

різниця в типі будови тіла, що, очевидно, зумовлено спадковими факторами і деякими інтер'єрними особливостями, які підтверджують також гематологічні дослідження.

Таким чином, ранне прогнозування (за екстер'єрним і інтер'єрним показниками) дає змогу оцінити племінні якості бугая-плідника, тобто певною мірою виявити його властивості передавати екстер'єрні ознаки і тип будови тіла.

ДЕЯКІ ПИТАННЯ ТЕОРІЇ І ТЕХНІКИ ШТУЧНОГО ОСІМЕНІННЯ

І. В. СМІРНОВ, доктор біологічних наук

Українська сільськогосподарська академія

Розроблення методу штучного осіменіння сільськогосподарських тварин за рубежем нерідко називають «відкриттям сторіччя». Значення цього методу для племінної справи, для масового поліпшення породних та продуктивних якостей худоби важко переоцінити. Як приклад, можна навести досвід фінських тваринників, які за допомогою широкого використання кращих племінних плідників, оцінених за якістю потомства, змогли за 10 років підвищити молочну продуктивність корів на 1000 кг (причому годівля худоби за ці роки практично не поліпшилася).

Як і будь-який прогресивний метод, штучне осіменіння потребує постійного удосконалення. Хоча теорія і техніка штучного осіменіння знаходиться на досить високому рівні, умови виробництва, які постійно змінюються, висувають все нові і нові вимоги. Не претендуючи на вичерпність викладу, зупинимося на деяких найважливіших моментах.

Технологія штучного осіменіння починається з одержання сперми від племінних плідників. Для цієї мети вже понад 40 років успішно застосовується штучна вагіна. В конструкцію цього простого і зручного у використанні приладу в останні роки внесені деякі зміни. І. І. Родін (1961) запропонував вагіну з балоноподібним розширенням, щоб запобігти можливим больовим подразненням у плідників в момент еякуляції. За рубежом питання було вирішено значно простіше: циліндр вагіни скоротили на 12—15 см, а на його кінець наділи конус з тонкої гуми, всередині якого вільно може повертатись кінцева частина статевого члена при виділенні сперми. У нашій країні гумовий конус замінили поліетиленовим спермоприймачем одноразового використання (Ф. І. Осташко і співробітники) або ж спеціальним пластмасовим наконечником, який значною мірою запобігає бактеріальному забрудненню сперми (Д. Д. Логвінов). Ці удосконалення являють собою безсумнівний інтерес для виробництва. Проте необхідно продумати питання, як запобігти холодовому удару сперміїв при використанні таких спермоприймачів у холодну пору року.

Розробляються поліетиленові камери одноразового використання для штучних вагін. Це питання ускладнюється недостатньою еластичністю звичайних сортів поліетиленової плівки, яка не може конкурувати в цьому відношенні з гумою.

Не все гаразд і з технікою одержання сперми. На більшості станцій застосовують шаблонні режими використання бугаїв-плідників, одержують сперму від усіх бугаїв на тих же самих підставних тварин. Між тим є ряд робіт, результати яких свідчать про велике значення типів нервової діяльності бугаїв для правильної організації використання останніх. Найбільш новими і повними є дослідження А. П. Кругляка (1971—1974), який застосував та удосконалив досить просту і зручну рухово-харчову методику визначення типів нервової діяльності, запропоновану Г. А. Васильєвим і Д. В. Смирновим-Угрюмовим (1969). Зокрема, встановлено, що сперма бугаїв спокійного типу має найбільш високу запліднювальну здатність, а сперма бугаїв слабкого типу — найнижчу. Автор досліджував можливості використання статевих рефлексів для визначення типів нервової діяльності і прийшов до висновку, що ці можливості дуже обмежені, особливо якщо йдеться про дорослих бугаїв. Це цілком зрозуміло, оскільки з віком безумовні статеві рефлекси «обрастають» численними умовними рефлексами, як позитивними, так і гальмовими, що значно ускладнює визначення. У зв'язку з цим стає зрозумілою непридатність примітивних і ненадійних методів визначення типів нервової діяльності на основі статевих рефлексів, як це було запропоновано В. О. Буровим і М. Ф. Іванковим (1970).

Особливий інтерес у робітників станцій викликає метод одержання сперми на «чучело». Рефлексологічне обґрунтування цього методу майже не розроблено. Робота А. П. Кругляка вносить деяку ясність в це питання. Найбільш швидко «звикають» до чучела бугаї нестримного типу. Понад половина дорослих, вже пручених до штучної вагіни бугаїв проявляє обнімальний рефлекс відносно чучела вже під час першого сеансу привчання. Молодих бугаїв привчати до чучела важче, проте між ними мало тварин, які повністю відмовляються від садки на чучело.

Роботи А. П. Кругляка (1973) підтвердили дані наших спостережень, за якими статева активність бугаїв може різко змінюватися при зміні підставних тварин. Слід використовувати для цього так званих фаворитів, які викликають у даного бугая особливо сильне статеве збудження. Не можна використовувати тварин високого зросту і з широким крупом.

На якість сперми значно впливає годівля племінних плідників. Хоча цій проблемі присвячено чимало літературних даних, проте багато ще залишається не з'ясованого. Зокрема, остаточно не вирішене питання про оптимальний вміст концентрованих кормів у раціонах. В. К. Милованов (1962) рекомендував застосовувати концентратний тип годівлі, що викликало ряд заперечень, обґрунтованих експериментальними матеріалами. На нашу думку, основним недоліком літературних джерел, де рекомендується той чи

інший тип годівлі, є неврахування авторами тісного взаємозв'язку годівлі і обсягу мускульної роботи, яку виконують плідники під час моціону. Тип годівлі, який дає позитивний ефект при одній інтенсивності моціону, може виявитися цілком не придатним при іншій інтенсивності. Отже, часто повторюване в роботах «бугаї користувалися моціоном» не дає підстав зробити будь-які певні висновки.

Дальша ланка технологічного процесу штучного осіменіння — оцінка якості сперми, одержаної від плідника або збереженої поза організмом протягом того чи іншого періоду. Слід зазначити, що в розробці методів оцінки протягом кількох років спостерігається певний застій. За винятком розробки прискорених методів визначення концентрації спермій за допомогою електрофотометричних приладів, в останні роки майже не надійшло нових пропозицій щодо методів оцінки сперми. Кілька років тому ми порекомендували визначати на станціях рН свіжоодержаної сперми за допомогою універсального індикатора, проте в інструкцію цей метод не включений, хоча за допомогою нього можна виявляти еякуляти зниженої якості. Способи прискореного визначення виживаності спермій при температурах 38—40° (або навіть при 46°) являють собою безсумнівний інтерес, але зв'язок показників виживаності із запліднювальною здатністю спермій вивчений недостатньо.

Мало уваги приділяється одному з важливих фізіологічних показників сперми — її осмотичному тиску. Такого роду визначення можна знайти лише у деяких експериментальних роботах. А втім, ми переконані, що цей показник тісно пов'язаний з більшою чи меншою здатністю спермій переносити глибоке охолодження, а також осмотичні дії при розбавленні сперми. Відомо, що осмотичний тиск сперми плідників одного виду може коливатися у досить широких межах, проте синтетичні середовища готуються за стандартними рецептами і тому повинні мати сталий осмотичний тиск. Було б корисним готувати не одне, а два-три середовища з різним осмотичним тиском для розбавлення еякулятів, які різняться за цим показником. Звичайно, для цього на станціях необхідно мати відносно прості та зручні прилади для швидкого визначення осмотичного тиску у малих об'ємах сперми. Одним з таких приладів є запропонований В. М. Кушніром удосконалений мікрокріосометр.

Слід врахувати, що результати досліджень В. М. Кушніра (1974) підтверджуються даними М. П. Шергіна про досить швидкі зміни осмотичного тиску сперми бугая у короткій проміжок часу після її одержання. Ці зміни можуть викликати ще більший розрив між осмотичним тиском розбавлювача і сперми.

Неповністю вивчена роль жовтка як своєрідного осмотичного буфера, виявлена нами ще в 1963 р. Встановлено, що в присутності жовтка значно зменшується шкідлива дія на спермії гіпертонічних розчинів цукрів і солей. Цілком імовірно, що жовток виконує таку ж саму роль і при глибокому заморожуванні сперми (а не тільки пом'якшує холододовий удар, як допускалося раніше).

Дослідження В. М. Кушніра вимагають нового підходу до

з'ясування значення гліцерину як осмотичного фактора при розбавленні та заморожуванні сперми. За гіпотезою Е. М. Платова, гліцерин знижує осмотичний тиск у розбавлювачах. Тому цей дослідник розробив рецепт «компенсованого» середовища з вмістом солей і цукрів у 1,5 раза більшим проти норми. При введенні в таке середовище гліцерину, за даними Е. М. Платова (1963), осмотичний тиск знижувався до нормального. Проте експериментальною перевіркою (І. В. Смирнов, 1963) встановлено, що осмотичні явища у розбавленій спермі не укладаються в рамки гіпотези Е. М. Платова. Зокрема, жовток проявляє компенсуючу дію сильніше, ніж гліцерин, хоча про властивість жовтка сприяти зменшенню дисоціації солей у літературі ніколи не повідомлялося.

Не з'ясованою залишалася й інша важлива обставина. За результатами кріоскопічних досліджень, гліцерин створює у розбавлювачах (особливо у компенсованих, за Е. М. Платовим) значний додатковий осмотичний тиск і розбавлювачі перетворюються у гіпертонічні середовища, де спермі повинні швидко гинуть. Фактично ж цього не відбувається. На основі наших досліджень (1964), осмотичний тиск гліцерину не є фіктивним, що не діє на клітини. Еритроцити великої рогатої худоби та коней розбавляли розчинами гліцерину у дистильованій воді. Якщо припустити, що гліцерин не має осмотичної дії на клітини, гемоліз еритроцитів у водно-гліцеринових розчинах повинен відбуватися так же швидко, як і в чистій воді. У дослідах ми виявили, що додавання до води 1% гліцерину затримувало гемоліз на кілька хвилин, при підвищенні концентрації гліцерину гемоліз затримувався на триваліший час, а при додаванні 30% гліцерину повний гемоліз не наставав зовсім. З'ясувати ці факти можна тільки досить швидким проникненням гліцерину всередину клітин. Безпосередньо після розбавлення осмотичний тиск гліцерину у зовнішньому середовищі тією чи іншою мірою компенсував тиск усередині клітин, але потім гліцерин, що проникав у протоплазму, підвищував її осмотичний тиск, зовнішнє середовище стало гіпотонічним щодо клітинного вмісту і відбувався гемоліз. При досить високому вмісті гліцерину у зовнішньому середовищі градієнт осмотичного тиску зменшувався, і гемолізу зазнавала лише частина еритроцитів.

Грунтуючись на описаних фактах, В. М. Кушнір (1974) провів спеціальні дослідження на сперміях бугая, результати яких дозволили сформулювати гіпотезу щодо пояснення осмотичних явищ, які відбуваються у розбавленій спермі в присутності гліцерину, а також механізм дії компенсованих середовищ. За цією гіпотезою, у перший момент після розбавлення сперми вода виходить із спермій у середовище, оскільки гліцерин (у концентраціях, які застосовуються при заморожуванні сперми) сприяє підвищенню осмотичного тиску середовища. Але одночасно, хоча і з меншою швидкістю, гліцерин проникає у клітини. Як вихід із спермій води, так і проникнення гліцерину підвищує осмотичний тиск усередині клітини. Значення компенсованих розбавлювачів, які містять підвищену кількість цукрів і солей, полягає у зрівноважуванні зростлого осмотичного

тиску протоплазми. При розробці рецептів розбавлювачів необхідно підбирати таке співвідношення між гліцерином та іншими осмотично активними речовинами, щоб осмотичний градієнт між клітиною та середовищем був найменшим.

Дані численних літературних джерел, а також дослідження В. М. Кушніра (1974) свідчать, що гліцерин проникає крізь оболонку спермія з досить великою швидкістю. Твердження Т. П. Іллінської, що гліцерин зовсім не проникає усередину клітин, а лише взаємодіє з позаклітинними компонентами сперми або розбавлювача, є, мабуть, результатом методичних помилок при проведенні дослідів. Очевидно, Т. П. Іллінська не врахувала, що мічений гліцерин, який швидко проникнув всередину сперміїв, був здатним з такою ж швидкістю вийти з клітин при їх відмиванні.

Відомо, що усі методи заморожування сперми передбачають її адаптацію та еквілібрацію (різниця між цими термінами не завжди чітко визначається) протягом різних проміжків часу — близько 18—20 год. Під адаптацією, мабуть, слід розуміти процес повільного охолодження сперми до температури 0—5° з тією метою, щоб починати глибоке охолодження від мінімальної плюсової температури, при якій спермії перебувають у стані неповного анабіозу і легше переносять осмотичні зрушення, що виникають під час заморожування, ніж у тому випадку, коли обмінні процеси відбуваються на високому рівні. Крім того, при охолодженні від нульової температури скорочується тривалість перебування сперми у рідкому стані, а отже, зменшується небезпека холодового удару.

У механізмі еквілібрації дуже багато незрозумілого. Раніше вважали, що під час еквілібрації гліцерин проникає усередину сперміїв. Проте, як ми бачили, проникнення гліцерину відбувається дуже швидко. Можливо, під еквілібрацією слід розуміти зрівноваження не лише гліцерину, а й інших осмотично активних речовин у тому розумінні, в якому застосував цей термін В. М. Кушнір (1974). У всякому випадку попереднє уявлення про необхідність тривалої еквілібрації значно застаріло: в сучасних методиках рекомендуються короткі строки адаптації і еквілібрації — близько 3—4 год.

Незважаючи на те, що метод зберігання сперми у замороженому стані з кожним роком набуває все більшого поширення, теорія глибокого охолодження розроблена ще не достатньо. Різні методи заморожування сперми (та й інших біологічних об'єктів, наприклад, крові) пропонуються, як правило, на основі чисто емпіричних пошуків. Створення стрункої і добре обгрунтованої теорії глибокого охолодження сперми значно прискорило б удосконалення практичних методів. Поки що доводиться обмежуватись більш-менш правдоподібними гіпотезами.

Одна з перших таких гіпотез — гіпотеза про вітрифікацію біологічних об'єктів — була висунута ще у тридцятих роках Б. Лайтом. На його думку, при досить швидкому охолодженні дрібних біологічних об'єктів можна запобігти утворенню кристалів льоду, які пошкоджують тонку структуру протоплазми, а також сприяють збез-

водненню її колоїдів, і досягти склоподібного (вітрифікованого) стану протоплазми, при якому зберігається її структура. Склоподібний стан нестійкий. При підвищенні температури до певного рівня у вітрифікованій речовині може початися утворення кристалів (девітрифікація). Щоб запобігти цьому, вітрифіковані об'єкти потрібно зберігати при достатньо низьких температурах (нижче -80°) і розморожувати з максимальною швидкістю.

Досліди Б. Лайта і співробітників, а також Е. Я. Граєвського і власні підтверджують можливість вітрифікації біологічних об'єктів. При замороженні сперми кролів у тонкостінних алюмінієвих пакетиках (І. В. Смирнов, 1947—1949) поновлення руху спермій відмічалось лише при швидкому відтаванні в теплій воді. У тих випадках, коли відтавання відбувалося при кімнатній температурі на повітрі, спермії повністю гинули. Аналогічне явище спостерігав і Е. Я. Граєвський (1946). Загибель спермій у цих умовах найлегше пояснити з позиції гіпотези вітрифікації. Сприятливу дію швидкого відтавання було встановлено і в наших дослідах (І. В. Смирнов, О. Е. Бруенко, 1971).

У зв'язку з використанням гліцерину при заморожуванні сперми виникли сумніви щодо можливості її вітрифікації. Тепер більшість вчених вважають, що життєздатність спермій можна зберегти і при дрібнокристалічному замерзанні сперми. Є навіть дані про те, що у заморожених клітинах в усіх випадках виявляються кристали льоду. Противники гіпотези про можливість вітрифікації зазначають також, що в спермі міститься багато води, а чисту воду можна одержати у склоподібному стані лише при дуже великих швидкостях охолодження (5000 град/сек), і її рекристалізація відбувається вже при -130° . Автори подібних висловлювань не враховують, що значна частина води у клітинах зв'язана з білками та іншими колоїдами протоплазми, а властивості зв'язаної води різко відрізняються від властивостей вільної води. Зокрема, у зв'язаній воді значно утруднене переміщення частинок, необхідних для побудови кристалічної решітки.

Щодо виявлення кристалів льоду усередині клітини, то ці дослідники не так вже переконливі. Робити остаточні висновки про наявність кристалів можна лише тоді, коли є впевненість, що вони не утворилися в процесі приготування препарату (а запобігти артефактам досить важко). Не можна виключити можливість утворення кристалів лише в окремих ділянках протоплазми, де є вільна або слабо зв'язана вода.

Проте все більше стає ясним, що стару гіпотезу Б. Лайта навряд чи можна зберегти у її первісному вигляді.

Ще у 1949 р. нами вперше висловлено припущення про можливість одночасного (або, вірніше, майже одночасного) протікання процесів кристалізації та вітрифікації при заморожуванні сперми. При цьому кристалізація розглядалась як позитивний момент, що сприяє вітрифікації самих клітин.

Вивчення літературних даних і власні експерименти протягом 25 років переконують нас в тому, що ця гіпотеза пояснює чимало

незрозумілих фактів і може принести певну користь при удосконаленні методів заморожування сперми.

Суть гіпотези у стислому викладі полягає в тому, що при не дуже швидкому заморожуванні сперми починається кристалізація вільної води у рідкій фазі сперми. Між кристалами утворюється концентрований розчин цукрів і солей, під дією якого з клітин витягується вільна вода. Спермії при цьому не гинуть, оскільки при низьких температурах вони менш чутливі до осмотичних зрушень, ніж при плюсових температурах. Втрата вільної води зменшує можливість утворення кристалів усередині клітини і сприяє вітрифікації протоплазми.

Таким чином, кажучи про можливість вітрифікувати сперму, ми маємо на увазі насамперед перехід у склоподібний стан протоплазми і ядра спермій.

Гіпотеза пояснює, чому при дуже швидкому заморожуванні сперми (наприклад, за допомогою занурення малих об'ємів її безпосередньо у рідкій азот) майже всі спермії гинуть, а при деякому сповільненні охолодження (заморожування у парах рідкого азоту, на пластині сухого льоду при температурі -79° або на фторопластовій пластині) результати значно поліпшуються.

Ми встановили (І. В. Смирнов, О. Е. Бруенко), що оптимальна температура для заморожування сперми на фторопластовій пластині змінюється залежно від об'єму гранул: чим менше об'єм гранули, тим вище повинна бути температура пластини, і навпаки. Це також підтверджує нашу гіпотезу.

Ще в 1947—1950 рр. (І. В. Смирнов) було встановлено, що на результати заморожування сперми впливає ступінь її розбавлення (тобто співвідношення між об'ємом клітин і рідкої фази сперми). При однакових ступенях розбавлення сперма з більшою концентрацією спермій заморожувалася гірше, ніж менш густа. Ці дані підтвердилися у дослідях М. І. Лопатка (1960). Пояснюється це тим, що при збільшенні об'єму міжклітинного середовища кристалізація води в ньому прискорюється, що сприяє виходу із спермій вільної води.

Вище зазначалось, що ми допускаємо можливість утворення кристалів льоду і усередині клітини, проте зв'язана з колоїдами вода, на нашу думку, вітрифікується.