

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<sup>1</sup>

В. М. КУШНІР, аспірант

Українська орденна Трудового Червоного прапора  
сільськогосподарська академія

Багато дослідників у своїх роботах вказують на важливість врахування 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

<sup>1</sup> Науковий керівник — професор І. В. Смирнов.

### 1. Зв'язок між активністю і переживаністю спермій та осмотичним тиском у розбавленні

Кратність розбавлення	Осмотичний тиск розбавленої сперми, атм	Активність спермій, бали		
		після розбавлення сперми	після еквілібрування	після відтавання
2	15,07±0,33	7,64±0,15	6,82±0,16	3,07±0,10***
4	19,17±0,45	7,75±0,15	7,11±0,17	4,07±0,15
8	21,22±0,38	7,75±0,15	7,11±0,17	4,25±0,11
12	21,70±0,48	7,64±0,15	6,96±0,15	3,68±0,16**
16	22,18±0,45	7,39±0,17	6,61±0,20	3,32±0,17***
32	22,66±0,42	6,89±0,18**	6,25±0,18**	2,86±0,20***

Примітки. Активність спермій у свіжоодержаній спермі ( $M \pm m$ ) — 8,14±0,13;

властивості якого вивчені теж недостатньо. Деякі дослідники (В. А. Мілованов та ін.) вважають, що гліцерин знижує ступінь дисоціації солей, внаслідок цього середовище стає гіпотонічним. Є. М. Платов (1960) запропонував рецепт компенсованого середовища для одномоментного розбавлення сперми бугая перед заморожуванням. Проте роботи цього дослідника ще не повністю розкривають механізм осмотичної дії гліцерину, яка значно відрізняється від дії на спермії розчинів солей і цукрів. В останніх чітко вираховується «осмотичний оптимум» (тобто ізоосмотична концентрація розчинених речовин) для спермій усіх видів тварин. У водних розчинах гліцерину такого оптимуму немає, хоча кріоскопічним методом можна легко встановити наявність осмотичного тиску, пропорціонального концентрації гліцерину. Так, в одному нашому досліді осмотичний тиск в 2,5-процентному розчині гліцерину в дистильованій воді дорівнював 8,59 атм, а в 5-процентному 17,18 атм. Проте при розбавленні сперми бугая цими розчинами ми одержали однаковий результат — активність спермій швидко знижувалась. За даними Є. М. Платова, осмотична дія гліцерину на спермії кроля зовсім інша. У водно-жовтково-гліцеринових розчинах спермії кроля зберігали рухливість протягом тривалого часу (до 6 годин). Цей факт автор пояснив тим, що гліцерин тимчасово зрівноважує осмотичний тиск всередині спермій. Поступове проникнення гліцерину в клітини порушує осмотичну рівновагу і призводить їх до загибелі від гіпотонії. Якщо на початку припинення рухливості (через 4 години після розбавлення) у сперму додати глюкозо-цитратний розчин двократної гіпертонії, тривалість зберігання спермій значно збільшується. Є. М. Платов вважає, що ці явища пояснюються швидкою проникністю гліцерину крізь оболонку спермій бугая, тоді як через оболонку спермії кроля гліцерин проникає дуже повільно. Проте гіпотеза Є. М. Платова має слабкі місця. Важко пояснити факт, що осмотична дія розчинів гліцерину різної концентрації (3,5 і 10%) однакова. І, нарешті, припущення Є. М. Платова про те, що гліцерин знижує дисоціацію со-

спермі (заморожування в ампулах),  $M \pm m$ 

Переживаність спермів при 38—40°, години		Абсолютний показник живучості спермів	
після розбавлення сперми	після відтавання	після розбавлення сперми	після відтавання
9,6±0,33*	5,2±0,32***	38,86±2,27	7,96±0,79***
10,5±0,29	6,5±0,23	42,20±3,39	13,39±1,14**
10,6±0,27	6,7±0,22	43,27±2,40	13,91±1,19
9,6±0,32*	5,8±0,21**	36,46±1,80*	10,18±0,62**
8,7±0,26***	5,1±0,27***	33,09±1,63**	8,30±0,78***
8,1±0,34***	4,3±0,35***	26,73±1,43***	6,03±0,86***

осмотичний тиск — 6,76±0,14 атм. \* —  $P > 0,95$ ; \*\* —  $P > 0,99$ ; \*\*\* —  $P > 0,999$  по відношенню до показників активності і переживаності спермів при розбавленні в 8 разів.

лей, не підтвердилось проведеними нами кріоскопічними дослідженнями. В одному з них осмотичний тиск 0,9-процентного розчину хлористого натрію дорівнював 6,751 атм, а осмотичний тиск у 2,5-процентному розчині гліцерину — 8,620 атм. В той же час водний розчин, в якому містилось 0,9% хлористого натрію і 2,5% гліцерину, мав осмотичний тиск 15,31 атм, тобто фактично дорівнював сумарному осмотичному тиску обох компонентів.

На думку Є. М. Платова та інших, успішне заморожування сперми при одномоментному її розбавленні можливе тільки при певному співвідношенні між гліцерином та іншими осмотично-активними речовинами середовища. Це співвідношення залежить не тільки від складу середовища, але й від ступеня розбавлення сперми, оскільки остання містить розчинні цукри і солі. На практиці ця обставина, як правило, не враховується: ступінь розбавлення сперми коливається в широких межах від 1:1 до 1:20 залежно від концентрації спермів та методу заморожування.

Метою проведеного нами дослідження було вивчити вплив осмотичного тиску у розбавленій спермі бугаїв на активність, переживаність спермів до і після заморожування в ампулах і у вигляді гранул. Досліди проводили у 1972—1973 рр. на Житомирській держплемстанції. Всього було використано 14 еякулятів від 13 бугаїв симентальської, чорно-рябої, білоголової української, шаролезької і абердин-ангуської порід у віці від 2 до 6 років. Активність спермів становила не нижче 7 балів, концентрація не менш як 0,7 млрд/мл.

Осмотичний тиск у свіжоодержаній і розбавленій спермі визначали кріоскопічним методом розробленим нами<sup>1</sup>. Цей метод дає змогу визначити осмотичний тиск у малих об'ємах (0,08—0,1 мл) біологічних рідин менш як за 1 хв.

<sup>1</sup> «Вісник сільськогосподарської науки», 1974, № 4.

## 2. Зв'язок між активністю і переживаністю сперміїв та осмотичним тиском у розбавленій

Кратність розбавлення сперми	Осмотичний тиск розбавленої сперми, атм	Активність сперміїв, бали			
		після розбавлення сперми	після еквілібрування	після відтавання	
				в ампулах	в гранулах
2	15,07±0,05	7,92±0,24	7,17±0,21	3,33±0,17***	3,33±0,21***
3	17,12±0,17	8,00±0,18	7,33±0,17	3,83±0,17**	4,17±0,17**
4	19,17±0,19	8,00±0,18	7,33±0,17	4,50±0,22	4,83±0,21
8	21,10±0,18	8,00±0,18	7,33±0,17	4,58±0,15	5,17±0,21
12	21,58±0,73	7,92±0,24	7,17±0,21	4,17±0,17	5,25±0,25
16	22,18±0,13	7,58±0,24	7,00±0,29	3,92±0,08**	5,25±0,25
32	22,79±0,12	7,25±0,21*	6,58±0,24*	3,58±0,15***	4,67±0,40

Примітки: Активність сперміїв у свіжоодржаній спермі ( $M \pm m$ ) — 8,50—0,28;

Сперму розбавляли в лактозо-жовтково-гліцериновому середовищі (100 мл води, 11,5 г лактози, 5 мл гліцерину, 20 мл жовтка з добавкою спермосану відповідно до наставлення (від 2 до 32 разів). Осмотичний тиск визначали в кожному розбавленні і заморожували в поліетиленових ампулах за методом, розробленим на Житомирській держплемстанції (в парах рідкого азоту) В. Д. Білоусом і В. М. Кушніром<sup>1</sup>. Після розбавлення і після відтавання визначали переживаність сперміїв при температурі 38—40° (в годинах і методом визначення абсолютного показника живучості). Активність сперміїв визначали після розбавлення, еквілібрування, відтавання сперми. Відтавання проводили у теплій (38—40°) воді не раніше як через 48 годин після заморожування.

Результати дослідів показали, що дія осмотичного фактору проявляється відразу після розбавлення сперми, під час еквілібрування і особливо після заморожування та відтавання (табл. 1). Найкраща активність і переживаність сперміїв одержана при розбавленні у 8 разів.

## 3. Результати заморожування сперми в гранулах при розбавленні дослідним і контроль

Кратність розбавлення сперми	Осмотичний тиск сперми після розбавлення середовищами, атм		Активність сперміїв, бали			
			після розбавлення сперми середовищами		після еквілібрування сперми в середовищах	
	контрольним	дослідним	контрольним	дослідним	контрольному	дослідному
2	15,9±0,16	16,88±0,16	7,50±0,20	8,25±0,25	6,50±0,20	7,32±0,36
3	17,00±0,27	20,86±0,16	8,00±0,20	8,25±0,25	7,25±0,32	7,50±0,29
4	19,05±0,27	23,39±0,22	8,25±0,25	8,25±0,25	7,37±0,36	7,50±0,29
8	21,22±0,22	—	8,25±0,25	—	7,37±0,36	—

Примітки: Активність сперміїв у свіжоодржаній спермі ( $M \pm m$ ) — 8,14±0,13;

<sup>1</sup> «Тваринництво України», 1973, № 12.

спермі (заморожування в ампулах і гранулах),  $M \pm t$

після розбавлення сперми	Переживаність спермів при 38—40°, години		Абсолютний показник живучості спермів		
	після відтавання		після розбавлення сперми	після відтавання	
	в ампулах	в гранулах		в ампулах	в гранулах
10,3±0,62	6,2±0,48	4,5±0,22*	42,29±4,48	10,33±1,25**	7,25±0,86***
10,3±0,34	6,8±0,54	5,0±0,26	45,17±3,21	12,83±1,17	10,92±1,14*
11,2±0,48	7,2±0,40	5,7±0,33	48,83±3,70	17,25±1,66	14,00±1,56
11,3±0,42	7,2±0,40	5,8±0,40	50,58±2,36	17,29±1,69	15,83±1,39
9,8±0,60	6,2±0,31	5,3±0,42	39,79±2,68*	11,83±0,46*	11,96±0,98*
9,0±0,26***	5,8±0,31*	4,2±0,31*	36,12±1,59***	10,96±0,62**	11,21±0,98*
8,5±0,11***	5,3±0,42**	4,0±0,36**	28,54±1,11***	9,21±0,73**	10,25±1,80*

осмотичний тиск — 6,87±0,18. \* —  $P > 0,95$ ; \*\* —  $P > 0,995$  \*\*\* —  $P > 0,999$  по відношенню до показників активності і переживаності спермів при розбавленні в 8 разів.

зів: Осмотичний тиск при цьому дорівнював 21,22 атм. Такий високий осмотичний тиск спричинюється наявністю гліцерину, і, як показали дослідження Є. М. Платова та ін., величина осмотичного тиску в розчинах з гліцерином, визначена за допомогою криоскопічного методу, не дає уявлення про ізотонічність або гіпертонічність таких розчинів по відношенню до спермів.

Різниця між показниками оптимуму та іншими ступенями розбавлення сперми вірогідна, за винятком розбавлення у 4 рази.

У другому досліді, проведеному за аналогічною методикою, одержану і розбавлену сперму заморожували в ампулах і у вигляді гранул (за методом Н. Ющенка, В. Сімакова і К. Левіна, 1968) на фторопластовій пластині. Гранули розморожували в 2,8-процентному розчині цитрату натрію при температурі 38—40°. Активність спермів після відтавання була значно вищою в гранульованій спермі (табл. 2). Проте переживаність спермів була краща при застосуванні ампул. Цілком ймовірно, що причиною цього є недосконалість розріджувачів,

ним середовищами,  $M \pm t$

після відтавання сперми в середовищах		Переживаність спермів (години) після відтавання при 38—40° в середовищах		Абсолютний показник живучості спермів після відтавання в середовищах	
контрольному	дослідному	контрольному	дослідному	контрольному	дослідному
3,75±0,14	5,12±0,31**	4,02±0,65	6,25±0,47*	9,37±2,15	15,25±0,76*
4,50±0,29	6,25±0,32**	4,50±0,64	6,75±0,47*	10,75±2,42	20,50±4,86
5,12±0,24	6,12±0,34	5,25±0,63	5,75±0,47	12,67±2,54	18,31±3,72
5,75±0,32	—	6,00±0,40	—	13,37±3,21	—

осмотичний тиск — 6,81±0,03. \* —  $P > 0,95$ ; \*\* —  $P > 0,99$  по відношенню до показників активності і переживаності спермів при відповідній кратності розбавлення.

які застосовуються при відтаванні сперми. У даному досліді при заморожуванні сперми у вигляді гранул оптимум розбавлення (у 8 разів)

був досить чітко виражений лише за переживаністю спермійв. Активність після відтавання була найвищою при розбавленні в 12 та 16 разів. Різниця між показниками сперми була вірогідною не у всіх випадках, що, мабуть, пояснюється меншою кількістю ( $n=6$ ) використаних у досліді еякулятів. Отже, в перших дослідах було виявлено, що найкращі результати заморожування спостерігалися в тих випадках, коли осмотичний тиск у розбавленій спермі дорівнював приблизно 19—21 атм (у середовищі з гліцерином). У третьому досліді ми зробили спробу виготовити для заморожування сперми в гранулах таке середовище, яке забезпечувало б вказаний вище оптимальний осмотичний тиск після розбавлення сперми в 3 рази (оскільки такий ступінь розбавлення найчастіше застосовується в практиці). Склад цього середовища такий: вода дистильована — 100 мл, лактоза — 13,8 г, гліцерин — 6 мл, жовток — 20 мл і спермосан, відповідно до наставлення. У цьому розріджувачі співвідношення між вмістом лактози та гліцерину було таким, як і в звичайному лактозо-жовтковому середовищі. Еякуляти ділили на дві частини і розбавляли відповідно розробленим та звичайним лактозо-жовтково-гліцериновим середовищем (контроль) в 2, 3 і 4 рази, а контроль ще й у 8 разів.

Результати досліді показали, що в тих випадках, коли осмотичний тиск приблизно дорівнював встановленому оптимальному (21 атм), всі показники заморожування були найкращими (табл. 3). Це підтверджує важливу роль осмотичних явищ при заморожуванні сперми, які обов'язково слід враховувати при розбавленні сперми і розробці нових середовищ.

## РЕЖИМ ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ

**М. А. ДМИТРАШ**, кандидат біологічних наук

Київська дослідна станція тваринництва

Одним із важливих факторів, що впливають на якість сперми, є режим її заморожування і відтавання.

При загально прийнятій технології заморожування сперми якість її після відтавання не завжди достатньо висока. Важливою частиною цієї технології є швидкість зниження температури при охолодженні сперми, проте це питання вивчено ще досить недостатньо.

Сміт і Полдж (1950) застосували повільне заморожування (0,5—1° за хвилину) гліцеринізованої сперми в ампулах у діапазоні від 0° до —15° з дальшим прискоренням до 2—3° за хвилину між —15—50°C.

Аналогічні режими заморожування застосували Стоуер (1953), Х. Х. Хабібুলін (1958), Ф. І. Осташко (1959), Е. М. Платов (1963) та інші. Вони вважають, що в початковий період охолодження (0—15°) треба проводити в уповільненому темпі з наступним прискоренням у діапазоні —15° до —51°—78°C.