

користанням для осіменіння. Цією спермою осіменяли корів і телиць у радгоспах «Бобрикський», «Требухівський», «Красилівський» Броварського району Київської області. Дозою для осіменіння була одна гранула сперми, яку розморожували в 1 мл 3-процентного розчину лимоннокислого натрію. Розморожували гранули у флаконах, які вставляли у водяну баню при температурі +38—40°.

Заплідненість корів і телиць визначали за допомогою ректальних досліджень, які проводили через 2,5—3 місяці після осіменіння.

Активність замороженої сперми різних строків зберігання знаходилась на одному рівні й дорівнювала 4,5 бала (див. табл.).

#### Активність і запліднювальна здатність замороженої сперми різних строків зберігання

Строки зберігання замороженої сперми, доби	Активність сперми, бали	Осіменено всього тварин	В тому числі телиць	Заплідненість всіх тварин, %	В тому числі телиць, %
1—10	4,5	204	9	73,1	78,2
11—20	4,5	91	9	72,5	78,1
Понад 21	4,5	102	47	74,6	77,3

Заплідненість корів і телиць від першого осіменіння при використанні замороженої сперми зазначених строків зберігання дорівнювала відповідно 73,1 і 74,6%.

При опрацюванні матеріалів щодо заплідненості тварин достовірної різниці між тваринами різних груп не встановлено. Більш висока заплідненість повинна бути у групі тварин, яких осіменяли спермою, що зберігалась в замороженому стані більше 21 доби. Незважаючи на те, що в цій групі питома вага телиць в загальному поголів'ї осіменених тварин була найвища (більше 46%), заплідненість не підвищилась.

Таким чином, активність і запліднювальна здатність замороженої сперми ранніх строків зберігання (до 20 діб) знаходиться на такому ж рівні, як і сперми пізніших строків зберігання (понад 20 діб).

## ПРО ДЕЯКІ БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ У ЗАМОРОЖЕНІЙ СПЕРМІ КНУРІВ

**М. Т. ПЛІШКО, Б. М. ВЕЛЬМОЖНИЙ, Г. С. ЛІСОВЕНКО,**

*кандидати біологічних наук*

**В. Ю. ХАЗАН,**

*молодший науковий співробітник*

Центральна дослідна станція по штучному осіменінню  
сільськогосподарських тварин

Розробка методу тривалого зберігання сперми кнурів у глибокозамороженому стані має велике зоотехнічне значення. Однак сучасні дані свідчать про те, що це питання ще не зовсім вирішено.

ло дослідників (Полдж, 1956; Байер, 1962; Ніва, 1963; С. І. 1964, та ін.) використовували різні технологічні способи заання сперми кнурів до низьких температур із застосуванням зріджувачів та режимів охолодження і відтаювання. Однак с, осіменених розмороженою спермою, приплід одержали лише тох випадках (Байер, 1967).

ка активність та короточасна переживаність розморожених кнура свідчать про високу чутливість їх до холоду та про не розроблені способи заморожування сперми. Вважають, що м цього є глибокі порушення статевих клітин. Тому в перспекливо встановити основні причини, які викликають загибель вивчити механізм їх дії, виявити найбільш чутливі до заморо- структури і розробити на цій основі технологічні прийоми, що и б сперміїв від летальних факторів у процесі заморожування зжування.

ливу роль у русі сперміїв відіграє аденозинтрифосфорна кисло- ), аеробний синтез якої здійснюється мітохондріями. Якщо втра- аси АТФ не поповнюються, то робота скоротливого апарата припиняється. Для збереження мітохондрій і нормальної їх необхідно підтримувати у них певний рівень АТФ і АДФ (Па- , 1961).

гягом останніх років було встановлено, що у нормальних клі- иження рівня АТФ супроводжується підвищенням проникності цих структур і виходом з них коензимів, необхідних для сти- гліколізу (А. Г. Буличов, 1969). Лише після відновлення нор- ) рівня АТФ зменшується проникність мітохондрій, знижується гь їх до набухання і руйнування.

бхідно відшукати методи, які підвищували б рівень АТФ у спер- ед їх заморожуванням, застосовуючи екстра- та інтрацелюляр- іхисні речовини.

исно-відновних ферментів, які каталізують дихання статевих важливу роль у життєдіяльності сперміїв відіграють дегідроген- тохромоксидази (Н. П. Шергін, 1940; В. Г. Семаков, 1961). По- співавтори (1964) повідомляють, що у спермі доброї якості ак- дегідрогеназ висока, а в спермі низької якості вона нижча або дсутня.

ливо з'ясувати, як діє охолодження і глибоке заморожування кнурів на активність дегідрогеназ сперміїв.

льки фосфоліпіди входять до складу захисної оболонки , ми вивчили зміну їх кількості в процесі охолодження та при ту заморожуванні сперми. В. К. Милованов, І. І. Соколовська становили, що фосфоліпіди відіграють важливу роль у механізо- тогового удару сперміїв. Вони вважають, що спермії при різко- дженні гинуть внаслідок затвердіння одного з фосфоліпідів — огену, точка плавлення якого висока. За даними Є. Д. Кім три холодовому ударі кількість фосфоліпідів у сперміях бугаїв еншується (до 60% від початкового), а у плазмі їх концентра-

ція збільшується на 12%. Щодо сперми кнурів подібних досліджень у науковій літературі ми не знайшли.

Враховуючи роль іонів кальцію та магнію у ферментативних процесах, наприклад в активуванні або гальмуванні аденозинтрифосфатаз, дезоксирибонуклеаз, рибонуклеаз, протеаз та інших ензимів, ми також вивчали динаміку цих катіонів у сперміях при глибокому їх заморожуванні.

**Методика досліджень.** Для досліду використали сперму трьох елітних кнурів великої білої породи віком від двох до п'яти років. Сперму одержували на штучну вагіну по одному-два еякуляти в тиждень.

Свіжоодержану сперму оцінювали за якісними і кількісними показниками. Залежно від вимог методики її розріджували різними середовищами. Контролем була нерозріджена сперма.

Основними середовищами для розрідження і заморожування сперми були глюкозо-хелато-цитратне (ГХЦ) та глюкозо-хелато-цитратно-жовткове (ГХЦЖ) з гліцерином і без гліцерину (М. Т. Плішко, 1963—1968). Еякуляти ділили на частини, які розріджували і розливали по 1 мл в ампули або пробірки.

Для швидкого заморожування ампули із спермою поміщали у касети, які опускали в посудину АТ-4 і витримували над поверхнею рідкого азоту при температурі його пари ( $-160$ — $-180^{\circ}$ ) не менше 5 хв, а потім занурювали безпосередньо в азот.

Другу частину ампул охолоджували в холодильнику під контролем термодатчика до температури  $8$ — $9^{\circ}$  за 3—4-годинним рівномірно-сповільненим режимом. Частину ампул залишали у цих температурних умовах для визначення переживаності сперміїв та для інших досліджень, а частину заморожували у спиртовій ванні та рідкому азоті за рівномірно-прискореним режимом (Ніва, 1963).

Після 48-годинного витримання ампул у рідкому азоті їх розморожували при двох температурних режимах: повільно — при температурі  $2$ — $5^{\circ}$ , швидко — у водяній бані при температурі  $50$ — $60^{\circ}$ .

У розморожених зразках визначали активність сперміїв, а потім їх досліджували за відповідними методиками.

Аденілові сполуки (АТФ і АДФ) визначали за методикою І. Ю. Сейца (1957), неорганічний фосфор клітин — у безбілковому екстракті після адсорбції з нього аденозинфосфатів, активність дегідрогеназ — за методом В. Г. Семакова (1961). Вміст кальцію і магнію визначали за допомогою комплексонометричного методу (М. Т. Плішко і А. Г. Скварук, 1968), фосфоліпідів — за методом Фольча.

**Результати досліджень.** При визначенні вмісту аденілових сполук та неорганічного фосфору в сперміях встановлено, що після заморожування і відтавання сперми рівень АТФ, АДФ і неорганічного фосфору різко зменшується (табл. 1).

При заморожуванні нерозрідженої сперми до  $10^{\circ}$  вміст АТФ і АДФ знижувався більш як у два рази, а при  $-196^{\circ}$  — у 5 разів.

Майже так само знижувався вміст неорганічного фосфору. У пробах сперми, яку розріджували середовищами ГХЦ і ГХЦЖ, також

вплив низької температури на динаміку вмісту АТФ, АДФ та неорганічного фосфору у сперміях, *мкг/млрд*

Довища для розрідження сперми	Легкогідролізний фосфор			Неорганічний фосфор		
	до заморожування	при -10°	при -196°	до заморожування	при -10°	при -196°
нерозріджене	0,90	0,38	0,17	12,56	7,38	2,92
озо-хелато-цитратне	1,17	0,51	0,28	4,88	2,95	0,75
озо-хелато-цитратно-кове	1,40	0,62	0,34	6,24	2,92	0,86

Зменшувався вміст аденілових сполук та неорганічного фосфору. Так рівень цих макроергів у пробах був значно вищий, ніж у нерозрідженій спермі. Вміст неорганічного фосфору був вищий у пробах нерозрідженої сперми. Це пояснюється тим, що частина неорганічного фосфору була використана при синтезі АТФ і АДФ. Одержані результати вердили раніше опубліковані дані (М. Т. Плішко, М. Т. Андрусен-1966—1968) про те, що після розрідження сперми хелатоновими довищами вміст АТФ і АДФ у сперміях значно підвищується. У пробах розрідженої сперми кількість цих макроергів збільшилась відносно на 30 і 35% (1,17 і 1,40 *мкг* проти 0,90 *мкг*).

Слід зазначити, що активних сперміїв було більше у пробах сперми вищим рівнем аденілових сполук.

При дослідженні активності дегідрогеназ одночасно встановили активність цього ферменту у спермі, що є підтвердженням даних В. Г. Якова (1961) і А. Г. Хавинзона (1967). Заморожування сперми кнури призводить до зниження активності дегідрогеназ (табл. 2). Особливо різко знижується або і зовсім зникає активність цього ферменту після заморожування сперми до -196°. У нерозрідженій або розрідженій глюкозо-сольовим розчином спермі активність ферменту при температурі -196° була зовсім відсутня, а у пробах сперми, які були розріджені хелатоновими середовищами, вона була нижча порівняно з нерозрідженою в три рази. Важливо, що активність сперміїв корелює з активністю дегідрогеназ.

вплив низької температури на дегідрогеназну активність та активність сперміїв

Довища для розрідження сперми	До охолодження		При +10°		При -10°		При -196°	
	дегідрогеназа на активність, <i>хв</i>	% сперміїв з прямолінійним рухом	дегідрогеназа на активність, <i>хв</i>	% сперміїв з прямолінійним рухом	дегідрогеназа на активність, <i>хв</i>	% сперміїв з прямолінійним рухом	дегідрогеназа на активність, <i>хв</i>	% сперміїв з прямолінійним рухом
нерозріджене	18,50	76,6	38,48	59,0	34,24	24,0	Н	0
глюкозо-сольове	17,20	76,6	27,36	59,0	28,48	24,0	Н	0
глюкозо-хелато-цитратне	22,50	76,6	39,48	70,0	35,36	35,0	77,45	4,1
глюкозо-хелато-цитратно-кове	35,0	76,6	49,48	70,0	58,12	42,0	104,0	7,5

Примітка. Н — забарвлення не з'явилося навіть через 180 *хв*.

Ми також з'ясували, як діє глибоке заморожування сперми на динаміку вмісту кальцію і магнію у статевих клітинах (табл. 3).

### 3. Вплив глибокого заморожування сперми на вміст кальцію і магнію у сперміях

Середовища для розбавлення сперми	Вміст кальцію, мг/млрд		Зменшення вмісту кальцію після розмороження сперми, %	Вміст магнію, мг/млрд		Зменшення вмісту магнію після розмороження сперми, %
	до заморожування	після розморожування		до заморожування	після розморожування	
Нерозбавлене	0,0169	0,0133	18,3	0,0191	0,0154	19,4
Глюкозо-хелато-цитратне	0,0103	0,0044	59,2	0,0144	0,0101	29,8
Глюкозо-хелато-цитратно-жовткове	0,0105	0,0048	54,3	0,0143	0,0117	18,2

При заморожуванні сперми рівень цих катіонів у сперміях знижується. У нерозрідженій спермі вміст  $\text{Ca}^{++}$  і  $\text{Mg}^{++}$  зменшується відповідно на 18,3 і 19,4%, а у клітинах розрідженої хелатоновими середовищами сперми — відповідно на 54 і 59,2%. Слід зазначити, що ще до заморожування сперми, розрідженої цими середовищами, відбувається переміщення із сперміїв деякої кількості  $\text{Ca}^{++}$  і  $\text{Mg}^{++}$ , тому що в більшості випадків увесь кальцій і магній плазми сперми були зв'язані хелатоном.

Дослідженнями встановлено, що при заморожуванні сперми кнурів кількість фосфоліпідів майже не зменшується (табл. 4). Лише в окремих випадках відмічається деяка тенденція до зниження вмісту фосфоліпідів у сперміях і підвищення їх вмісту у плазмі сперми. Підвищений вміст фосфоліпідів у сперміях і плазмі сперми, розрідженої глюкозо-хелато-цитратно-жовтковим середовищем, можна пояснити наявністю жовтка, який входить до складу розбавлювача і має в собі фосфоліпід.

### 4. Вміст фосфоліпідів у спермі кнурів при її заморожуванні ( $M \pm m$ )

Режими охолодження сперми	Нерозріджена сперма		Сперма+ГХЦЖ (1:1)		Сперма+ГХЦ (1:1)	
	у 1 млрд. клітин, мг	у плазмі, мг%	у 1 млрд. клітин, мг	у плазмі, мг%	у 1 млрд. клітин, мг	у плазмі, мг%
Свіжоодржана	2,01±0,217	2,40±0,541	7,98±0,887	5,83±1,496	1,89±0,161	1,71±0,416
При +10°	2,40±0,529	2,99±0,511	7,54±0,535	4,59±1,312	1,93±0,165	1,73±0,450
При -10°	2,0 ±0,337	2,79±0,521	7,11±0,512	5,90±1,091	1,85±0,036	1,97±0,541
При -196°	2,10±0,325	2,81±0,677	7,40±0,569	5,02±1,257	1,86±0,036	2,05±0,468

Протягом останніх років на основі біохімічних та фізіологічних досліджень розробили середовище і режим заморожування сперми кнурів, при яких знижується згубна дія низьких температур, і після розморожування сперми близько 50% сперміїв залишається живими.

## ВИСНОВКИ

1. Під дією температури  $-196^{\circ}$  у статевих клітинах нерозрідженої розрідженої середовищами сперми кнурів різко знижується рівень ГФ, АДФ та неорганічного фосфору.

У сперміях розрідженої хелатоновими середовищами сперми рівень ГФ і АДФ приблизно у два рази вищий, ніж у нерозбавленій спермі.

2. При температурі  $-196^{\circ}$  дегідрогеназна активність у клітинах зрідженої сперми знижується у три і більше разів, а у клітинах незбавленої сперми вона майже відсутня.

3. Під дією глибокого заморожування значно зменшується вміст у сперміях кальцію і магнію.

4. Низькі температури не впливають на зміну вмісту фосфоліпідів сперміях кнурів.

5. При заморожуванні сперми кнурів відбуваються глибокі порушення біохімічних та фізіологічних процесів клітин, тому необхідно зрозуміти м'які методи захисту структур і хімічного складу сперміїв.

## ЛІТЕРАТУРА

Андрусенко М. Т., Плишко Н. Т. К методике исследования аденозинфосфатов и неорганического фосфора спермы. Сб. «Методики исследований по физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных». К., «Урожай», 1968.

Ким Е. Д. Фосфолипиды семени сельскохозяйственных животных. Автореферат диссертации. К., 1966.

Плишко Н. Т., Скварук А. Г. Комплексометрическое определение кальция и магния в сперме и секретах половых желез. Сб. «Методики исследований по физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных». К., «Урожай», 1968.

Семаков В. Г. Методика определения дегидрогеназы и цитохромоксидазы сперме животных. «Биохимия», 4, 1961.

Хавинзон А. Г. Изменение активности дегидрогеназной и цитохромоксидазной ферментных систем в сперме хряка при хранении. Сб. «Физиология и биохимия сельскохозяйственных животных», вып. 5. К., «Урожай», 1967.

Хавинзон А. Г. Сравнительная оценка активности некоторых дыхательных ферментов и количества глутатиона в сперме сельскохозяйственных животных. Автореферат диссертации. Львов, 1967.

Popescu P., Cîmpean C., Cîmpean N. Studiul activitatii dehidrogenazei spermei si mucusului cervical prin metoda. Thumberg simplificata si valoarea sa practica. Lucrari stiint. Inst. agron. N. Balcescu, 1964. c. 7.