

степени зависит выживаемость и устойчивость их при технологической обработке. В этом основную роль, по-видимому, играют серосодержащие аминокислоты, входящие в состав оболочки спермиев. При наличии этих кислот в

среднем 1,58 % абсолютная выживаемость спермиев составила 13,4, а при 0,73 % — только 7,6 ед., подвижность спермиев после замораживания — оттаивания была в среднем 4,2 и 3,2 балла.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Делеу В. Г. Изменение аминокислотного состава гамет быков-производителей при низких и ультранизких температурах.— В кн.: Тез. докл. II съезда физиологов Молд. ССР. Кишинев, 1981, с. 129—130.
2. Куроедов А. П. Свободные аминокислоты и качество спермы быков-производителей.— М.: Изд. Ун-та дружбы народов им. П. Лумумбы, 1966, т. 14, с. 246—255.
3. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных.— М.: Сельхозиздат, 1962.—696 с.
4. Милованов В. К., Варнавский А. Н., Наук В. А. О природе криогенных повреждений живчиков барана.— В кн.: Технология искусственного осеменения и биология воспроизведения сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1972, с. 157—158.
5. Шергин Н. П. Биохимия сперматозондов сельскохозяйственных животных.— М.: Колос, 1967.—238 с.
6. Шустовская М. Д. Аминокислотный состав спермиев молодых быков.— В кн.: Пути ускорения реализации Продовольственной программы. Днепропетровск: Облполиграфиздат, 1984, с. 63—65.
7. Ibrahim M. A. R., Boldizar H.— Studies on free amino acid content in seminal plasma of i.a. bulls of different performance.— Acta veterinaria academiae scientiarum Hungaricae, t. 29 (3), p. 263—269.

Получена редколлегией 29.11.84.

УДК 636.082.4.53

ВЛИЯНИЕ СБАЛАНСИРОВАННОГО СОЛЕВОГО РАСТВОРА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМИЕВ БЫКА¹

В. В. СЛУЖАВАЯ, асп.
УСХА

В селекции крупного рогатого скота одним из важных вопросов является интенсификация воспроизводства животных. Среди разрабатываемых подходов (транслокация зигот, клонирование) наиболее перспективным представляется оплодотворение *in vitro* культивируемых ооцитов убойных коров, что позволит получить большое количество потомков от выдающихся по продуктивности особей (Эрнст Л. К. и др., 1983; Недава В. Е. и др., 1983; Thibault С., 1970).

В этой проблеме большой интерес представляет моделирование процессов

капацитации и акросомной реакции спермиев, которые в естественных условиях происходят по мере их продвижения в половых путях самки. Имеющиеся данные свидетельствуют, что только после таких преобразований акросомы спермиев приобретают способность к оплодотворению (Austin С. R. 1951; Chang М. М. С., 1951, Iritani А., Niwa К., 1978, и др.).

Капацитацию спермиев *in vitro* моделируют путем их инкубации в солевых растворах. Однако еще не ясны механизмы капацитации и акросомной реакции. Предложено большое количе-

¹ Научный руководитель — доктор биологических наук И. В. Смирнов

ство различных растворов без полного определения особенностей их воздействия на спермию, отрицается и сама необходимость предварительной обработки спермы.

Целью наших исследований было изучить влияние одной из принятых для капацитации среды — солевого раствора Бринстера — на физиологические и цитоморфологические характеристики нативных и размороженных спермиев быка.

Методика исследований. Для исследований, проведенных в 1983—1984 гг., использовали нативную сперму быков-производителей Киевского облплемобъединения и размороженную из спермотеки УкрНИИ разведения и искусственного осеменения крупного рогатого скота. В работе использовали нативную сперму с подвижностью не ниже 7 баллов после доставки и размороженную с подвижностью не ниже 3 баллов.

С целью индуктирования процесса капацитации сперму обрабатывали средой Бринстера, которая имеет следующий состав, г/л: NaCl — 5,546; KCl — 0,356, KH_2PO_4 — 0,294; Са-лактат — 1,71; Na-лактат — 2,253; Na-пируват — 0,028; NaHCO_3 — 2,106, глюкоза — 1; БСА — 1; пенициллин 100 ед./мл; стрептомицин — 0,05. В опытах аликвоту семени 0,5 мл разбавляли средой 1:10, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость собирали, осадок ресуспендировали той же средой.

Капли суспензии спермиев инкубировали в пластиковых бактериальных чашках под слоем вазелинового масла в течение двух часов при 37 °С в атмосфере с 5 % CO_2 и при 100%-ной влажности. После каждого этапа обработки определяли подвижность и количество жизнеспособных спермиев по общепринятым методикам и готовили мазки для цитологических исследований. Фиксировали метанол-уксусной кислотой (3:1), окрашивали азотнокислым серебром в соотношении 1:1 с муравьиной кислотой при 45 °С и докрашивали 1 %-ным раствором прочного зеленого. Морфологические характеристики спермы изучали под микроскопом МБИ-15 под малой иммерсией. Цифровой материал обрабатывали статистическими методами (Меркурьева Е. К., 1964).

Результаты исследований. Как видно из представленных в таблице 1 данных, после инкубации в среде Бринстера в течение двух часов подвижность спермиев снижалась в 2—3 раза. Особенно выражено отрицательное действие сре-

1. Влияние раствора Бринстера на подвижность и количество живых спермиев быка

Показатель	Подвижность, баллы	Количество живых спермиев, %
Контроль	$3,07 \pm 0,08$	$30,84 \pm 1,50$
	$7,44 \pm 0,16$	$67,71 \pm 0,91$
После центрифугирования	$2,37 \pm 0,01$	$19,86 \pm 1,66$
	$5,42 \pm 0,12$	$50,39 \pm 0,76$
После преинкубирования	$1,27 \pm 0,14$	$6,64 \pm 0,19$
	$2,22 \pm 0,04$	$20,26 \pm 0,80$
F _{сф}	37,05	36,4
	78,48	133,97
F _т	8,8	8,3
	9,3	9,5
P	<0,001	<0,001
	<0,001	<0,001

Примечание. Числитель — размороженные сперми, знаменатель — нативные.

ды на свежееоттаянную сперму, подвижность которой снизилась до $1,27 \pm 0,08$ балла. Подвижность нативной спермы остается после инкубации более высокой ($2,22 \pm 0,04$ балла), однако это связано, по-видимому, с более высокой подвижностью исходного материала ($7,44 \pm 0,16$). Аналогичное влияние раствор Бринстера оказывает на жизнеспособность спермиев (после инкубации количество неокрашенных эозином спермиев снижалось в 3—5 раз). Особенно увеличивалось количество мертвых спермиев после обработки свежееоттаянной спермы (живыми оставалось лишь $6,6 \pm 1,19$ % клеток).

При воздействии среды Бринстера мы также наблюдали описанное ранее (Bedford, 1983) при обработке другими растворами кратковременное повышение подвижности спермиев. Оно наступает сразу после внесения спермиев в среду и имеет вид своеобразной гиперактивности, выражающейся в резких частых биениях хвоста. Такое явление длится около 1 мин и сменяется обычным характерным поступательным движением.

При помощи светового микроскопа нельзя изучить тонкие изменения морфологии акросомы спермиев. В связи с этим все сперми по состоянию акросомы делили на три группы: не имеющие

2. Цитоморфологическая характеристика нативной и размороженной спермы после обработки раствором Бринстера

Состояние акросомы	Контроль	После отмывки с центрифугированием	После приинкубирования	F _φ	F _m	P
<i>Нативные спермии (n=14)</i>						
Интактна	88,7±1,37	59,9±3,04	58,0±6,07	10,5	7,0	<0,001
Изменена	9,48±4,1	36,7±2,05	41,5±4,24	17,2	7,0	<0,001
Без акросомы	3,0±0,91	6,4±1,99	7,0±2,1	9,77	7,0	<0,001
<i>Размороженные спермии (n=15)</i>						
Интактна	66,44±1,10	31,11±9,1	8,11±11,53	43,4	9,3	<0,001
Изменена	34,89±3,18	62,78±4,36	67,44±5,46	19,5	9,3	<0,001
Без акросомы	3,08±0,29	2,33±1,71	11,44±2,28	14,3	8,5	<0,001
Другие нарушения головки спермиев	8,56±0,95	10,0±1,86	11,1±1,92	0,67	3,4	>0,05

видимых под световым микроскопом изменений акросомы; имеющие измененную акросому — набухшую, с различными видами повреждений; спермии без акросомы.

Отдельно учитывали спермии, имеющие дефекты и повреждения других компонентов.

Исследования показали, что после инкубации в растворе Бринстера снижается количество спермиев с нормальной, неизменной акросомой и значительно возрастает число клеток с изменениями морфологических характеристик акросомы (табл. 2). В основном — это набухание акросомы и нарушение ее целостности, менее выражено увеличение количества спермиев, лишенных акросомы. Нарушений других структурных компонентов спермиев раствор Бринстера не вызывает — изменение количества таких спермиев в опыте статистически недостоверно ($P > 0,05$).

Очень изменяются акросомы свежеразмороженных спермиев — после инкубации в растворе Бринстера количество спермиев с измененной акросомой возрастает в 2,5 раза, интактная акро-

сома остается только у $8,1 \pm 1,53$ % клеток.

В то же время после обработки средой Бринстера нативной спермы с интактной акросомой остается $58 \pm 6,07$ % спермиев. Однако это, как правило, связано с более высоким количеством спермиев с нормальной акросомой до обработки, поскольку число клеток с измененной акросомой после инкубации нативной спермы в растворе Бринстера возрастает более чем в 4 раза. Изменения выражены в набухании акросомы.

Выводы. Солевой раствор Бринстера отрицательно влияет на функциональное состояние и жизнеспособность спермиев быка, что, естественно, снижает их оплодотворяющую способность в системе *in vitro*. Изменения акросомы, по-видимому, имеют различный генезис. Одни из них, крайним вариантом которых является полная утеря акросомы, свидетельствуют о повреждающем действии раствора, другие, в частности набухание акросомы, могут быть проявлением начальных этапов процессов капацитации и акросомальной реакции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меркурьева В. К. Биометрия в животноводстве.— М.: Колос, 1964—312 с.
2. Недава В. Є., Буркат В. П., Михайленко А. В. та ін. Культивування і запліднення *in vitro* ооцитів великої рогатої худоби.— Вісн. с.-г. науки, 1984, № 5, с. 61—64.
3. Эрст Л. К., Голубев А. К., Макарова З. Н. и др. Получение потомства из дозревшей и оплодотворенной *in vitro* яйцеклетки коровы.— Вестн. с.-х. науки, 1983, № 7, с. 77—85.
4. Austin C. R. Observation of the penetration of sperm into the mammalian egg.— Aust. J. Res., 1951, В 4, p. 581—596.
5. Bedford Y. M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals.— Biol. Reprod, 1983, v 28, N 1, p. 117—120.

6. Chang M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes.— Nature (Lond.), 1951, 168, p. 697—698.

7. Iritani A., Niwa K., Imai H. Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture.— J. Reprod Fertib, 1978, v 54, N 2, p. 379—383.

8. Thibault C. Normal and abnormal fertilization in mammals.— Adv. in Biosci 6 Schering Sumpos. on Intrin extrinfact in early mammal. Develop. Viewg.— Rergamon Press, 1970, p. 63—79.

Получена редколлегией 29.11.84.

УДК 636.2.082

О РЕЖИМАХ ОХЛАЖДЕНИЯ СПЕРМЫ БЫКОВ ПЕРЕД ЗАМОРАЖИВАНИЕМ

А. П. КРУГЛЯК, канд. биол. наук

УкрНИИ разведения и искусств. осеменения круп. рогатого скота

Разработанная С. Полджем и Л. Е. А. Раусоном (1952) методика эквипирации спермы при температуре 2—5 °С в течение 18—24 ч претерпевает большие изменения. Е. М. Платов (1963), используя гипертонические среды, сократил период охлаждения и выдержки спермы при 2—5 °С до 6 ч. Г. Нагазе и Т. Нива (1964), замораживая сперму в гранулах, установили, что подвижность и оплодотворяющая способность клеток выше при выдержке разбавленной спермы при 2—5 °С в течение 4—6 ч. Исследованиями Ф. И. Осташко (1968) отмечено, что величина эквипирационного периода зависит от температуры внесения глицерина, осмотического давления и химического состава разбавителя, концентрации глицерина и желтка.

В последнее время целесообразность эквипирации ставится под сомнение. Так, Р. Бертсон и Р. Фут (1972), применяя медленное охлаждение разбавленной спермы безглицериновой средой, сократили период эквипирации до 1 мин, а Р. Жонде (1979) — до 10 с. Оплодотворяемость коров при этом выше на 2,2 %. В. А. Наук и В. Г. Деллеу (1983) при очень медленном охлаждении спермы до 5 °С получили самые высокие показатели подвижности, выживаемости, сохранности акросом и оплодотворяющей способности спермиев при продолжительности эквипирации 25—30 мин.

Целью наших исследований было выявить оптимальный режим охлаждения спермы перед замораживанием ее в форме открытых гранул.

Методика исследований. Исследования проводили на Киевском и Перея-

слав-Хмельницком племпредприятиях в 1983—1984 гг. Использовали 19 эякулятов спермы от семи быков голштинской породы и четыре — от помесей 1/2 КППФ+1/2 С. Взятие и оценку спермы проводили по общепринятым методам.

Эякуляты разбавляли ЛГЖ-средой в степени 1:6—1:7 из расчета 15 млн. активных спермиев в дозе после оттаивания. Каждый разбавленный эякулят делили на четыре части и переносили в следующие температурные условия: I вариант (контроль) — разбавленную при 30 °С сперму выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин, после чего переносили в холодильник при 4 °С; II вариант — после разбавления сперму медленно охлаждали (0,3 °С/мин) до 14—16 °С и сохраняли при этой температуре; III вариант — разбавленную сперму сохраняли при комнатной температуре (22—24 °С); IV вариант — разбавленную сперму сохраняли в термостате при 30 °С.

Пробы спермы замораживали после 0,5-, 1-, 2- и 4-часовой выдержки при указанных температурах. Кроме общепринятых показателей, определяли устойчивость спермиев к холодному шоку (ГОСТ 20909.4—75) и скорость редукции метиленового синего.

Результаты исследований. Сперма, выдержанная при 30 °С, очень плохо переносила глубокое замораживание. Инкубирование разбавленной спермы при комнатной температуре также не обеспечивало достаточного восстановления подвижности спермиев после оттаивания. При медленном охлаждении разбавленной спермы и последующей вы-