

2,5% вище, ніж у звичайному глюкозо-цитратному жовтковому розсувачі, який застосовується для збереження сперми при температурі близько 0°. Це у більшості випадків значно поліпшувало наслідки розрощування еякулятів з пониженим осмотичним тиском (табл. 4). Рекомендувати для виробництва даний прийом штучного підвищено-осмотичного тиску в спермі можна буде лише після проведення широким досліджень.

Отже, одержані дані переконливо свідчать про тісний зв'язок міжністю сперміїв бугаїв переносити глибоке заморожування і величину осмотичного тиску еякулятів після одержання.

Література

Ковальов М. Г. Деякі питання фізіології сперми і спермопродукції. Зб. «Введення і утримання сільськогосподарських тварин», 1965.

Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. М., Сельхозгиз, 1962.

Полярков Э. Ф. Известия Петроградской биологической лаборатории, 1915.

Смирнов И. В. Действие растворов с разным осмотическим давлением на сперму барана и быка. Сб. «Труды Харьковского зоотехнического института», т. IX, 1927.

Смирнов И. В. Действие осмотических факторов на сперми быков и хряков. Научные труды Киевской опытной станции животноводства, т. X, 1963.

Смирнов И. В. Влияние глицерина и гипертонических растворов на переживаемые сперми быков-производителей. Научные труды Киевской опытной станции животноводства, т. IX, 1962.

Осташко Ф. И. О природе холодового удара живчиков. «Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных». Харьков, 1963.

Н. П. Шергин. Биохимия сперматозоидов, 1969.

Caleotti, Rev. Sc. Biol., 6, 1910.

Roesmеле Lool. jahrb. 44, 1, 1927.

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ РІЗНИХ МЕТОДІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ

О. О. БРУЄНКО,

аспірант

*Центральна дослідна станція по штучному
осіменінню сільськогосподарських тварин*

Протягом останніх років на станціях штучного осіменіння застосовуються декілька методів глибокого заморожування сперми бугаїв-виробників. Літературні дані щодо ефективності різних методів суперечливі (Ф. І. Осташко, 1968; Г. В. Фроріц, 1968; М. П. Ющенко та ін., 1969).

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

1968; А. П. Варнавський, В. Ф. Турбін, 1968; Г. С. Гайворонський, Р. В. Труба, 1968; Х. Х. Хабібулін, 1969; Г. С. Шарапа, А. М. Дмитраш, 1969, та ін.). Певною мірою ця суперечливість залежить від різних умов проведення дослідів. Враховуючи це, нашим завданням було провести кріобіологічні дослідження при заморожуванні сперми бугаїв різними методами в однакових умовах. У дослідях вивчали фізіологічні показники сперміїв (активність та живучість), динаміку температури сперми в процесі заморожування і температурні зони відмирання сперміїв.

Для дослідів використовували сперму 15 бугаїв-плідників симентальської та чорно-рябої порід віком 2—9 років. Заморожували сперму трьома методами, рекомендованими «Інструкцією по організації і технології роботи станцій по штучному осіменінню сільськогосподарських тварин», 1968 р.: методом дворазового розведення і тріступеневого режиму заморожування в ампулах за допомогою апарата АХК-4; методом одноразового розведення і швидкого заморожування в формі гранул на твердому двоокису вуглецю; методом одноразового розведення і швидкого заморожування в полістиролових капілярах у парі рідкого азоту.

Динаміку температури сперми в процесі заморожування контролювали за допомогою мідь-константанових термопар і самописного електронного потенціометра ЕПП-09М. Живучість визначалась під час інкубації сперміїв при температурі 38°.

При заморожуванні сперми методом дворазового розведення і тріступеневого режиму заморожування використовували глюкозо-цитратно-жовткове середовище. Остаточна концентрація гліцерину становила 8%, еквілібрація тривала 12—18 год. Сперму розфасовували в морозостійкі поліетиленові ампули і заморожували в азотно-холодильній камері за такою програмою: від 0 до 15° — з швидкістю охолодження 0,5 град/хв; від —15 до —50° — з швидкістю 2 град/хв і від 50 до 80°—6 град/хв. Кінець термопарі фіксували в нижній розширеній частині наповненої ампули. Для контролю активності сперміїв у процесі заморожування виймали ампули з азотно-холодильної камери на 13—15, 20—24, 28—29, 32—33, 35—37, 40—41 і 47—48-й хв від початку заморожування та через 5 хв після занурення в рідкий азот. Розморозували ампули у воді температурою 40°.

При заморожуванні сперми в гранулах об'ємом 0,1 мл на твердому двоокису вуглецю використовували середовище такого складу: 11-процентного розчину лактози — 63 мл, гліцерину — 7 і жовтка — 30 мл. Еквілібрація тривала 5—6 год. Через 40, 50, 60, 70, 80 і 90 сек та 2, 3 і 4 хв від початку заморожування та через 5 хв після занурення гранул у рідкий азот розморозували гранули в 1 мл підігрітого до 38—40° 3-процентного розчину цитрату натрію, а потім перевіряли активність сперміїв. Температуру сперми при заморожуванні на твердому двоокису вуглецю визначали зануренням кінця термопарі приблизно в центр гранули.

Активність та живучість сперміїв при різних методах заморожування, % (m ± m)

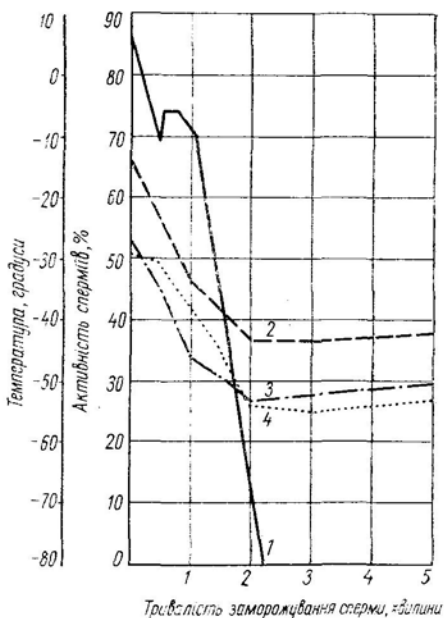
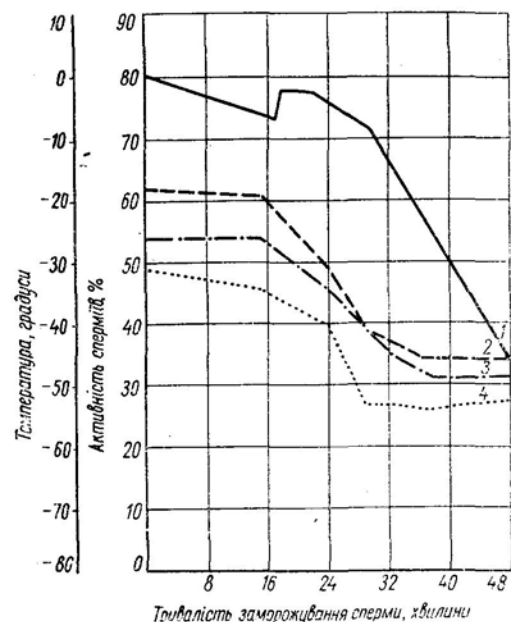
Методи заморожування	Активність сперміїв при початковій їх активності після еквілібрації						Абсолютний показник живучості сперміїв після розморожування при початковій активності сперміїв				
	після еквілібрації		після заморожування			80	70	60	80	70	60
	80	70	80	70	60						
В ампулах	62 ± 2,1	52 ± 1,1	49 ± 1,8	34 ± 2,9	31 ± 1,4	29 ± 2,2	0,77 ± 0,16	0,73 ± 0,05	0,51 ± 0,08		
В капілярах	66 ± 1,8	54 ± 1,4	52 ± 1,3	39 ± 1,0	35 ± 1,9	32 ± 1,6	1,14 ± 0,07	0,93 ± 0,08	0,71 ± 0,09		
В гранулах	69 ± 2,4	56 ± 1,4	51 ± 1,3	48 ± 2,0	38 ± 2,7	37 ± 1,3	1,5 ± 0,13	1,03 ± 0,11	0,9 ± 0,06		

При заморожуванні сперми в капілярах застосовували середовище такого складу: вода дистильована — 100 мл, лактоза — 11,5 г, гліцерин — 5 мл, жовток — 20 мл. Сперму розфасувували в капіляри вакуумним способом і після 5—6-годинної еквілібрації заморожували протягом 5 хв в парі рідкого азоту на спеціальному штативі стаціонарного спермосховища, а потім занурювали в рідкий азот. Розморжували сперму в поліетиленових мішках у теплій (30—40°) воді. Зміну температури при охолодженні сперми записували на потенціометрі ЕПП-09М при зануренні термодари в середню третину капіляра.

Усі досліди проводили на розділених еякулятах. Всього було використано 23 еякуляти, в тому числі 5 — з початковою активністю сперміїв 80 і 10—70% та 8 еякулятів — з початковою активністю 60%. Сперму з пониженою активністю сперміїв використовували для глибшого вивчення залежності ефективності заморожування від початкової активності.

Дослідженнями встановлено, що краща активність сперміїв та їх живучість після розморожування була при заморожуванні сперми в гранулах та капілярах (див. табл.). Слід зазначити, що в еякулятах з вищою активністю гине відносно більша кількість сперміїв. Так, при заморожуванні сперми в ампулах з початковою активністю сперміїв 80% після розморожування їх активність знижується на 46%, при початковій активності 70 — на 39, а при початковій активності сперміїв 60% — лише на 31%. При заморожуванні сперми в капілярах активність знижується відповідно на 41; 35 і 28%, в гранулах — на 32; 32 і 23%. Отже, відмирання сперміїв у процесі заморожування в меншій мірі залежить від початкової активності, ніж від дії фізичних факторів. Проте показник живучості сперміїв для гіршої сперми нижчий, ніж для сперми з високою початковою активністю.

Інтенсивність відмирання сперміїв на різних етапах процесу заморожування сперми неоднакова. Так, при заморожуванні сперми в ампулах (рис. 1) активність сперміїв залишається приблизно на одному рівні протягом 15 хв, тобто до



1. Динаміка температури сперми та активності спермійв при заморожуванні в ампулах:

1 — температура, 2 — початкова активність спермійв — 80%, 3 — початкова активність спермійв — 70%, 4 — початкова активність спермійв — 60%.

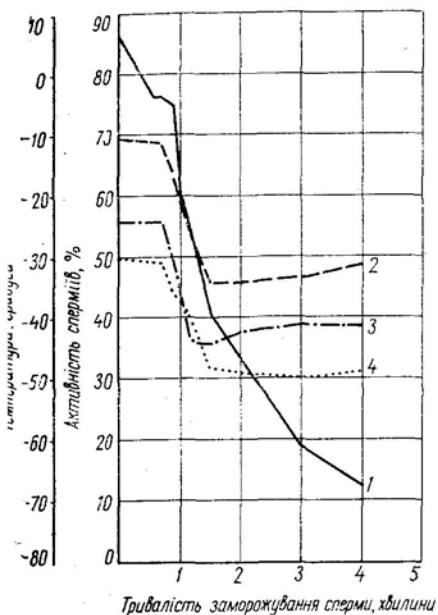
2. Динаміка температури сперми та активності спермійв при заморожуванні в капілярах:

1 — температура, 2 — початкова активність спермійв — 80%; 3 — початкова активність спермійв — 70%; 4 — початкова активність спермійв — 60%.

початку кристалізації, яка починається з 13—17 хв, коли температура сперми досягає $-4-6^{\circ}$. З цього моменту починається поступове зниження активності спермійв, що, очевидно, пояснюється кристалізаційними процесами в спермі, які тривають до 28—36 хв заморожування, а потім активність залишається на одному рівні. Таким чином, головною причиною відмирання спермійв при повільному режимі заморожування є кристалізація плазми сперми, а, можливо, і протоплазми спермійв.

При заморожуванні сперми в капілярах активність спермійв змінюється по-іншому (рис. 2). Досить швидко вона знижується ще до кристалізації, яка починається на 25—27-й сек заморожування при температурі $-10-11^{\circ}$. Можливо, це відбувається внаслідок температурного шоку при швидкому охолодженні. Зниження активності триває протягом наступних 1,5 хв. За цей час температура сперми знижується приблизно до -40° .

При заморожуванні сперми в гранулах на твердому двооксиду вуглецю (рис. 3) спостерігався третій тип відмирання спермійв. Температура сперми при цьому знижувалась досить швидко (але повільніше,



Тривалість заморожування сперми, хвилини

3. Динаміка температури сперми та активності сперміїв при заморожуванні в гранулах:

1 — температура; 2 — початкова активність сперміїв — 80%; 3 — початкова активність сперміїв — 70%; 4 — початкова активність сперміїв — 60%.

Якщо активність сперміїв через 1,5—2 хв від початку заморожування сперми в гранулах і капілярах була мінімальною для даного еякуляту, то при розморожуванні через 4—5 хв від початку заморожування активність сперміїв підвищувалась на 5—6%. Можна припустити, що за цей час відбулась стабілізація фізичного стану сперміїв і створились більш оптимальні умови при їх розморожуванні.

Дослідженнями також встановлено, що при заморожуванні сперми на АХК-4 крива зниження температури сперми на деяких відрізках значно відхиляється від заданої за програмою, що пояснюється кристалізаційними процесами, які проходять з виділенням тепла. Сперма в ампулах приймає задану температуру (-80°) через 3—4 хв після закінчення програми охолодження. У гранулах об'ємом 0,1 мл температура сперми наближається до температури твердого двоокису вуглецю після 3 хв, а в капілярах температура сперми наближається до температури рідкого азоту після 5 хв від початку заморожування.

ніж при заморожуванні в капілярах) і через 30—40 сек після нанесення сперми на блок двоокису вуглецю досягала $-3-4^{\circ}$. Кристалізація супроводжується не підвищенням температури, а підтриманням її на одному рівні протягом кількох секунд. Активність сперміїв, як і при заморожуванні в ампулах, до початку кристалізації майже не знижується, що свідчить про відсутність умов для значного прояву температурного шоку. Після початку кристалізації активність сперміїв досить швидко знижується до 80—90 сек від початку заморожування при температурі сперми близько -30° . Причина відсутності явища температурного шоку сперміїв при заморожуванні на твердому двоокису вуглецю ще невідома. Можливо, це пов'язано із специфічними обставинами процесу замерзання сперми (верхня половина гранули не має контакту з охолоджувачем). Таким чином, процеси, які відбуваються при швидкому заморожуванні сперми, проходять по-різному залежно від технічних особливостей методу заморожування.