ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ ТА ЇЇ ГІАЛУРОНІДАЗНА АКТИВНІСТЬ

Г. С. ГАЙВОРОНСЬКИЙ,
кандидат біологічних наук
Г. Р. КРАВЕЦЬ

Центральна дослідна станція по штучному осіменінню сільськогосподарських тварин

Фермент гіалуронідаза, який належить до групи карбогідраз, відіграє важливу роль в процесі запліднення яйцеклітин і в розвитку зигот (Мак-Клін, 1942; І. І. Соколовська, 1948; 1957; Н. Т. Плішко, 1966, та ін.).

Він знижує в'язкість гіалуронової кислоти, входить до складу фолікулярних клітин і міжклітинної речовини, яка оточує яйцеклітину після овуляції, а також входить до складу прозорої оболонки яйцеклітини. Цей фермент спочатку зумовлює дуже швидку деполімеризацію гіалуронової кислоти, а потім більш глибоке її розщеплення на гексозамін і глюкуронову кислоту (В. К. Милованов, 1963).

Звичайна сперма сільськогосподарських тварин має відносно високий вміст гіалуронідази як у плазмі, так і безпосередньо в сперміях. У плазму гіалуронідаза надходить із спермій після їх відмирання, а живі активні спермії досить міцно утримують цей фермент (В. К. Милованов, 1965). За даними Н. Т. Плішка, Р. А. Звездкіної та В. В. Євмінова (1968), гіалуронідазна активність статевих клітин при збереженні швидко знижується. Авторами встановлено, що через чотири доби в сперміях бика, які знаходяться в глюкозо-цитратно-жовтковому середовищі, активність гіалуронідази знижувалась в тридцять разів і більше, тоді як кількість рухомих клітин залишається майже на тому ж рівні (66—70%). Ці автори вважають, що ступінь зниження гіалуронідазної активності залежить від складу середовища і строків збереження сперми.

М. Т. Могилевський і Л. С. Коган (1950) на основі проведених досліджень прийшли до висновку, що кількість гіалуронідази в сперміях залежить від стану тварин, загального рівня їх годівлі і забезпечення вітамінними кормами.

Сперма, яка не має гіалуронідази, повністю не придатна до запліднення (К. Майєр, 1947).

За літературними даними, гіалуронідазна активність спермій є одним з основних показників біологічної повноцінності сперми, що необхідно враховувати при визначенні її якості.

Тому ми вирішили вивчити, як змінюється гіалуронідазна активність спермій на різних етапах заморожування сперми швидким методом (в гранулах). Дослідження гіалуронідазної активності проводили в свіжоодержаній спермі, розведеній лактозо-жовтково-гліцериновим

едовищем (склад середовища: вода дистильована — 100 *мл*, лакто- – 11,5 *г*, жовток курячого яйця — 20 *мл*, гліцерин — 5 *мл*), після 5-годинної еквілібрації і заморожування до температури — 196° та ріганні її при цій же температурі протягом 2—10 днів.

Гіалуронідазну активність визначали віскозиметричним методом у ифікації Н. Т. Плішка і співробітників (1968) з деякими нашими нами відносно сперми бугаїв. Для дослідження відбирали по 3— *л* сперми від шести плідників симентальської і п'яти чорно-рябої ід. Активність спермій становила 0,4—0,8 бала, а концентрація — –2 млрд. в 1 *мл*. Потім зразу ж відбирали таку кількість свіжоодер- ної сперми, в якій знаходилось 300 млн. активних спермій (розра- ок робили, враховуючи концентрацію та активність спермій), і ви- чали їх сумарну гіалуронідазну активність.

Решту сперми розводили лактозо-жовтково-гліцериновим середо- цем у співвідношенні 1:1—1:3. Після розведення сперми через 20 *хв* ву відбирали пробу, в якій знаходилось 300 млн. активних спермій, кож визначали їх сумарну гіалуронідазну активність.

Решту сперми поступово охолоджували з швидкістю 0,5° за 1 *хв* до ператури 0—4° і витримували при цій же температурі протягом 5— *од* (період еквілібрації). Після еквілібрації відбирали для дослі- ення пробу сперми, в якій знаходилось також 300 млн. активних спер- з. Решту сперми заморожували в гранулах у спеціальному приборі видкістю 20—25° за 1 *хв* до температури — 80—100°, а потім зберіга- и при температурі — 196° у рідкому азоті. Розморожували сперму в конах у водяній бані при температурі +38—40° на 2—10-ту добу ія зберігання і визначали активність, враховуючи концентрацію, та бирали для дослідження пробу, яка мала 300 млн. активних спермій. а визначення гіалуронідазної активності відібраних проб сперми в жну пробу сперми додавали 5 *мл* 6-процентного розчину глюкози, трифугували при 6 тис. *об/хв* протягом 20 *хв*. Потім осад спермій чі промивали 6-процентним водним розчином глюкози. Після цього ожну пробу вносили по 2,5 *мл* такого ж розчину глюкози і убива- спермій швидким заморожуванням, поміщаючи пробірки в охоло- ений до —70—80° спирт. Охолодження спирту проводили рідким азо- , який має температуру кипіння —196°. Потім проводили розморожу- ня проб сперми. Заморожування і розморожування руйнувало ста- і клітини, оболонка їх розпадалась (контролювали люмінесцентною роскопією), і гіалуронідаза переходила в 6-процентний розчин глю- и.

Після розморожування проби сперми розмішували скляними палич- ми й центрифугували протягом 15 *хв* при 4,5—5 тис. *об/хв*. Центри- ат виливали в чисті пробірки і зберігали в холодильнику при темпе- урі 0—4°. До осаду додавали 2,5 *мл* 6-процентного водного розчину кози, перемішували і знову заморожували, а потім розморожували центрифугували. Цей процес повторювали двічі. Одержані центри- ати зливали в одну пробірку і зберігали при температурі 0—4°. У

осад сперміїв після другого центрифугування знову додавали 2,5 *мл* 6-процентного розчину глюкози, перемішували, заморожували і ставили на 14—16 *год* у холодильник (2—4°), де проходило поступове його розморожування та екстрагування залишків гіалуронідази. Потім проводили центрифугування при 4,5—5 тис. *об/хв*, і центрифугат зливали в пробірку, де вже зберігались попередні два центрифугати. Одержаний загальний центрифугат досліджували.

Для цього віскозиметр фіксували в дволітровій широкогорлій склянці і заливали звичайною водою температурою 20°. При цій температурі зручно проводити роботу, тому що в'язкість досліджуваної рідини ще досить висока і легко визначати початковий і кінцевий час проходження її через робочий капіляр віскозиметра.

Для визначення гіалуронідазної активності одержаного центрифугату сперміїв готували спеціальний субстрат. Брали 0,25 *мл* екстракту із сперміїв, додавали 0,25 *мл* цитратного буфера [1], pH якого дорівнювала 4,5—4,6, і вносили 1 *мл* 0,2-процентного розчину гіалуронової кислоти. Цю суміш швидко перемішували і вносили пастерівською піпеткою в робочий резервуарчик віскозиметра.

За допомогою секундоміра визначали час проходження вказаної суміші через капіляр віскозиметра, тобто від верхньої мітки, яка знаходиться вище робочого резервуарчика, до нижньої, розташованої при вході в капіляр. Потім за допомогою гумового балончика обережно під тиском повертали суміш у робочий резервуарчик віскозиметра і знову так же визначали час проходження суміші через капіляр віскозиметра. Так повторювали 6—8 раз, поки час проходження суміші через капіляр не ставав однаковим. Потрібно не допускати утворення повітряних пухирців у суміші, бо це погіршує наслідки досліджень.

Гіалуронідазну активність досліджуваного екстракту визначали за зниженням в'язкості гіалуронової кислоти гіалуронідазою сперміїв. Чим більша кількість гіалуронідази в екстракті, тим швидше понижується в'язкість гіалуронової кислоти, а значить, і менше часу потрібно для її проходження через капіляр.

Визначення гіалуронідазної активності проводили за Ю. В. Надточиним (1950) в умовних одиницях. Для цього від часу проходження суміші через капіляр на початку дослідження віднімали мінімальний показник часу цього ж кінцевого дослідження і ділили на різницю між часом проходження цієї суміші на початку дослідження і часом проходження такої ж суміші, але без додавання гіалуронової кислоти (холоста проба). Одержаний результаат множили на 100 і одержували показник гіалуронідазної активності в умовних одиницях. У результаті дослідження 25 проб сперми встановили, що гіалуронідазна активність сперміїв у свіжоодержаній спермі становила 76,6 умовної одиниці, через

[1] Цитратний буфер складається з 76 *мл* розчину А і 24 *мл* розчину В.

Розчин А готується так: беруть 2,1 *г* лимонної кислоти і додають 20 *мл* 1 *н.* розчину NaOH, доводячи до об'єму 100 *мл* дистильованою водою.

Розчин В являє собою 0,1 N розчин HCl.

?0 *хв* після розведення — 76,8, після 5—6-годинної еквілібрації при температурі 0—4° — 74,6 та після заморожування і збереження протягом ?—10 діб при температурі — 196° — 75,4 умовної одиниці.

З одержаних даних виходить, що гіалуронідазна активність спермііїв на різних етапах підготовки до заморожування, а також і після заморожування сперми залишається майже на одному рівні. Достовірної різниці між одержаними даними при опрацюванні матеріалів досліджень не виявлено.

Отже, гіалуронідазна активність спермііїв після глибокого заморожування практично не знижується, що свідчить про їх високу запліднювальну здатність.

ЗАПЛІДНЮВАЛЬНА ЗДАТНІСТЬ ЗАМОРОЖЕНОЇ СПЕРМИ БУГАЇВ

М. А. ДМИТРАШ,
кандидат біологічних наук

Київська дослідна станція тваринництва

У нашій країні застосовують в основному три способи заморожування сперми бугаїв: повільний — в скляних або поліетиленових ампулах, швидкий — в полістиролових трубочках (капілярах) та заморожування сперми в малих або великих гранулах.

В останній час найбільш поширився спосіб заморожування сперми у вигляді гранул. Це пояснюється тим, що технологія заморожування сперми в гранулах дуже проста, потребує незначної затрати часу і праці, а також невеликих ємкостей для зберігання запасів гранул. Крім того, заморожена в гранулах сперма після відтавання дає досить високу активність спермііїв і добру запліднювальну здатність.

За даними Г. Фроріпа (1968), заплідненість корів від першого осіменіння замороженою в гранулах спермою дорівнювала 61,1%, а за даними А. Филоненко (1968) — до 70%, причому заплідненість корів від осіменіння замороженою в гранулах спермою була на 8—10% вищою, ніж корів, яких осіменяли спермою, збереженою при температурі близько 0°.

У дослідах А. Песковського і Х. Хабібулліна (1968) заплідненість корів від першого осіменіння при осіменінні замороженою в малих та великих гранулах і повільним способом в ампулах спермою становила відповідно 73,2; 72 і 64%.

У трирічних (1963—1965 рр.) дослідженнях Ф. І. Осташка (1968)