ПРО ВВЕДЕННЯ ГЛІЦЕРИНУ В СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ШВИДКОГО ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ

Ф. І. ОСТАШКО, доктор біологічних наук

Г. С. ШАРАПА, кандидат біологічних наук

О. П. ЗВЄРЄВА, молодший науковий співробітник

Науково-дослідний інститут тваринництва Лісостепу і Полісся УРСР

Гліцеринізація — один з важливих і відповідальних етапів у технології заморожування сперми бугаїв-плідників. Відомо, що одноразове швидке розведення сперми бугаїв-плідників середовищем з гліцерином призводить до порушення структури спермієв або навіть до загибелі внаслідок осмотичного шоку (Н. К. Кольцов, 1936; Є. М. Платов, 1960; І. В. Смирнов, 1963; Ф. І. Осташко, О. Д. Бугров, 1966 та інші). Тому в перших методиках заморожування сперми бугаїв-плідників при введенні 10—15% гліцерину в складі ізотонічного середовища останній вносився в сперму шляхом підшаровування при температурі 2—5° і при цьому було необхідне тривале (18—24 години) еквілібрування.

Після досконального вивчення осмотичних якостей гліцерину і його впливу на спермії бугаїв-плідників (В. А. Морозов, 1957; Є. М. Платов, 1963; Ф. І. Осташко, О. Д. Бугров, 1963 та інші) стало можливим одноразове розведення сперми навіть при кімнатній температурі гіпертонічними гліцериновими середовищами. Після розробки методики заморожування сперми в гранулах (Ніва, Нагазе, 1964) з меншою кількістю гліцерину його почали вводити при температурі 32—35° з деякими застереженнями (краплинами, невеликими дозами, в кілька етапів і т. д.). Проте більшість дослідників вважає, що введення гліцерину при неактивному стані клітин є для них більш сприятливим (О. Д. Бугров, 1965; С. Полдж, 1953; Х. О. Данн і Хафс, 1953; В. Міллер, Ван Демарк, 1954).

До цього часу залишається не зовсім ясним і дискусійним питання локалізації гліцерину. Більшість вчених вважає, що гліцерин проникає в спермії бугаїв-плідників. На думку інших (Т. П. Ільїнська, А. С. Яцун, 1969), гліцерин в клітину не потрапляє, а його захисна дія проявляється при взаємодії з середовищем. Проте питання проникнення гліцерину в спермії бугаїв-плідників має принципове значення. Вирішення його дасть можливість вияснити, хоча б частково, місце і механізм дії гліцерину, роль таких важливих технологічних процесів, як адаптування і еквілібрування сперми, що, в свою чергу, дасть змогу встановити тривалість витримування сперми перед заморожуванням, час введення гліцерину та інше. Вияснення частини цих питань було завданням проведеного нами дослідження.

Методика досліджень. У дослідженнях ми застосовували перше розведення сперми при температурі 32—35° лактозо-жовтковим середо-

вищем з осмотичним тиском 7,0—7,5 атмосфери, а потім — середовищем з гліцерином. Метою початкових досліджень було вияснити, чи проникає гліцерин у спермії бугаїв-плідників, швидкість його проникнення, вплив тривалості витримування сперми в середовищі з гліцерином на якість її після розморожування.

Про проникнення гліцерину в спермії та його інтенсивність судили за зміною загального об'єму клітин, який визначали показниками гематокриту в різні інтервали після внесення досліджуваних середовищ у суспензію клітин. Свіжоодержану сперму бугаїв-плідників після першого розведення лактозо-жовтковим середовищем ділили на дві частини. Одну охолоджували до температури 2—4°, а друга залишалась при кімнатній температурі (25—26°). Через дві години при цих же температурах проводили повторне розбавлення 1 : 1. Частину сперми розбавляли лактозо-жовтковим розріджувачем (осмотичний тиск близько 9 атмосфер), а другу частину — лактозо-жовтковим розріджувачем з 7% гліцерину. Відразу ж після розведення наповняли капіляри гематокриту добре перемішаною досліджуваною сумішшю і центрифугували при 3000 *об/хв* протягом 10 *хв* на центрифузі ЦУМ-1 (фактор розділення був близько 2000 *g*). Наступні вимірювання об'ємів спермій проводили через 15, 30, 45 і 60 *хв* після розбавлення. Показники гематокриту відраховували через лупу на чорному фоні. Дослід проводили на розділених еякулятах трьох бугаїв в шести повторностях (всього на 18 зразках).

Вивчення проникнення гліцерину в спермії бугаїв-плідників при температурі 2—5° проводили паралельно на спермі тих же бугаїв-плідників таким же методом, але в умовах холодильника.

Розміри спермія змінюються під впливом осмотичних сил. Введення в середовище, що оточує спермії, додаткової речовини призводить до переміщення води із клітини для зрівноваження концентрацій зовні і всередині клітин. Клітина при цьому зменшується в об'ємі.

Якщо речовина проникає в клітину, то в міру зрівноваження концентрацій її в навколишньому середовищі і в клітині остання набуває певного сталого об'єму.

Метою дальших досліджень було вивчити вплив тривалості витримування сперми в середовищі з гліцерином на якість її після заморожування в гранулах, тобто з'ясувати роль процесу еквілібрування сперми з гліцерином. Для цього розбавлену сперму ділили на три частини. До першої додавали середовище з гліцерином при кімнатній температурі через 15—20 хвилин після першого розведення, до другої — за 2 години до заморожування при температурі 2—5°, а до третьої — за 15 *хв* до заморожування. Сперма витримувалася при зниженій температурі 6 годин. Заморожування проводили гранулами по 0,1—0,2 *мл* на фторопластовій пластині, охолодженій рідким азотом. Заморожену сперму розморожували через 24—48 годин в 3-процентному цитраті натрію з температурою 40° (по 2 гранули на 1 *мл* розчину). Оцінювали розморожену сперму за активністю, переживаністю при температурі 38° і запліднювальною здатністю її після першого осіменіння.

Для більш детального вияснення значення адаптації і еквілібрування сперми в збереженні її життєздатності після заморожування було проведено окремий дослід. Свіжоодержану сперму 10 бугаїв-плідників після розбавлення ділили на дві частини. Другу частину розводили середовищем з гліцерином через 15—20 хвилин, і обидві частини охолоджували. У зразки першої частини сперми середовище з гліцерином вводили за 0,5 години до заморожування. Морозили обидві частини одночасно через 1; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5 години після початку охолодження. Отже, в першому випадку змінювалась тривалість витримування сперми при зниженій температурі (адаптація), період еквілібрування залишався постійним. У другому випадку змінювалася тривалість витримування з гліцерином. Тести оцінки сперми були ті ж самі.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті проведеного досліду встановлено, що відразу після розведення сперми лактозо-жовтковим середовищем і тим же середовищем, але з 7% гліцерину, загальний розмір сперміїв був неоднаковий (табл. 1). При температурі 25—26° показники гематокриту були відповідно 4,5 і 3,7 поділок, тобто одна і та ж кількість сперміїв у середовищі з 3,5% гліцерину мала менший загальний об'єм, ніж в тому ж середовищі, але без гліцерину, і становила приблизно 80% об'єму сперміїв у безгліцериновому середовищі. Повторне вимірювання загального об'єму маси клітин через 15 *хв* після розбавлення показало деяке збільшення розмірів клітин (4,7 і 4,6 поділок відповідно середовищам), через 30 хвилин — 4,8 і 4,8, а далі залишались на одному рівні (4,8). Отже, в перший період після розбавлення сперми досліджуваними середовищами спостерігається зменшення об'єму клітин внаслідок виходу води з неї в оточуюче середовище. Потім у процесі зрівноваження концентрації гліцерину в навколишньому середовищі і в клітині відбувається збільшення розмірів її до певного, мабуть, оптимального для життя клітини рівня. Введення в сперму лактозо-жовткового середовища також призводить

1. Динаміка змінювання об'єму сперміїв при розведенні їх лактозо-жовтково-гліцериновим і лактозо-жовтковими середовищами, *поділки гематокриту*

Середовища	Після розбавлення сперми бугаїв-плідників				
	відразу	через 15 *хв*	через 30 *хв*	через 45 *хв*	через 60 *хв*
	При температурі 25—26°				
Лактозо-жовткове	4,5±0,5	4,7±0,5	4,8±0,5	4,8±0,5	4,9±0,6
Лактозо-жовтково-гліцеринове	3,7±0,5	4,6±0,6	4,8±0,2	4,8±0,3	4,9±0,2
	При температурі 2—5°				
Лактозо-жовткове	5,4±1,3	5,5±1,2	5,6±1,3	5,6±1,2	5,7±1,2
Лактозо-жовтково-гліцеринове	4,4±1,2	5,5±1,2	5,6±1,3	5,9±1,4	5,9±1,3

до певної гіпертонії сперміїв. У присутності гліцерину гіпертонія збільшується.

При температурі 2—4° спостерігається аналогічний характер змінювання об'єму клітин. При цьому відмічено дещо більший загальний розмір порівняно з визначеним при 25—26°. Мабуть, це можна пояснити тим, що при зниженій температурі спермії перебувають в неактивному стані, внаслідок чого знижується контроль його мембранної системи, збільшується її проникненість, і клітина наче набрякає. У середовищах з гліцерином набрякання клітин при їх зберіганні (в межах досліджуваного часу) було більш вираженим.

Така картина зміни об'єму сперміїв після розведення їх середовищем з гліцерином дає змогу говорити про те, що гліцерин проникає в спермій. До того ж проникнення його відбувається досить швидко. Для остаточного зрівноваження концентрації гліцерину між лактозо-жовтково-гліцериновим (3,5%) середовищем і спермією бугаїв-плідників у наших дослідах було достатньо 15—20 *хв* як при 25°, так і при 2—4°. А тому ми не можемо погодитися з висновками Т. П. Ільїнської та А. С. Яцун про те, що гліцерин не проникає в спермії.

У подібних дослідженнях Дж. Хендерсон (1965), Бікіс та ін. (1967) встановили, що при внесенні 10% гліцерину розмір сперміїв зменшувався на 50—60% їх початкового об'єму, а зрівноваження відбувалося при температурі 22° 60 *хв*, а при температурі 4° — ще довше.

У наших дослідах таке зменшення розміру клітин було в межах 20% при наявності в середовищі 3,5% гліцерину.

Бернстон і Фут (1972) спостерігали лише незначні зміни об'ємів клітин при введенні в сперму 7% гліцерину в складі жовтково-цитратного та жовтково-трисового розріджувача. Вони дійшли висновку, що гліцерин у спермії бугаїв проникає дуже швидко — протягом 5—7 *хв*. Така невідповідність в одержаних результатах пояснюється, мабуть, використанням у дослідах різних дослідників неоднакових середовищ, різної кількості гліцерину тощо. Результати наших дослідів погоджуються з даними О. Д. Бугрова (1965), Бернстона і Фута (1972) та інших щодо швидкості проникнення в спермії гліцерину.

Якщо гліцерин проникає в спермії бугаїв швидко, то чи обов'язкове тривале перебування сперми в середовищі з гліцерином? Це припущення було перевірене в досліді. Середовище з гліцерином вносили в розбавлену і охолоджену сперму за 6, 2 *год* і 15 *хв* до заморожування (табл. 2). Сперма всіх трьох зразків була майже однакової якості незалежно від того, який час вона перебувала в середовищі з гліцерином. Спостерігали навіть деяке поліпшення якості сперми при скороченні тривалості еквілібрування.

У травні — червні 1972 р. заморожену таким способом сперму використали для осіменіння корів і телиць у трьох господарствах Київської області. Дані осіменіння показані в таблиці 3. Заплідненими вважали корів, що не приходили повторно в охоту через 120—150 днів після осіменіння. Різниця в заплідненості корів і телиць після першого осіменіння була невірогідною ($P>0,05$).

Отже, тривалість витримування сперми в середовищі з гліцерином (еквілібрування) при швидкому заморожуванні її гранулами не має істотного впливу на якість її після відтавання. Сперма бугаїв-плідників, заморожена після 6-годинного витримування при зниженій температурі і 15-хвилинного перебування в середовищі з гліцерином, не втрачала запліднювальної здатності.

2. Залежність якості відталої сперми від часу витримування її в середовищі з гліцерином (дані по 21 розділеному еякуляту), $M \pm m$

Тривалість перебування сперми в середовищі з гліцерином	Активність, *бали*	Переживаність при 38°С, години	Абсолютний показник переживаності
6 годин	0,45±0,01	9,1±0,6	2,54±0,33
2 години	0,45±0,01	9,6±0,6	2,85±0,27
15 хвилин	0,46±0,01	10,2±0,6	3,15±1,29

В іншому досліді було поставлене завдання порівняти вплив часу адаптування і еквілібрування сперми бугаїв на якість її після заморожування в гранулах. Питанню ролі адаптування і еквілібрування при розробці методу заморожування сперми в ампулах було присвячено багато робіт, дані яких досить суперечливі. Проте на думку більшості дослідників для успішного заморожування сперми бугаїв-плідників необхідним є як тривалість витримування її при зниженій температурі, так і тривалість еквілібрування з гліцерином, при цьому останньому відводилось більш значне місце. З цим можна повністю погодитись, тому що середовище з 15% гліцерину вносилось при зниженій температурі шляхом підшаровування. Для поширення гліцерину по всьому об'єму рідини і для проникнення його в спермії необхідний і більш тривалий час. При розробці методу заморожування сперми в гранулах це питання в такій постановці не вивчалось. Було встановлено, що сперма, розведена середовищем з гліцерином, повинна бути витримана при зниженій температурі в межах 5—6 годин: за даними Ніва і Нагазе (1964), оптимум еквілібрування сперми з гліцерином був між 5 і 10 *год*, за В. Ф. Турбіним (1967) — 5—6 *год*, за Г. Фроріпом (1968) — 5—7 *год.*, за Т. Ф. Ефендієвою та ін. (1971) — 6—8 *год*.

3. Результати осіменіння корів спермою, замороженою після різного витримування в середовищі з гліцерином

Господарства	Тривалість перебування сперми в середовищі з гліцерином								
	6 годин			2 години			15 хвилин		
	осіменено *голів*	запліднилось	% запліднення	осіменено *голів*	запліднилось	% запліднення	осіменено *голів*	запліднилось	% запліднення
Колгосп ім. Жданова відділок «Ударник»	75	49	65,3±5,2	72	37	51,4±5,8	54	40	74,1±5,9
Центральний відділок	82	49	59,7±5,4	80	56	70,0±5,1	98	62	63,2±4,8
Колгосп ім. Леніна	161	119	74,0±3,5	75	61	81,3±4,5	115	76	66,1±4,4
Всього	318	213	67,0±2,6	227	154	67,8±3,1	267	178	66,6±2,9

У наших дослідах одна частина розділеного еякуляту була розведена середовищем з гліцерином перед охолодженням, а зразки другої частини піддавались гліцеринізації протягом 0,5 *год* безпосередньо перед заморожуванням. Обидві частини сперми морозили через однакові проміжки часу.

Результати досліду показані в таблиці 4.

4. Вплив тривалості адаптації і еквілібрування на якість сперми після заморожування її в гранулах, $M \pm m$ (середнє по 12 розділеним еякулятам)

Тривалість витримування сперми перед заморожуванням, *години*	У тому числі		Активність, *бали*	Переживаність при 38°, *години*	Абсолютний показник переживаності
	тривалість адаптації	тривалість еквілібрування			
			I частина досліду		
1,0	0,5	0,5	0,34±0,03	9,5±0,6	1,69±0,22
1,5	1,0	0,5	0,35±0,02	9,9±0,4	1,95±0,25
2,5	2,0	0,5	0,39±0,02	9,9±0,4	2,18±0,25
3,5	3,0	0,5	0,40±0,01	10,5±0,6	2,56±0,22
4,5	4,0	0,5	0,40±0,01	10,6±0,6	2,79±0,25
5,5	5,0	0,5	0,41±0,01	10,3±0,4	2,71±0,22
			II частина досліду		
1,0		1,0	0,34±0,02	9,7±0,4	1,74±0,25
1,5		1,5	0,35±0,02	9,6±0,4	1,73±0,22
2,5		2,5	0,39±0,01	10,2±0,5	2,16±0,25
3,5		3,5	0,41±0,01	10,6±0,6	2,48±0,22
4,5		4,5	0,41±0,01	10,8±0,6	2,73±0,25
5,5		5,5	0,41±0,01	10,6±0,6	2,73±0,25

Незалежно від тривалості перебування сперми в середовищі з гліцерином якість її після відтавання поліпшувалась в міру збільшення тривалості витримування її при зниженій температурі. Найвищі якісні показники мала сперма, заморожена після 4,5—5,5 *год* охолодження. Вірогідне зниження активності ($P<0,01—0,05$) і абсолютного показника переживаності при 38° ($P<0,05—0,01$) спостерігали в тому випадку, коли тривалість перебування її при зниженій температурі була в межах 1—1,5 *год*, а при 2,5—3,5-годинному витримуванні різниця була невірогідною ($P>0,05$).

Отже, мембрана спермій бугаїв проникliва для гліцерину. Для зрівноваження концентрації гліцерину між лактозо-жовтково-гліцериновим (3,5%) середовищем і спермією бугаїв досить 15—20 *хв*. Скорочення часу витримування сперми з гліцерином не впливає негативно на якість її після відтавання. Отже, вносити середовище з гліцерином у сперму бугаїв можна безпосередньо перед заморожуванням. При цьому помічено навіть деяке поліпшення переживаності сперми при 38° після її відтавання.

При швидкому заморожуванні сперми бугаїв у гранулах час адаптування має значно більше значення, ніж період гліцеринізації. Сперму перед заморожуванням необхідно витримати при зниженій температурі не менше 3,5—4 *год.*

ЛІТЕРАТУРА

Бугров О. Д. Вплив осмотичного тиску на сім'я плідників при його глибокому заморожуванні.— У зб.: Розведення і утримання сільськогосподарських тварин, вип. 5. К., «Урожай», 1965.

Кольцов Н. К. Организация клетки. М.—Л., 1936.

Морозов В. А. Сохранение семени баранов в замороженном состоянии.— «Овцеводство», 1957, № 10.

Осташко Ф. І., Бугров О. Д. Про глибоке заморожування сперми бугаїв-плідників.— «Вісник сільськогосподарської науки», 1966, № 4.

Платов Е. М. Осмотическое действие глицерина на живчиков быка.— «Вестник сельскохозяйственной науки», 1960, № 11.

Платов Е. М. Исследования о действии глицерина при разбавлении и замораживании семени сельскохозяйственных животных. Автореферат диссертации. М., 1963.

Смирнов И. В. Влияние глицерина и гипертонических растворов на переживаемость спермиев быков-производителей.— В сб.: Научные труды Киевской опытной станции животноводства, т. 9, 1963.

Турбин В. Ф. Быстрый метод замораживания семени быков в ампулах и полистироловых пипетках.— В кн.: Материалы конференции молодых ученых ВИЖа. Дубровицы, 1967.

Фрорип Г. Сперма в каплях-драже на сухом льду.— «Молочное и мясное скотоводство», 1968, № 9.

Эфендиева Т. Ф., Кириллов А. С., Дупенко О. А. Опыт внедрения замораживания семени быков.— «Животноводство», 1971, № 9.

Яцун А. С., Ильинская Т. П. О проницаемости глицерина через оболочку спермиев.— В сб.: Актуальные вопросы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных. Минск, «Урожай», 1969.

ДІЯ ОСМОТИЧНИХ ФАКТОРІВ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ СПЕРМИ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ У СЕРЕДОВИЩАХ З ГЛІЦЕРИНОМ[1]

В. М. КУШНІР, аспірант

Українська ордена Трудового Червоного прапора сільськогосподарська академія

Багато дослідників у своїх роботах вказують на важливість враховування осмотичних факторів при розбавленні і глибокому заморожуванні сперми (В. К. Мілованов, 1933; В. А. Морозов, 1959; Є. М. Платов, 1960; І. В. Смирнов, 1962, 1963, 1964, 1971; Ф. І. Осташко, 1963; О. Д. Бугров, 1965; Г. Г. Козлов, 1971 та ін.). Однак теоретичне обґрунтування цього питання розроблено ще недостатньо. Це гальмує вдосконалення техніки глибокого заморожування. При заморожуванні сперми обов'язковим компонентом середовища є гліцерин, осмотичні

[1] Науковий керівник — професор І. В. Смирнов.