дослідній групі цей показник був вище 6 балів протягом 4-ї і 5-ї, а окремих бугаїв і 6-ї доби. Це дало нам змогу додатково осіменити групу корів,

### 1. Показники якості спермій у середовищах з різною концентрацією бікарбонату і $\text{CO}_2$

Концентрація бікарбонату натрію, ммоль/л	$\text{CO}_2$ , г/л	Вживаність	
		год.	Sa
<i>При <math>t^\circ = +2</math> — <math>+4</math> °C</i>			
Контроль	—	192	780
Низька	10,0	192	703
Середня	30,0	168	862
Підвищена	40,0	192	828
Висока	50,0	216	1078
<i>При <math>t^\circ = +10</math> — <math>+15</math> °C</i>			
Контроль	—	168	626
Висока	50,0	216	903

## 2. Вплив гіперкапнії на запліднювальну здатність сперматозоїдів бугаїв-плідників

Порядковий день використання сперми	Розбавлена ГЦЖ і збережена при $t=+2$ — $+4^{\circ}\text{C}$ (контрольна)			ГЦЖ + $\text{NaHCO}_3$ + $\text{CO}_2$ і збережена при $t=+2$ — $+4^{\circ}\text{C}$ (дослідна)		
	осімен., гол.	заплідн., гол.	%	осімен., гол.	заплідн., гол.	%
1-й	30	22	73,3	45	36	79,3
2-й	30	19	63,4	40	27	67,5
3-й	136	78	57,5	110	72	65,5
Разом	196	119	60,7	195	135	69,3
Різниця						+8,6
4-й	—	—	—	31	19	61,3
5-й	—	—	—	34	15	44,1
6-й	—	—	—	42	15	35,7
Разом				107	49	45,8
Усього за 6 днів				302	184	57,8

запліднюваність яких становила за 4-й день 61,3%, за 5-й — 44,1 і за 6-й — 35,7% (табл. 2).

Таким чином, запропоноване нами середовище і спосіб розбавлення та зберігання сперми продовжують тривалість збереження інактивованих сперміїв бугаїв при плюсових температурах до п'яти діб і забезпечують повне використання сперми за підвищеного рівня відтворення в перші три доби її використання. При цьому число спермодоз з одного еякуляту збільшується удвічі. Різниця між запліднюваністю корів у дослідній та контрольній групах протягом трьох діб використання сперми становить 8,6%. Це свідчить про те, що на кожні 100 корів можемо додатково отримувати майже 9 телят.

**Висновки.** 1. Розроблено середовище для тривалого збереження сперми бугаїв-плідників з використанням явища гіперкапнії та гіпотермії, яке забезпечує збереження життєздатності сперматозоїдів при температурі від  $+2$  до  $+15^{\circ}\text{C}$  з рухливістю не нижче 5 балів протягом п'яти діб.

2. Застосування штучного гіпобіозу сперматозоїдів дає

змогу продовжити термін їхньої життєздатності з рухливістю не менше 5 балів від трьох до п'яти діб без істотного зниження запліднювальної здатності. Це дає можливість повністю використовувати розріджену сперму бугаїв-плідників.

3. Спосіб штучного гіпобіозу сперми бугаїв може бути з успіхом використаний в умовах маршрутно-кільцевої системи організації штучного осіменіння корів і телиць.

1. *Милованов В.К.* Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных. — М.: Изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1962. — 696 с.

2. *Осташко Ф.И.* Длительное хранение спермы производителей сельскохозяйственных животных в замороженном состоянии. — М.: Сельхозиздат, 1962. — 28 с.

3. *Смирнов И.В., Поставная И.В.* Хранение семени быков посредством инактивации живчиков угольной кислотой // Доклады советских ученых к 5-му Международному конгрессу по биологии воспроизведения и искусственного осеменения животных. — 1964. — С. 31 — 34.

*Інститут розведення і генетики тварин УААН*

*Національний аграрний університет*

УДК 636.082.453.53

М.П. ЖУРАВЕЛЬ

### ВПЛИВ ГІПООСМОЛЯРНСТІ НА ХАРАКТЕР І МЕХАНІЗМ УШКОДЖЕННЯ СПЕРМІЇВ ШЛЯХОМ СПЕЦИФІЧНОЇ ДЕФОРМАЦІЇ ЇХ

Як відомо, на різних етапах заморожування і відтавання сперми можуть відбуватися значні зрушення осмотичного тиску як у бік гіперосмолярності, так і гіпоосмолярності, тобто порушується осмотична рівновага між протоплазмою спермія і середовищем, яке оточує клітину. Про це повідомляють автори багатьох робіт. Однак досліджень, присвячених

© М.П. Журавель, 2001

Розведення і генетика тварин. 2001. Вип. 34