

## ЛІТЕРАТУРА

Поляковский В. И., Богданов Л. В. Оплодотворяющая способность спермы быков с различными генетически обусловленными типами трансферринов сыворотки крови. Тезисы докладов научно-производственной конференции по биологии размножения и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных. Минск, 1969.

Поляковский В. И. Наследственный полиморфизм крупного рогатого скота и овец БССР по некоторым белкам крови. Автореферат диссертации. Минск, 1971.

Ashton G. C.  $\beta$ -globulin polymorphism and early foetal mortality in cattle. Nature, 1959, vol. 183, pp. 404.

Ashton G. C.  $\beta$ -globulin polymorphism and economic factors in dairy cattle. J. Agric. Sci., 1960, vol. 54, p. 321.

Ashton G. C.  $\beta$ -globulin type and fertility in artificially bred dairy cattle. J. Reprod. Fertil, 1969, vol. 2, nr. 2, p. 117.

Ashton G. C. Cattle serum transferrins: a balanced polymorphism? Genetics, 1965, vol. 52, p. 983.

## ДЕЯКІ ПИТАННЯ ТЕОРІЇ ГЛИБОКОГО ОХОЛОДЖЕННЯ СПЕРМИ

**І. В. СМІРНОВ**, професор

Українська сільськогосподарська академія

Спосіб тривалого зберігання сперми бугаїв-плідників останніми роками набув значного поширення. Тільки у 1971 р. на території Української РСР спермою, збереженою в рідкому азоті, осіменено понад 1 млн. корів і телиць. На перспективу передбачається переведення більшості станцій і пунктів штучного осіменіння та тривале зберігання сперми.

Проте способи заморожування сперми, які застосовуються тепер, ще далекі від досконалості. Про це свідчить хоча б той факт, що в процесі заморожування і відтавання сперми гине від 20 до 60% активних спермій. Та обставина, що спермії, які залишаються живими, забезпечують нормальне запліднення корів, ніяк не може бути оправданням значних витрат статевих клітин кращих племінних плідників. Крім того, сперма деяких бугаїв (в першу чергу м'ясних порід) погано витримує заморожування.

Відносна недосконалість методів заморожування сперми пояснюється насамперед недостатнім розробленням теоретичних основ глибокого охолодження біологічних об'єктів. Про процеси, які відбуваються при заморожуванні сперми, ми маємо дуже поверхове уявлення, а техніка заморожування розробляється в основному емпіричним шляхом. У цій статті описані деякі теоретичні міркування щодо цього.

Наприкінці тридцятих-сорокових років, коли робилися перші спроби заморожувати сперму, теоретичною основою методу була гіпотеза Б. Лайта (1941), яка зводиться до того, що при замерзанні біологічних об'єктів відбувається кристалізація води, яка в них міститься. Утворені при цьому кристали льоду пошкоджують протоплазму клітин, її колоїди втрачають зв'язану воду (внаслідок її вимерзання), денатуруються,

і клітини гинуть. Ці явища зникають при некристалічному, склоподібному затвердінні (вітрифікації) біологічних об'єктів.

Щоб зрозуміти, яким шляхом можна досягти вітрифікації клітин, треба пригадати, як відбувається процес кристалізації води при замерзанні. В охолоджуваній воді утворюються зародкові центри кристалізації — скупчення молекул з малою кінетичною енергією. В'язкість води, яка зростає із зниженням температури, а також уповільнення теплового руху молекул спочатку полегшують утворення таких центрів, але потім починають перешкоджати переміщенню молекул у рідині. Тому при дальшому зниженні температури швидкість утворення центрів кристалізації зменшується і, нарешті, падає майже до нуля. Подібно до цього змінюється і швидкість зростання утворених кристалів: спочатку вони ростуть швидко, а потім їх ріст припиняється.

Нижня межа температурного інтервалу, при якому інтенсивно відбуваються кристалізаційні процеси, до цього часу точно не визначена. При заморожуванні сперми вона лежить, мабуть, між  $-30$  і  $-50^{\circ}$ .

Б. Лайт вважає, що при дуже швидкому охолодженні об'єкту вдається «проскочити» небезпечну температурну зону кристалізації і досягти зони вітрифікації, де протоплазма застигає як єдине ціле, без вимерзання води і без утворення кристалів льоду.

Склоподібний стан нестійкий. При певних умовах, зокрема при підвищенні температури, у вітрифікованій речовині може початися утворення кристалів (девітрифікація). Щоб запобігти цьому, вітрифіковані об'єкти треба зберігати при достатньо низьких температурах (нижче  $-80^{\circ}$ ) і розморожувати з максимальною швидкістю: у цьому випадку при проходженні через небезпечну температурну зону кристали льоду не встигнуть утворитись, і вода безпосередньо із склоподібного стану перейде у рідкий.

Оскільки швидке охолодження масивних об'єктів утруднене, Лайт рекомендує вітрифікувати малі об'єми біологічних рідин (крові, сперми) або ж дрібні шматочки тканини.

Гіпотеза Лайта не викликала заперечень з боку дослідників сорокових років. Проте пізніше у зв'язку з повторним відкриттям англійськими вченими Полджем, Парксом і Смітом захисної дії гліцерину (вперше цю дію відкрили російські вчені — Максимов у 1912 р. на рослинних об'єктах, Бернштейн і Петропавловський у 1936 р. — на спермі) виникли сумніви щодо можливості вітрифікувати сперму. Зокрема зазначалось, що чиста вода переходить у склоподібний стан лише при дуже великих швидкостях охолодження ( $5000$  град/сек) і рекристалізується при температурах близько  $-130^{\circ}$ . Це заперечення недостатньо обгрунтоване: більша частина води у клітинах зв'язана з колоїдами протоплазми, а властивості зв'язаної води різко відрізняються від властивостей вільної води. Переміщення частинок, необхідне для побудови кристалічної решітки, в зв'язаній воді значно утруднене.

Довести експериментально, яку структуру має глибоко охолоджена протоплазма — склоподібну чи дрібнокристалічну (як вважав, наприклад, А. І. Лопирін, 1971), — поки що важко в зв'язку з малими розміра-

ми об'єктів (сперміїв), а також внаслідок того, що сперма — складна, багатофазна система. Проте багато фактів підтверджують гіпотезу вітрифікації. Ще раніше, заморожуючи сперму у тонкостінних алюмінієвих пакетиках при температурах від  $-78^{\circ}$  до  $-19^{\circ}$ , відмічали поновлення руху сперміїв лише при швидкому відтаванні в теплій ( $+38^{\circ}$ ) воді (І. Н. Смирнов, 1947—1949). При більш повільному відтаванні (на повітрі при температурі  $+20-22^{\circ}$ ) спермії в усіх випадках гинули. Загибель сперміїв в цих умовах найлегше пояснити з позиції гіпотези вітрифікації (слід додати, що середовище, яким розбавляли сперму перед заморожуванням, не містить жовтка і гліцерину). Проведеними дослідниками разом з О. Є. Бруенко (1971) ми встановили, що при підвищенні швидкості відтавання гранул замороженої сперми (об'ємом 0,1 мл) різко збільшується кількість сперміїв, які відновлюють нормальний рух. Мабуть, у цьому випадку вдається уникнути рекристалізації протоплазми сперміїв, яка відбувається при більш повільному розморожуванні.

Характерно, що для сперми, замороженої в поліетиленових або скляних ампулах (об'ємом близько 1,2 мл) і попередньо розбавленої глюкозо-цитратно-жовтково-гліцеринним середовищем, збільшення швидкості відтавання сприяло лише незначному поліпшенню активності сперміїв. Звідси можна зробити два висновки: 1) процеси, які відбуваються при швидкому (у гранулах) і відносно повільному (в ампулах) заморожуванні, якісно відмінні; 2) при заморожуванні сперми в гранулах значна частина сперміїв гине в процесі відтавання (мабуть, внаслідок рекристалізації), тимчасом як в ампулах спермії гинуть в основному ще в процесі заморожування.

Пояснюючи причини загибелі сперміїв при заморожуванні, не можна не згадати про згубну дію різких змін осмотичного тиску, які можуть відбуватися як при заморожуванні, так і при відтаванні. При повільному охолодженні кристалізація води починається, мабуть, у рідкій фазі (плазмі) сперми. Внаслідок вимерзання частини води утворюються концентровані розчини солей і цукрів, які спричиняють обезводнення сперміїв. Відомо, що при кімнатній температурі підвищення осмотичного тиску у рідкій фазі сперми на 100% (наприклад, при розбавленні сперми 2-процентним розчином хлористого натрію) призводить до швидкого припинення руху майже усіх сперміїв. Проте, за даними наших досліджень (1958), не всі спермії гинуть відразу, частина нерухомих сперміїв перебуває протягом певного періоду у стані «осмотичного анабіозу» і може відновити рух після зниження осмотичного тиску до норми. Крім того, до цього часу майже не вивчена дія осмотичних факторів при температурах нижче нуля; цілком можливо, що осмотична стійкість сперміїв у таких умовах може значно зростати.

Введення гліцерину ще більше ускладнює процеси, які відбуваються під час заморожування сперми. Гліцерин знижує точку замерзання сперми, завдяки чому сперма набуває здатності переносити глибоке переохолодження. Гліцерин також знижує дисоціацію солей і тим самим зменшує згубну дію гіпертонічних розчинів. І, нарешті, гліцерин проникає в протоплазму сперміїв і підвищує їх стійкість проти заморожуван-

ня. Правда, деякі автори (Т. П. Ільїнська, 1970) заперечують здатність гліцерину проникати крізь оболонку сперміїв, але, як показали досліди Душейко (1972), подібні твердження, мабуть, безпідставні.

Проте захисна дія гліцерину, який проникнув всередину клітини, поки що майже не вивчена і не пояснена. Значення гліцерину як фактора, який знижує осмотичний тиск при заморожуванні сперми, також не цілком з'ясовано. У лактозо-жовтковому середовищі, яке використовується при заморожуванні сперми у вигляді гранул, майже немає солей, за винятком солей жовтка. Однак гліцерин достатньо чітко проявляє свою захисну дію і в цьому розбавлювачі. Мабуть, це пояснюється проникненням гліцерину всередину сперміїв, хоча переконливого пояснення його захисної ролі в протоплазмі поки що не встановлено.

Це не означає, що ми заперечуємо важливу роль осмотичних явищ у рідкій фазі сперми, які відбуваються під час її заморожування. Навпаки, дослідження останніх років свідчать про першорядне значення цього фактора. У наших спільних з А. З. Ємець дослідженнях (1970) встановлено, що наслідки заморожування залежать від вихідного значення осмотичного тиску в спермі перед її заморожуванням. У еякулятах з пониженим осмотичним тиском активність сперміїв після заморожування і відтавання значно нижча, ніж у спермі з нормальним осмотичним тиском. Більше того, вдавалось значно поліпшити результати за допомогою штучного підвищення осмотичного тиску (розбавлення гіпертонічним розчином) перед заморожуванням сперми. Хоча цей захід пробували застосовувати вже давно (Шаффнер, Гендерсон і Кард, 1941; Е. Я. Граєвський, 1948; І. В. Смирнов, 1947—1950), вперше з'ясовано, що позитивні результати можна одержувати лише в тих випадках, коли вихідний осмотичний тиск у спермі буде нижче нормального.

Дати теоретичне пояснення зазначеному явищу поки що важко. Можливо, що при зниженому осмотичному тиску у плазмі сперми, внаслідок виникнення осмотичного градієнта, частина води з плазми переходить всередину сперміїв, завдяки чому полегшується утворення кристалів льоду в протоплазмі. Під дією гіпертонічних розчинів може відбуватися протилежний процес: частина вільної води переміщується з протоплазми сперміїв у рідку фазу сперми. Таке часткове обезводнення, на думку Е. Я. Граєвського та інших дослідників, зменшує імовірність кристалізації протоплазми.

Застосовуючи гіпертонічні розбавлювачі, ми вперше успішно заморозили сперму кролів, баранів і бугаїв без використання гліцерину. У тих же дослідах встановили вплив ступеня розбавлення сперми (вплив співвідношення між об'ємом клітин і рідкої фази сперми) на результати заморожування. Сперма з великою концентрацією сперміїв (після розбавлення середовищем) заморожувалась гірше, ніж сильніше розбавлена сперма. Одержані дані дещо підтвердились у дослідах М. І. Лопатко (1963): активність сперміїв барана після заморожування і відтавання поліпшувалась з підвищенням ступеня розбавлення. Цей факт ми спробували пояснити тим, що при зростанні ступеня розбавлення сперми збільшується об'єм міжклітинного середовища, у якому починається

кристалізація води при охолодженні сперми нижче точки замерзання. Кристали, які ростуть, наче всмоктують воду із сперміїв, сприяючи їх частковому обезводнюванню. Цей процес посилюється і під дією гіпертонічного розчину, який утворюється внаслідок вимерзання води. Дія останнього не призводить до загибелі сперміїв, оскільки при низьких температурах спермії менш чутливі до осмотичних зрушень, ніж при позитивних температурах. Втрата вільної води утруднює внутрішньоклітинну кристалізацію і сприяє вітрифікації протоплазми сперміїв.

Таким чином, говорячи про можливість вітрифікації сперми, ми маємо на увазі насамперед перехід до склоподібного стану протоплазми сперміїв, причому частина води у рідкій фазі сперми може закристалізуватися. Це, звичайно, гіпотеза, але вона здається нам достатньо обґрунтованою, особливо якщо згадати, що процент зв'язаної води всередині клітин значно вищий, ніж у плазмі сперми.

Згідно з теоретичними уявленнями імовірність вітрифікації сперми повинна зростати з зниженням об'єму гранул (з підвищенням швидкості охолодження). Проте це положення не підтверджується досвідом роботи деяких станцій по штучному осіменінню, на яких з приблизно однаковим успіхом заморожують гранули об'ємом від 0,1 до 0,5 мл (і навіть більше). Цей факт підтверджує припущення про те, що при швидкому заморожуванні сперми процес вітрифікації відбувається не у «чистому вигляді», а при частковій кристалізації плазми (можливо, і частини сперміїв).

Ще одне підтвердження сказаному одержано в наших спільних з О. Є. Бруенко дослідах щодо заморожування сперми в гранулах на фторопластових пластинах з різною температурою (яку контролювали за допомогою термопар). Найкращі результати одержані при відносно високих ( $-60^{\circ}$  і навіть  $-40^{\circ}$ ) температурах, що, здавалось би, суперечить гіпотезі вітрифікації. Однак, якщо припустити одночасне проходження у спермії процесів вітрифікації і кристалізації, цей факт пояснюється по-іншому.

Отже, ми переконані в тому, що процеси, які відбуваються при заморожуванні сперми в гранулах і ампулах, неоднакові. Тут відіграє роль і режим охолодження, і різниця у складі розбавлювачів, і об'єм заморожуваних доз, і залежність швидкості охолодження від матеріалу ампули чи іншої місткості для сперми.

У зв'язку з цим представляють інтерес дані Хироші (1971), який заморожував сперму в пластмасових «соломках» і одержав приблизно однакові результати, розморозивши її при різних температурах (від  $+5^{\circ}$  до  $+50^{\circ}$ ). Мабуть, тут відігравали роль теплопровідність і теплоємність облицювального матеріалу.

Який з методів заморожування — швидкий чи відносно повільний — більш перспективний? На нашу думку, слід надавати перевагу швидкому заморожуванню. Однак це не означає, що заморожування в ампулах не має майбутнього. Проте необхідні якісні докорінні зміни його технології на базі глибоких теоретичних досліджень процесу заморожування сперми.