

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.

Проте Льюїс і Кін (1955) одержали близько 75% живих сперміїв при швидкому охолодженні до  $-27^{\circ}\text{C}$  з дальшим перенесенням сперми в рідкий азот. Аналогічні результати одержали Кеннелі, Хойт, Фут, Браттон (1960). Їх дослідження показали, що можна одержати більшу кількість активних сперміїв шляхом перенесення відразу з температури  $5^{\circ}\text{C}$  в спиртову ванну з температурою охолодження  $3-5^{\circ}\text{C}$  за хвилину.

Нагазе та Ніва (1964) також довели вищу ефективність швидкого режиму заморожування сперми в гранулах та в поліхлорвінілових соломинках.

Суперечливі літературні дані примусили нас поставити досліди для в'яснення оптимального режиму заморожування сперми бугаїв у поліетиленових ампулах.

Досліди проводили на розділених еякулятах, одержаних від шести бугаїв симентальської породи. При цьому враховували такі показники сперми: об'єм еякулята, концентрацію сперміїв, активність сперміїв після одержання, еквілібрування та відтавання сперми в льодяній воді, а також переживаність відталої сперми при температурі  $38^{\circ}\text{C}$ .

Після одержання сперму з активністю не нижче як 7 балів і концентрацією — 0,8 млрд розбавляли глюкозо-цитратно-жовтковим розріджувачем двохмоментно. Спочатку її розбавляли першим середовищем без гліцерину (дистильована вода — 100 мл, глюкоза 3 г, лимоннокислий натрій — 1,6 г, жовток курячих яєць — 20 мл) при температурі  $30-35^{\circ}\text{C}$  залежно від концентрації сперміїв з таким розрахунком, щоб в 1 мл розбавленої сперми було 100—120 млн активних сперміїв. Після цього сперму поступово охолоджували до температури  $2-4^{\circ}\text{C}$  і тримали в холодильнику 3 години, а потім підшарували у співвідношенні 1:1 друге охолоджене гліцеринізоване середовище, до складу якого входило 84 мл першого середовища, 16 мл маточного розчину (дистильована вода 100 мл, глюкоза 12 г, лимоннокислий натрій 5,6 г і 16 мл гліцерину).

Після другого розбавлення сперму витримували 5—6 годин в холодильнику при температурі  $-2-3^{\circ}\text{C}$  (еквілібрування). Після еквілібрування сперму з активністю не нижче 6 балів розфасовували по 1—1,2 мл в поліетиленові ампули і герметизували їх. Потім сперму охолоджували в спиртовій бані за п'ятьма режимами. Як контроль використали режим заморожування сперми відповідно до інструкції 1968 р.

Режим охолодження контролювали за допомогою мідь-константової термопари. Швидкість охолодження сперми за режимом була такою:

Перший (контроль) — від  $0$  до  $-15^{\circ}\text{C}$ . Температуру зменшували на  $0,5-1^{\circ}$  за хвилину, від  $-15^{\circ}$  до  $-50^{\circ}\text{C}$  на  $2-3^{\circ}$ , від  $-51^{\circ}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  на  $5-7^{\circ}$  за хвилину, потім сперму занурювали безпосередньо в рідкий азот.

Другий — від  $0^{\circ}$  до  $-15^{\circ}\text{C}$  на  $2-3^{\circ}$  за хвилину, від  $-15^{\circ}$  до  $-50^{\circ}\text{C}$  на  $5-7^{\circ}$  за хвилину і від  $-51^{\circ}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$   $7-10^{\circ}$  за хвилину з наступним занурюванням сперми у рідкий азот.

Третій — від 0 до  $-15^{\circ}\text{C}$  на 2—3° за хвилину, від  $-15$  до  $-50^{\circ}\text{C}$  на 5—7° за хвилину з наступним перенесенням сперми в рідкий азот.  
 Четвертий — від 0 до  $-10^{\circ}\text{C}$  на 2—3° за хвилину, від  $-10^{\circ}$  до  $-30^{\circ}\text{C}$  на 3—5° за хвилину і від  $-30$  до  $-50^{\circ}\text{C}$  на 7—10° за хвилину з наступним занурюванням у рідкий азот.

П'ятий — сперма занурювалась у спиртову баню охолоджену до  $-10^{\circ}\text{C}$ , а потім її охолоджували до  $-30^{\circ}\text{C}$  із швидкістю 3—5° за хвилину, від  $-3^{\circ}$  до  $-50^{\circ}\text{C}$  5—7° за хвилину і від  $-51^{\circ}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  7—10° за хвилину з наступним перенесенням сперми у рідкий азот.

Через 48 годин сперму розморожували у льодяній воді і визначали активність за 10-бальною системою (див. таблицю).

Середні показники сперми бугаїв при одержанні та після відтавання залежно від режимів заморожування

Режими заморожування	Об'єм сязкулята, мл	Концентрація спермів, млрд/мл	Активність спермів, при одержанні, бала	Активність спермів після еквілібрування, бала	Активність спермів після відтавання, бала $M \pm m$	Абсолютний показник переживаності спермів при температурі $38^{\circ}$ , одиниці, $M \pm m$
Перший	5,0	1,40	7,6	6,5	$3,9 \pm 0,038$	$1,140 \pm 0,184$
Другий	5,0	1,40	7,6	6,5	$4,9 \pm 0,046$	$1,499 \pm 0,072$
Третій	5,0	1,40	7,6	6,5	$2,9 \pm 0,051$	$1,049 \pm 0,248$
Четвертий	5,0	1,40	7,6	6,5	$3,4 \pm 0,033$	$0,839 \pm 0,087$
П'ятий	5,0	1,40	7,6	6,5	$3,9 \pm 0,049$	$1,187 \pm 0,238$

Очевидно, якість сперми залежить від швидкості охолодження і кристалізації. Ці дані визначалися за допомогою проградуйованих термомпар, встановлених в центрі ампул з спермою.

Найвища активність і переживаність сперми після відтавання була при заморожуванні її за другим режимом. Так, якщо при заморожуванні сперми за другим режимом середня активність сперми була 4,9 бала, а абсолютний показник переживаності 1,499 одиниці, то за першим режимом (контроль) активність сперми дорівнювала тільки 3,9 бала, а абсолютний показник переживаності 1,14 одиниці.

Активність і переживаність сперми замороженої за п'ятим режимом була такою ж як при заморожуванні її за загальноприйнятим режимом (№ 1).

Показники сперми замороженої за третім і четвертим режимами порівняно з другим, п'ятим і першим були значно нижчими.

Отже найкращі активність та виживання сперми після відтавання були при заморожуванні її за другим режимом, при якому зниження температури проводили на 3—4° швидше, ніж при загальноприйнятому режимі заморожування (контроль).