

УДК 636.7:611.63:615.849.19

СПЕРМА ЖИВОТНЫХ В ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОМ КОНТРАСТЕ

Васильев В. С., к. б. н.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Лисиченко Н. Л., д. т. н., **Дорич О. В.**, магистр

Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства
им. П. Василенко

Исследовали морфофункциональные показатели спермиев животных и человека методами интерференционной микроскопии. Сухая масса головок спермиев быков в среднем была равна 8,67 пг, хряков – 8,78 пг, баранов – 8,39 пг, кобелей – 6,24 пг, петухов – 2,59 пг, индюков- 3,7 пг, мужчин- 7,26 пг. Вариабельность сухой массы головок спермиев была наименьшей для эякулятов высокого качества, а при коэффициентах вариаций от 7 до 18 % и выше сперма, как правило, выбраковывалась.

Ключевые слова: **контраст Номарского, ДНК, вариабельность, качество спермы.**

В пионерских работах Лебедева А. А.(1931), Varer R. (1952), Davies H.S. at al. (1952) были разработаны методы интерференционной микроскопии для проведения количественных измерений в биологических исследованиях [1, 2, 3]. Применение интерференционной микроскопии для изучения спермы быков позволило изучить морфологию спермиев с хорошим разрешением, высокой контрастностью, определить размеры, сухую массу головок спермиев, количество белков, ДНК в них и выявить связь данных количественных показателей с качеством, оплодотворяющей способностью спермы, плодовитостью животных [4]. Разработка и совершенствование методов интерференционной микроскопии для изучения спермы животных и человека, с целью оценки ее оплодотворяющей способности, весьма актуально.

Материал и методы исследований. Исследовали нативную и технологически обработанную (криоконсервация, лазерное облучение) сперму быков, хряков, баранов, других животных и птиц и, в сравнительном аспекте, сперму человека. Определяли традиционными методами объем, активность, концентрацию, цвет, биохимические и другие показатели, для спермы человека определяли число активно-подвижных, подвижных, местно-качающихся и неподвижных спермиев в каждом эякуляте [4, 5].

С помощью интерференционной микроскопии определяли частоту различных дефектов в строении спермиев, измеряли размеры, сухую массу головок спермиев, количество ДНК и белков в них [4]. Учитывались возраст, порода животных, влияние генотипических и фенотипических факторов на качество спермы. Воспроизводительные способности племенных быков оценивали по результатам оплодотворения коров после первого осеменения. Опыты проводились с 1972 года по настоящее время в ХГЗВА, Институте животноводства НААНУ, ХНТУСХ, ИКИК НАНУ, Харьковской госплемстанции, Новосибирском сельскохозяйственном институте и др. предприятиях. Результаты измерений обрабатывали общепринятыми статистическими методами с помощью программного обеспечения MATCAD, Exel и Maple-12.



Результаты исследований. При исследовании спермы животных наиболее информативными показателями ее качества и оплодотворяющей способности являются не только подвижность спермиев, концентрация, но и целостность структуры клеток, количество ДНК, белков в головках спермиев. Обычный световой микроскоп не позволяет с хорошей контрастностью наблюдать живые неокрашенные клетки. Для объективного исследования морфологии клеток спермы, измерения размеров, сухой массы спермиев, количества ДНК, белков в головках спермиев, лучше всего, как было показано в наших работах [4, 5], использовать дифференциальный интерференционный контраст (контраст Номарского или ДИК) и метод большого раздвоения изображений в однородном интерференционном поле микроскопа МРІ-5 (метод Плюте-Номарского). Хорошие условия для наблюдения под микроскопом образцов нативной или технологически обработанной спермы, мазков спермы создает ДИК при увеличении в 200 – 1000 раз в однородном интерференционном сером, желто-коричневом, голубом и других цветах. На рис. 1 представлено изображение образца размороженной криоконсервированной спермы быка в ДИК на сером фоне. Небольшое раздвоение изображений в доли микрометра, создает стереоэффект, оттеняющий изображение каждой клетки и позволяющий с хорошей контрастностью изучать нормальные и патологические формы спермиев. Изображение, представленное на рисунке, получено с помощью цифровой камеры Lumix DMC-FX07.

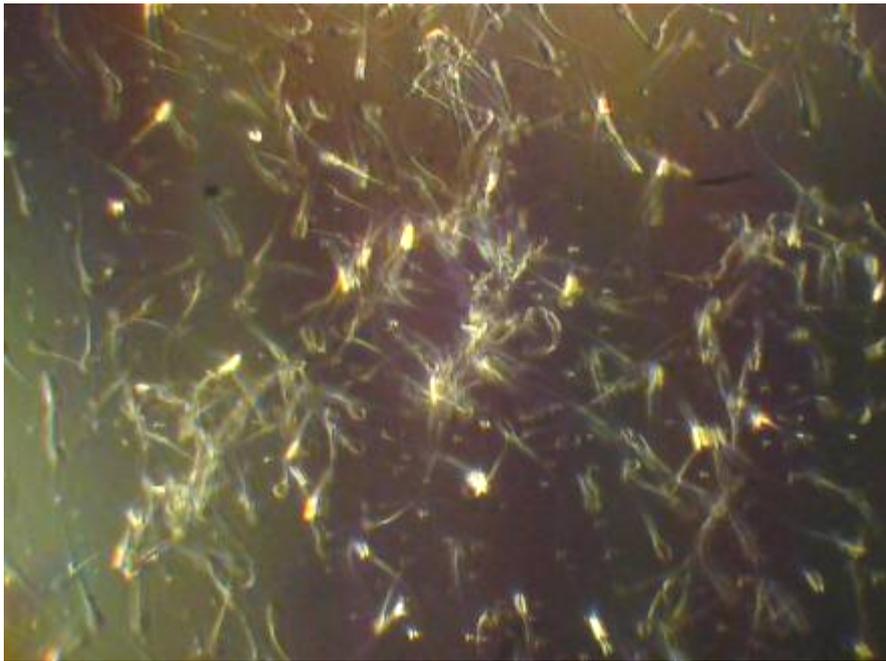


Рис. 1. Изображение спермиев быка в дифференциальном интерференционном контрасте на черном фоне.

На рис. 2 представлено изображение размороженной спермы быка в однородном светло-сером интерференционном цвете с большим раздвоением. Раздвоенные изображения клеток имеют противоположные сдвиги фаз световых волн, прошедших через спермии, по сравнению с фоном и разность фаз тем больше, чем больше концентрация вещества и толщина частей клеток. Точность измерения сдвига фазы составляет около 1 нм, что позволяет определять сухую массу головок и других частей спермиев с погрешностью в 0,2 пг [4]. Разработанные ко-



личественные методы интерференционной микроскопии позволяют измерять размеры клеток с высокой точностью, определять сухую массу отдельных частей спермиев и более объективно, чем с помощью обычного светового микроскопа, оценивать активность спермы. Цифровая обработка интерференционных изображений клеток с помощью оригинального программного обеспечения позволяет хранить информацию на цифровых носителях и использовать в научных и производственных целях [6].



Рис. 2. Раздвоенные изображения спермиев быка в однородном светло-сером интерференционном поле.

Проведенный анализ взаимосвязи воспроизводительной способности быков разных пород, содержащихся на Харьковской госплемстанции (1974-1980 гг.), с количественными показателями спермы, сухой массой головок спермиев, количеством ДНК и белков в них показал определенные закономерности. Наибольшей плодовитостью обладали быки, в спермиях которых содержалось от 2,7 до 2,9 пг ДНК. С уменьшением уровня ДНК в спермиях от 2,70 до 1,85 пг оплодотворяемость коров, осемененных такой спермой, достоверно снижалась в среднем с 47 % до 27 %. С ростом количества ДНК в головках спермиев, выше среднего уровня (2,94 пг), наблюдалось также снижение оплодотворяющей способности спермы [7, 8].

Сухая масса головок спермиев пропорциональна количеству ДНК и, по нашим данным, коэффициент корреляции для этих показателей достаточно высокий и равен 0,690. Поэтому для определения плодовитости животных, в некоторых случаях, достаточно измерение количества сухого вещества в головках спермиев. Сухая масса головок спермиев, измеренная методом интерференционного однородного поля с большим раздвоением, для 129 исследованных быков в среднем равнялась 8,67 пг с рассеянием (дисперсией) от 7,61 до 9,93 пг; для 26 хряков – 8,78 пг (7,1 – 9,3 пг); для 12 баранов – 8,39 пг (7,4 – 8,9 пг); для 15 кобелей – 6,24 пг (5,3 – 7,2 пг); для 5 петухов – 2,59 пг (1,9 – 3,4 пг); для 6 индюков – 3,7 пг (2,4 – 4,6 пг); для 87 мужчин – 7,26 пг (5,8 – 8,7 пг). Средние показатели



количества ДНК и сухой массы головок спермиев для каждого вида исследованных животных и мужчин, по нашему мнению, являются наиболее оптимальными величинами характеризующими высокую плодовитость самцов и оплодотворяющую способность спермы.

Вариабельность сухой массы головок спермиев также может характеризовать качество спермы. Результаты экспериментов показали, что в исследованных эякулятах быков коэффициенты вариаций сухой массы головок спермиев были в пределах от 2,6 % до 18,3 % и характеризовали качество спермы, поскольку, чем больше дефектов структуры клеток, тем выше вариабельность количественных показателей, тем хуже сперма [6]. Аналогичные закономерности наблюдались и для спермы других животных и человека [7].

Коэффициент вариабельности сухой массы головок спермиев является интегральным показателем качества спермы и пропорционален частоте дефектов спермиев в эякуляте, поскольку различные дефекты увеличивают дисперсию размеров и сухой массы клеток. Для 101 исследованного быка найдено, что с увеличением коэффициента вариации сухой массы головок спермиев увеличивается и брак спермы по активности и концентрации (рис. 3). Коэффициент корреляции между вариабельностью сухой массы головок спермиев и процентом брака, по нашим данным, достаточно высокий и равен 0,742. Спермии из эякулятов высокого качества, как узкоспециализированные клетки, имеют невысокие коэффициенты вариаций сухой массы головок: от 2,6 до 6 %. Более высокая вариабельность, как правило, связана с большой частотой различных дефектов в строении спермиев, несоответствием режимов использования, содержания и кормления животных с физиологическими нормами, с аномальным сперматогенезом и другими причинами. Большая часть исследованных быков с высокой вариабельностью сухой массы спермиев была выбракована из-за низкого качества спермы.

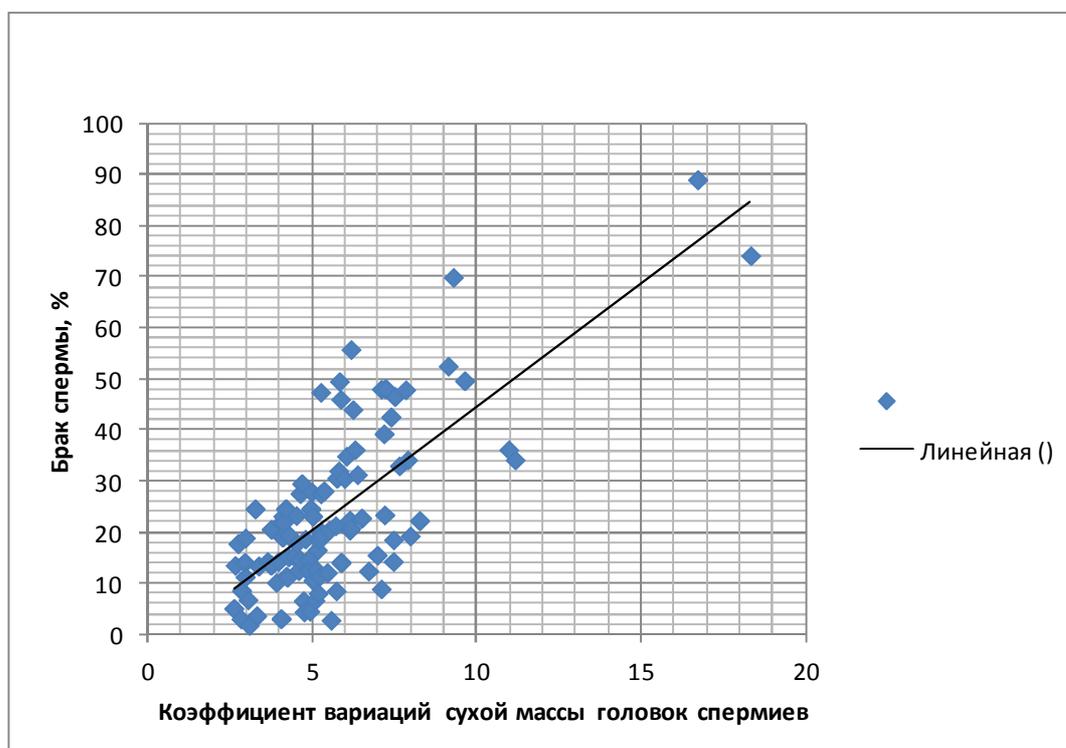


Рис. 3. Взаимосвязь брака спермы с вариациями сухой массы головок спермиев.



Детальный анализ спермограмм показал, что с помощью ДИК и метода однородного интерференционного поля с большим раздвоением, под интерференционным микроскопом можно наблюдать неокрашенные мазки спермы или живые клетки и определять дефекты спермиев с оптическим разрешением порядка 0,3 мкм. В интерференционном микроскопе различимы дефекты спермиев, классифицируемые по Э.Блону [9]: мажорные дефекты – дегенеративные, двойные формы, пуговичная акросома, подвижный отдельный хвост, диадема головки, грушеобразные головки, зауженное основание, аномальный контур, маленькие аномальные головки, отдельные патологические головки, штопорообразный митохондриальный чехлик, укороченная средняя часть, проксимальная капелька, псевдокапелька, Даг- дефект; минорные – узкие головки, маленькие нормальные головки, гигантские и широкие короткие головки, отдельные нормальные головки, не осевое прикрепление, дистальная капелька, простой излом хвоста, кольцеобразный хвост. В эякулятах могут присутствовать эпителиальные клетки, эритроциты, лейкоциты и другие. Кроме этого, в интерференционном контрасте дополнительно разрешаются дефекты: неравномерное распределение хроматинового материала в головках, мембран акросомы, шейки, средней части и другие.

На рис. 4 представлено изображение мазка нативной спермы хряка в ДИК в сером интерференционном цвете. В центре снимка спермий имеет дефект головки и митохондриальный чехлик сдвинут к дистальной части хвоста. Повышенная частота таких дефектов и высокий коэффициент вариабельности сухой массы ($Cv=13,6\%$) головок спермиев в данном эякуляте хряка указывает на определенные аномалии сперматогенеза и низкое качество спермы.

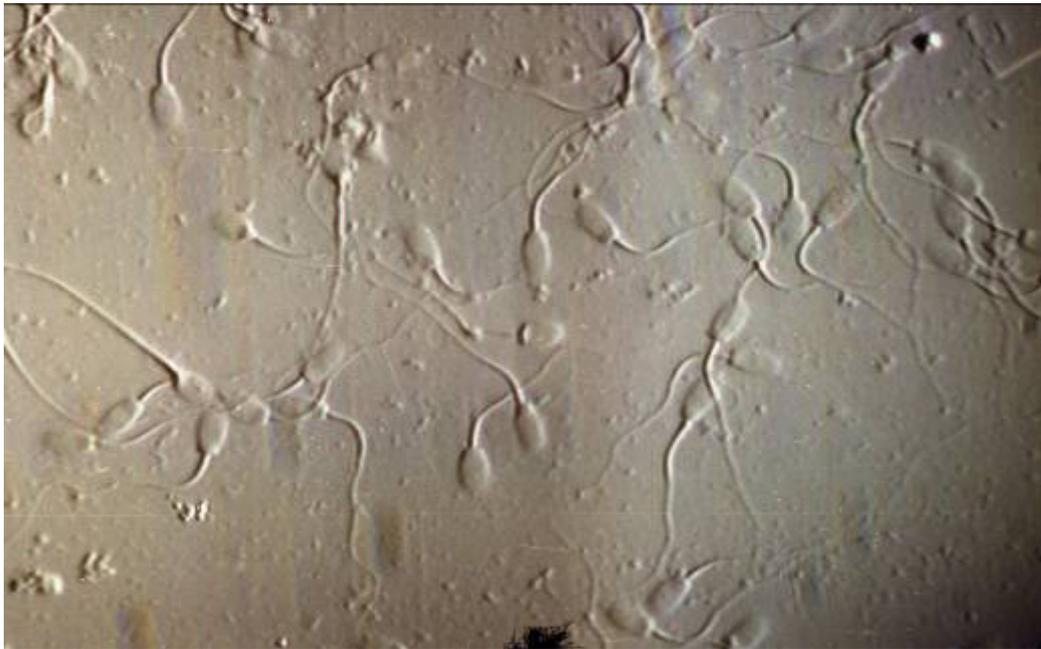


Рис. 4. Сперма хряка в ДИК на сером фоне, некоторые спермии имеют дефекты головок и средней части.

Таким образом, коэффициент вариабельности сухой массы головок спермиев является фактически интегральным показателем всей суммы различных дефектов половых клеток в эякуляте и дает информацию о норме или патологии сперматогенеза.



На рис. 5 представлены раздвоенные изображения спермиев из эякулята хряка, обладающего низкой плодовитостью. В эякуляте множество отдельных головок и хвостов с характерным дефектом строения «псевдо капелька». Этот дефект характеризуется тем, что на дистальном конце средней части некоторых спермиев нарушена структура центральных фибрилл, в результате чего наблюдается излом средней части и накручивание хвоста на тело с отрывом головки. После эякуляции спермы, в процессе технологической обработки и хранения, частота таких дефектов увеличивается.

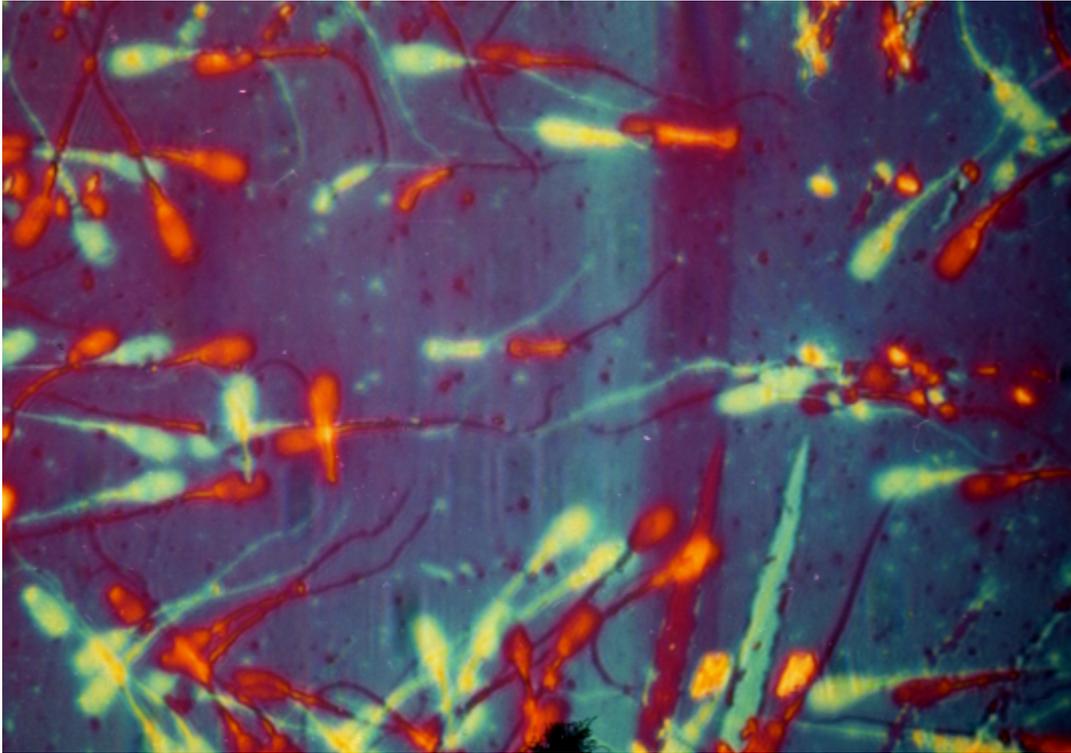


Рис. 5. Раздвоенные изображения спермиев хряков в однородном индиго-пурпурном цвете.

При облучении проб спермы электромагнитными волнами подвижность спермиев повышалась в тех случаях, когда начальная активность спермы была пониженной по сравнению с нормой. Облучение спермы до замораживания не улучшало ни подвижности спермиев, ни их оплодотворяющей способности. Реабилитирующее действие лазерного и микроволнового излучений проявлялось при воздействии на размороженную сперму – эффект был более выражен для проб с низким качеством спермы. Морфология спермиев после облучения не изменялась [10].

Выводы:

1. Методы интерференционной микроскопии позволяют с хорошей измерением размеров клеток, определять сухую массу, количество ДНК, контрастностью и высоким разрешением производить количественные белков в них, наблюдать и дифференцировать различные дефекты строения спермиев.
2. Оплодотворяющая способность спермы зависит от сухой массы головок спермиев, количества ДНК в них, целостности структур клеток, а коэффициент



варіацій сухої маси головок спермиев можна використовувати як критерій якості сперми.

Бібліографічний список

1. Лебедев А. А. Поляризационный интерферометр / А. А. Лебедев // Труды ГОИ, 1931, – Т. 5, Вып. 53. – С. 1–31.
2. Barer R. Interference microscopy and mass determination. – Nature, 1952. Т. 169. – Р. 366.
3. Davies H. G., Wilkins M. Interference microscopy and mass determination. – Nature, 1952, Т. 169, – Р. 541.
4. Васильев В. С. Совершенствование методов интерференционной микроскопии для изучения спермы в зависимости от породы, возраста и плодовитости быков: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.13 / НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР. – Х., 1978. – 24 с.
5. Васильев В. С. Эффективность селекции подвижных спермиев из эякулята человека в зависимости от их морфометрических показателей до и после воздействия гипотермии и криоконсервации при разных состояниях сперматогенеза/ В. С. Васильев, Г. Г. Юрченко, М. Й. Крамар, Н. Н. Чуб, Л. И. Луцкая.// Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. /ХНАУ; ХГЗВА. – Х., 2009. – С.131 – 139.
6. Васильев В. С. Спермограмма как показатель качества спермы./ В. С. Васильев // Підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин: Зб. наук. праць / ХНАУ; ХЗВІ. – Х., 2001. – 126 с.
7. Васильев В. С. Оценка количества «мусорной» ДНК в спермиях животных методами интерференционной микроскопии./ В. С. Васильев, Я. П. Раковский, Н. Л. Лисиченко, А. А. Беликов //Науковий вісник НУБП України. – К., 2011. – Вип. 160. – Ч.2 . – С.281 – 285.
8. Васильев В. С. Количество ДНК в спермиях быков и оплодотворяемость коров. / В. С. Васильев, А. М. Хохлов, О. В. Васильева // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. НАН України. –К.: Логос, 2012. – Т.3. – С. 228 – 232.
9. Blom E. Sperm morphology with reference to bull infertility//First All-Indian Symp. Anim. Rehod. Ludhiana. 1977. – Р. 61 – 81.
10. Васильев В. С. Интерференционная микроскопия облученной спермы. / В. С. Васильев, Л. И. Васильева, Н. Л. Лисиченко, М. Й. Крамар, Г. Г. Юрченко // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. 15 / ХНАУ; ХГЗВА. – Х., 2005. – С. 157 – 160.

СПЕРМА ТВАРИН В ІНТЕРФЕРЕНЦІЙНОМУ КОНТРАСТІ

Васильєв В. С., Харківська державна зооветеринарна академія

Лисиченко Н. Л., Дорич О. В., Харківський національний технічний університет сільського господарства, м. Харків

Досліджували морфофункціональні показники сперміїв тварин і людини методами інтерференційної мікроскопії. Суха маса головок сперміїв бугаїв у середньому дорівнює 8,67 нг, кнурів – 8,78 нг, баранів – 8,39 нг, кобелів – 6,24 нг, півнів – 2,59 нг, індиків – 3,7 нг, чоловіків – 7,26 нг. Варіабельність сухої маси головок сперміїв була найменшою для еякулятів високої якості, а при коефіцієнтах варіацій від 7 до 18 % і вище сперму, як правило, вибраковують.

Ключові слова: контраст Номарського, ДНК, варіабельність, якість сперми.



THE SPERM OF THE ANIMALES IN INTERFERENCE CONTRAST

V. Vasiliev, Kharkov State Zooveterinary Academy

N. Lisichenko, O. Dorich, Vasilenko Kharkov National Technical University of Agriculture

Morphological and functional indices of animal and human spermatozoa were investigated with the help of microscopy interference. Mean value of dry mass of the head of spermatozoa of bull's is 8,67 pg, of boars – 8,78 pg, of rams – 8,39 pg, of dogs – 6,24 pg, of cocks – 2,59 pg, of turkey-cocks – 3,7 pg, of men – 7,26 pg. The variability of the dry mass of sperm heads was the lowest for high quality ejaculates, while the coefficient of variation of 7 to 18 % and higher sperm is usually discarded.

Key words: Nomarsk contrast, DNA, variability, quality of sperm.

УДК 636.1.083.38-027.15

**ДИНАМІКА ЛІНІЙНОГО РОСТУ І РОБОТОЗДАТНОСТІ
ЖЕРЕБЦІВ ОРЛОВСЬКОЇ РИСИСТОЇ ПОРОДИ ВІТЧИЗНЯНОЇ
СЕЛЕКЦІЇ**

Глушак І. І., к. с.-г. н.

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Із врахуванням заводських ліній, вікового критерію вивчено динаміку жвавості, лінійного росту та кореляцію даних селекційних показників. Доведено, що за даними обхвату п'ястку все дво- і трирічне поголів'я характеризувалось на рівні стандарту породи. Доказано, що дослідне поголів'я за обхватом грудей поступалося вимогам стандарту породи, а саме: дворічне від 3,3 см (л. Барчука 2.12,0) до 7,4 см (л. Піона 2.00,1) та трирічне від 2,5 см (л. Барчука 2.12,0) до 6,2 см (л. Піона 2.00,1).

Для покращення жвавості і лінійного росту майбутніх поколінь л. Піона 2.00,1 потрібно у підборі не планувати збільшення за обхватом п'ястку, а покращити дані промірів косої довжини тулубу і обхвату грудей.

Ключові слова: жеребці, екстер'єр, іподром, лінія, жвавість, стандарт, промір, орловська порода.

За останні 6 років популярність розведення і використання орловської популяції коней в Україні підтверджується збільшенням кількості як суб'єктів племінної справи, так і племінного поголів'я. На початок 2014 року, від загальної кількості племінних коней в Україні, частина чистопородного поголів'я орловської рисистої породи коней збільшилась на 3,6 % і становить 19,2 % [1, 5].

Відомо, що на сьогодні для племінного поголів'я орловської популяції, від дворічного до старшого віку, основною селекційною ознакою є жвавість. Одним із головних факторів покращення основної роботоздатності є відбір племінного поголів'я, що потенційно може успадкувати дані основних селекційних ознак від своїх предків.

У наукових роботах питання селекційного процесу відбору кращого поголів'я розглядалось із врахуванням даних лінійного росту, жвавості та скороспілості [2, 3].

Проте дослідження закінчувались визначенням кращого поголів'я за лінійною належністю, а за яких факторів взаємозв'язку, особливо з врахуванням дина-