

## ЛІТЕРАТУРА

Бондарев Г. Ф. Определение оплодотворяющей способности спермы быков-производителей с помощью ультразвука.— В сб.: Доклады советских ученых к VI Международному конгрессу по размножению и искусственному осеменению животных. М., 1968.

Вишневський В. Й., Скорняков Б. О. Зміни швидкості розповсюдження ультразвукових коливань в спермі після швидкого охолодження.— У зб.: Молочном'ясне скотарство, вип. 31. К., «Урожай», 1973.

Осташко Ф. И., Бугров А. Д. Рекомендации по замораживанию и хранению спермы быков при температуре —196°.— «Прапор», Харьков, 1968.

## МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СПЕРМІЇВ КНУРІВ ТА БУГАЇВ ПІД ВПЛИВОМ ЗАМОРОЖУВАННЯ

**Б. М. ВЕЛЬМОЖНИЙ**, кандидат біологічних наук

**О. О. БРУЄНКО**, головний технолог

Центральна дослідна станція по штучному осіменінню  
сільськогосподарських тварин

Розробка методів тривалого зберігання сперми кнурів в замороженому стані вимагає всебічного вивчення стійкості спермійв цього виду тварин до наднизьких температур. У зв'язку з цим порівняльне дослідження морфологічних змін спермійв кнурів, мало стійких до дії низьких температур, та спермійв бугаїв, стійких до цих температур, становить певний інтерес.

Ми провели досліди по заморожуванню та розморожуванню сперми плідників цих видів тварин при різних режимах. При цьому вивчали морфологічні зміни спермійв за допомогою люмінесцентного та електронного мікроскопів. У дослідях використовували розділені еякуляти від восьми бугаїв та п'яти кнурів різних порід. Свіжоодржану сперму після загальноприйнятої оцінки розводили одномоментно при температурі 30° у співвідношенні 1:1—1:3 залежно від концентрації спермійв. Для сперми бугаїв використовували лактозо-жовткове середовище з 7% гліцерину, для сперми кнурів — глюкозо-хелато-цитратно-жовткове середовище з 5% гліцерину. Розведену сперму охолоджували за рівномірноповільними режимами.

Сперму бугаїв доводили до температури 2—4° за 2 години, сперму кнурів до 8°— за 4 години. Сперму бугаїв після 5—6-годинного еквілібрування заморожували в гранулах об'ємом 0,1 мл у лунках фторопластової пластинки, охолодженої до температури —80°, сперму кнурів розливали в скляні ампули по 1,5 мл і заморожували в спиртовій ванні, яку охолоджували через змійовник парю рідкого азоту за режимом Ніво (1963).

Взяті для дослідів синтетичні середовища та режим охолодження за

літературними даними та результатами наших досліджень є найкращими для сперми плідників цих видів тварин.

В усіх випадках швидкість охолодження та нагрівання контролювали термоелектричним методом за допомогою терморпар, гальванометра та електричного потенціометра.

Після 48—72-годинного зберігання в рідкому азоті сперму розморожуювали за повільним та швидким температурними режимами. Гранули переносили в 1 мл ізотонічного розчину цитрату натрію з температурами 0° і 60°, ампули — у водяну баню з такими ж температурами.

Для люмінесцентної мікроскопії препарати готували за методом Г. Д. Святювця та Г. Г. Погрібного (1968)<sup>1</sup>, для електронної мікроскопії — за методом М. Т. Плішко та Л. І. Іонова (1965)<sup>2</sup>. Люмінесцентну мікроскопію проводили на мікроскопі МБІ-3 з приставкою 01—17, а електронну — на приладі ЕМ-5 при збільшенні від 5 до 40 тис. разів і прискорюючій напрузі 50 електронвольт.

У кожній пробі нараховували 200 спермійів і визначали кількість клітин з морфологічними змінами в свіжоодержаній, розведеній, охолодженій та розмороженій спермі.

У свіжоодержаній спермі бугаїв і кнурів спостерігали значну кількість спермійів з різними морфологічними порушеннями. У більшості спермійів спостерігали зміни акросоми. У спермі бугаїв було виявлено близько 73% клітин без помітних морфологічних змін, у спермі кнурів — 57%. Якщо в спермі бугаїв відсутність акросоми спостерігали у 8% клітин, то в спермі кнурів — у 12% клітин. Різні зміни акросоми — набухання, порушення зовнішньої конфігурації, відшарування від головки, сповзання, розриви, вакуолізація тощо — у свіжоодержаній спермі бугаїв траплялись у 6% спермійів, у спермі кнурів — у 22%. При дослідженні встановлено значні індивідуальні коливання кількості спермійів з патологічними змінами в окремих еякулятах, одержаних від різних тварин. Найбільша кількість нормальних клітин у спермі бугаїв досягла в наших дослідках 85%, у спермі кнурів — 75%.

Отже, клітин з морфологічними змінами значно більше в спермі кнурів, ніж у спермі бугаїв. При електронній мікроскопії необхідно враховувати можливі артефакти, що виникають у клітинах при їх попередній підготовці, дії на них високого вакууму та пучка електронів при огляді.

Дані люмінесцентної мікроскопії показали, що в спермі кнурів близько 30%, а у спермі бугаїв — 12% спермійів мали акросому із зміненими фізико-хімічними властивостями, проте як структурний елемент клітини вона не мала помітних змін. Це також підтверджує гіпотезу про порівняно меншу стійкість акросоми спермійів кнурів. Кількісні структурні зміни інших ділянок поверхні спермійів кнурів та бугаїв у свіжоодержаній спермі були практично однаковими.

<sup>1</sup> Святювец Г. Д., Погребной Г. Г. Люминесцентно-микроскопический метод оценки качества спермиев. — В кн.: Методики исследований по физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных. К., «Урожай», 1968.

<sup>2</sup> Плишко Н. Т., Ионов Л. И. Перманганатный метод фиксации при электронной микроскопии спермиев. — Вестник сельскохозяйственной науки, 1965, № 10.

У розведеній спермі активність сперміїв майже не зменшувалась. Процес розведення гліцеринізованими середовищами не викликав достатньо чітких морфологічних змін сперміїв. Охолодження розведеної сперми до низьких плюсових температур дещо зменшувало активність сперміїв, але не збільшувало кількості клітин з морфологічними змінами. Це свідчить про досить високі якісні та захисні властивості застосованих середовищ, а також про доцільність одномоментного розведення ними свіжоодержаної сперми.

Отже, на зазначених етапах технологічної підготовки сперми кнурів та бугаїв до заморожування істотних фізіологічних та морфологічних змін сперміїв не виникає. Доказом цього може бути порівняно висока запліднювальна здатність свіжоодержаної та охолодженої до низьких плюсових температур сперми кнурів та бугаїв на станціях штучного осіменіння сільськогосподарських тварин.

Зовсім інакше статеві клітини переносять процеси заморожування. Активність сперміїв та збереження структури значною мірою залежить від швидкості розморожування (табл. 1). Швидкий перехід сперміїв замороженого стану в рідкий порівняно з повільним розморожуванням більш як у 3 рази підвищує їх активність. Подовжується і час живучості швидко розморожених сперміїв при інкубації їх у термостаті при 38°. Незалежно від режиму і методу заморожування сперми кнурів та бугаїв тільки при швидкому розморожуванні одержані найкращі результати. Отже, на збереження фізіологічних та морфологічних якостей сперміїв режим розморожування впливає не меншою мірою, ніж режим заморожування, а в деяких випадках може мати і більше значення. Якщо при заморожуванні сперми кнурів та бугаїв швидкість зниження температури може мати досить великий діапазон коливань, то цього не можна сказати про швидкість її розморожування.

**1. Активність і морфологічні зміни сперміїв кнурів і бугаїв на різних етапах заморожування, %**

Сперма	Вид плідника	Активність	Акросома			Зміни оболонки тіла і хвоста та інші
			без змін	з різними ушкодженнями	відсутня	
Свіжоодержана	Кнур	70	57	22	12	9
	Бугай	71	73	6	8	13
Розведена	Кнур	70	57	23	11	9
	Бугай	71	70	7	10	13
Охолоджена	Кнур	65	57	25	12	6
	Бугай	65	72	6	9	13
Розморожена при температурі 0°	Кнур	5	38	38	14	10
	Бугай	17	47	12	17	24
Розморожена при температурі 60°	Кнур	20	46	31	11	12
	Бугай	56	67	8	9	16

Морфологічні зміни спермійв кнурів та бугаїв після заморожування-розморожування зовні подібні. Це набухання, вакуолізація, відшарування, сповзання, розриви, оптичне просвітлення акросоми, порушення її зовнішньої конфігурації без збільшення площі, відшарування та розриви зовнішньої оболонки, розрихлення та розділення фібрил щіточки хвоста, відрив голівки від тіла, закручування хвоста тощо.

Але в кількісному відношенні найчастіше і найбільш різноманітні зовнішні зміни відбувалися в акросомі спермійв як кнурів, так і бугаїв. Проте при заморожуванні сперми бугаїв порівняно з спермою кнурів спостерігали дещо більші пошкодження оболонки в ділянці тіла та хвоста спермійв.

У шести дослідах вивчали морфологічні зміни спермійв кнурів при повільному заморожуванні та швидкому розморожуванні в глюкозо-хелато-цитратному середовищі з добавками жовтка і гліцерину або без них (табл. 2). Одержані дані показують, що найменше ушкоджуються спермії в середовищах, що містять гліцерин. Введення жовтка в синтетичні середовища майже не захищає спермії від руйнівного впливу фізико-хімічних факторів при дії наднизьких температур. Активність спермійв також вища в присутності гліцерину. Розбавлення сперми глюкозо-хелато-цитратним середовищем без жовтка та гліцерину порівняно з нерозбавленою спермою деякою мірою зменшує морфологічні ушкодження спермійв. В усіх цих дослідах основні структурні зміни спермійв відбувалися в акросомі.

**2. Морфологічні зміни зовнішніх частин спермійв кнура після заморожування в різних середовищах**

Середовище	Кількість спермійв			
	без змін	зміни акросоми		зміни оболонки тіла і хвоста та інші
		різні ушкодження	відсутня	
Глюкозо-хелато-цитратне	33	40	15	12
Глюкозо-хелато-цитратне + 5% жовтка	36	37	20	7
Глюкозо-хелато-цитратне + 5% гліцерину	47	31	11	11
Глюкозо-хелато-цитратне + 5% жовтка і 5% гліцерину	46	31	11	12
Нерозбавлена сперма	27	46	15	12

Отже, структурні елементи спермійв кнура, особливо їх акросома, значно гірше витримують дію наднизьких температур, ніж спермії бугая. У сперміях обох видів тварин найбільше ушкоджується акросомний апарат. Швидке розморожування зменшує структурні ушкодження спермійв як кнура, так і бугая. Жовток майже не захищає структурні елементи спермійв кнура від ушкодження під впливом заморожування, хоча

діапазоні плюсових низьких температур він є поки що необхідним компонентом розріджувачів.

Для успішного заморожування сперми кнурів необхідно проводити пошуки речовин, які стабілізують оболонки сперміїв, тому що основні морфологічні зміни відбуваються саме в них.

## **ВИЖИВАНІСТЬ ЗАМОРОЖЕНО-ВІДАЛИХ СПЕРМІЇВ У СТАТЕВИХ ШЛЯХАХ СВИНОМАТОК**

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

кандидати біологічних наук

**В. Ю. ХАЗАН,** науковий співробітник

Центральна дослідна станція по штучному осіменінню  
сільськогосподарських тварин

В останні роки посилилась увага до розробки технології заморожування сперми кнурів. За літературними даними, запліднювальна здатність сперміїв кнурів після глибокого заморожування незначна.

У наших попередніх дослідях по штучному осіменінню свиноматок замороженою спермою кнурів заплідненість їх становила 13%. Від цих свиноматок при опоросі було одержано по 3—4 нормально розвинутих поросят.

Біологічна повноцінність і життєздатність сперміїв є головною умовою, що забезпечує високу заплідненість та плодючість осіменених свиноматок. Проведені нами морфологічні, фізіологічні і біохімічні дослідження замороженої сперми вказують на дуже малу стійкість сперміїв кнура до низьких і наднизьких температур. Під їх впливом у спермії відбуваються глибокі структурні порушення, а також знижується ферментативна активність, що призводить до погіршення їх виживання. Деякі вдосконалення технології заморожування дали змогу збільшити не лише кількість активних сперміїв після відтавання, але й час їх виживаності від 1—2 до 6—9 годин при температурі 38°. З метою вивчення виживаності у статевих шляхах свиноматок сперміїв після глибокого заморожування ми провели дві серії дослідів.

Першу серію дослідів проводили на Київському м'ясокомбінаті. З групи свиней великої білої породи віком 10—12 місяців і живою вагою 120—140 кг, що надійшли з відгодівельних господарств, де не утримують кнурів, відібрали 23 свиноматки з ознаками статевої охоти. Охоту визначали за зовнішніми ознаками і при наявності рефлексу нерухомості три надавлюванні на спину. Відібраних тварин утримували в окремому станку і одноразово осіменяли фракційним методом. Для штучного осіменіння використовували як відталу після глибокого заморожування сперму, так і свіжоодержану. У дозі було 2—2,5 млрд активних сперміїв. Як заповнювач використовували глюкозо-сольовий розчин з антибіотиками.