

УДК: 619: 618.19:636

ОЦІНКА ЯКОСТІ СПЕРМИ У БУГАЇВ ЗА МЕТОДОМ РІЗКОЇ ЗМІНИ ОСМОТИЧНОГО ТИСКУ**САМОЙЛЮК В.В.** к. вет. н., доцент
БУРОВ В.О. к. біол. н., ст. наук. спів.
НАЗАРЕЦЬ А.О. магістрДніпропетровський державний аграрно-
економічний університет
м. Дніпропетровськ

Встановлено, що підвищення температури середовища посилює рух спермій, зниження – послаблює їх рух та скорочує термін життєздатності. Найкраще спермії зберігають свою життєздатність за температури від 0 до 15°C. Розсіяне сонячне світло не має суттєвого шкідливого впливу на життєдіяльність спермій. Прямі сонячні промені викликають їх загибель протягом 20 – 30 хвилин. Різка зміна осмотичного тиску є згубною для сперматозоїдів. Гіпотонічні розчини та звичайна вода вбивають сперміїв. В гіпертонічному розчині кухонної солі спермії також гинуть. Нормально свою життєздатність спермії зберігають лише в ізотонічному розчині. Гіпертонічний розчин спермії переносять легше ніж гіпотонічний. Завдяки новому способу оцінки сперми різкої зміни осмотичного тиску можна отримати більш точні результати, так як є можливість диференціювати кінцеві показники і після дослідження залишається підтверджуючий матеріал – зафіксований препарат

Оцінка якості сперми, спермії, спосіб оцінки сперми, зафіксований препарат

Постановка проблеми. В практиці штучного запліднення існують два основні види методів оцінки сперми. Це оцінка сперми для дослідження плодовитості або безплідності самця та оцінка сперми з метою визначення ступеня придатності конкретного еякуляту для штучного запліднення. Методи дослідження якості сперми включають питання запліднючої здатності і загальної санітарної оцінки. Частіше обмежуються дослідженнями об'єму еякуляту, визначенням концентрації живчиків, активності сперми, її резистентності та підрахунком форм живчиків з відхиленнями.

В інших випадках під час оцінки придатності для штучного запліднення конкретного еякуляту потрібні перш за все методи, що дають швидку відповідь. Найбільш цінним у цьому відношенні показником запліднючої здатності сперми бугая є кількість живчиків в спермі та відсоток живих сперматозоїдів, а також ступінь їх активності (рухливості). Для цього визначають концентрацію живчиків та відсоток мертвих статевих клітин.

В сумнівних випадках проводять оцінку шляхом бактеріологічних посівів. Крім цього, оцінюють запліднючу здатність сперми, визначають кількість сперматозоїдів в 1 мм кубі-

чному сперми. Крім об'єктивних методів визначення концентрації сперматозоїдів в практиці застосовують також і суб'єктивні [2, 3].

Визначають також морфологічні і фізіологічні властивості сперматозоїдів. До морфологічних методів відносять вимірювання живчиків та вивчення їх форм. До фізіологічних методів відносять оцінку спермій за видами руху, підрахунок живих і мертвих живчиків, визначення їх резистентності та здатності виживати поза організмом. До біохімічних методів відносять вимірювання рН, дихання, дегідративної активності та гліколізу.

На сьогодні оцінку якості сперми проводять за густиною і рухливістю спермій. За класичним способом визначення якості сперми, який широко використовується на практиці, оцінку проводять під мікроскопом (збільшення 120-300 раз за t^0 38 – 40 °C) за 10-ти бальною шкалою [4]. Кожен бал дорівнює 10% спермій, що мають прямолінійно-поступальні рухи. Але оцінка сперми за цим методом є досить суб'єктивною та трудомісткою, тому для контролю під час проведення наукових досліджень додатково визначають кількість живих і мертвих спермій.

Інший спосіб визначення активності сперми полягає в тому, що проводять вимірювання на

мікролінійці відстані яку пробіжить спермій (20 мкм.) за певну одиницю часу – оцінка якості за швидкістю руху [6]. Але цей метод є також досить трудомістким і суб'єктивним та не знайшов широкого застосування в практиці.

Вагомим недоліком обох способів є те, що похибка може досягати 20% і більше. Крім того, після проведення дослідження не залишається підтверджуючого матеріалу.

Автори повідомляють, що вивчити і проаналізувати сперматогенез можна як це проводиться в медичній діагностиці шляхом морфологічного і цитологічного аналізу біоптатів сім'яника [1].

За даними літературних джерел, необхідною умовою нормальної життєздатності сперматозоїдів є певний осмотичний тиск середовища, що залежить від концентрації того чи іншого розчину [3, 5, 7]. Осмотичний тиск середовища повинен бути таким, щоб він повністю урівноважував внутрішній осмотичний тиск спермія. В чистій воді сперматозоїди миттєво гинуть і їх загибель супроводжується закручуванням хвостиків. Саме цей факт і став основою розробки нового методу оцінки якості сперми.

Таким чином, на пунктах штучного запліднення оцінюють лише швидкість руху сперміїв. В залежності від насиченості статевими клітинами нерозбавлена сперма також може мати наступні оцінки – густа, середня і рідка. Кінцеву оцінку сперми здійснюють за двома показниками – густиною і рухливістю.

У зв'язку з цим, розробка нових ефективних методів оцінки якості сперми у бугаїв є достатньо актуальною задачею.

Мета роботи. Розробити об'єктивний спосіб визначення якості сперми за різкою зміною осмотичного тиску та з'ясувати його ефективність.

Матеріал і методи дослідження. Для з'ясування ефективності розробленого способу були проведені досліди на Дніпропетровській племінній станції з використанням замороженої розбавленої сперми бугаїв-плідників та в умовах селянського фермерського господарства "МЮД" Юр'ївського району Дніпропетровської області.

Оцінка сперми проводилася загальноприйнятим класичним (за 10-ти бальною шкалою)

та новим розробленим способом, а також методом визначення відсотка живих і мертвих сперміїв методом диференційованого фарбування.

За класичним способом визначення якості сперми оцінку проводять під мікроскопом (збільшення 120-300 раз за $t^{\circ} 38 - 40^{\circ}C$) за 10-ти бальною шкалою. Кожен бал дорівнює 10% сперміїв, що мають прямолінійно-поступальні рухи. На тепле предметне скельце, розміщене в термостаті наносили краплю сперми і краплю розріджувача, накривали покривним скельцем і переглядали не менш ніж в трьох полях зору.

Для визначення проценту живих і мертвих сперміїв на край знежиреного предметного скла піпеткою або скляною паличкою наносили невелику краплю сперми та 2-3 краплі розчину еозину, який готували на 3 %-ному розчині цитрату натрію. Краплі швидко перемішували і з суміші робили тонкий мазок на предметному склі, який швидко підсушували.

Спермії, що знаходилися в ізотонічному середовищі ми поступово підігрівали від 0 до $50^{\circ}C$. та спостерігали під мікроскопом за інтенсивністю їх руху і таким чином, аналізували вплив температури на спермії. Також спермії різко охолоджували у морозильній камері при $17^{\circ}C$. Потім її відтаювали та визначали життєздатність сперматозоїдів. Сперму також залишали під впливом розсіяного світла та прямих сонячних променів.

Після оцінки сперми за 10-ти бальною шкалою, до неї додавали гіпотонічний розчин, звичайну воду, гіпертонічний розчин. В цей час спостерігали за дією розчинів на спермії та особливу увагу звертали на стан їх хвостиків. На добу (термін спостереження) сперматозоїди поміщали в такі розчини, як 0,2% і 2% NaCl, а також в 0,8% і 1,0 % розчин NaCl. Потім перевіряли їх життєздатність.

Результати досліджень та їх аналіз. Встановлено, що температура впливає на спермії таким чином. Підвищення температури посилює рух сперміїв, зниження – послабляє їх рух та скорочує термін виживаємості. За нашими спостереженнями, температура тіла ($37-40^{\circ}$) приводить спермії в стан високої активності, але вони швидко розтрачують свої ресурси і гинуть. Підвищення температури до $47^{\circ}C$ при-

зводить до загибелі сперміїв. Найкраще спермії зберігаються при температурі від 0 до 15°С.

Коли ми поміщали спермії в середовище з температурою 5°С, вони ставали малорухливими або не рухалися. Під час поступового нагрівання сперми до 10°С і вище їх рух ставав все більш інтенсивним. Максимальний рух був відмічений під час температури 40°С. Це свідчить про те, що інтенсивність руху сперміїв залежить від температури середовища в якому вони знаходяться. Але висока температура скорочує життя сперміїв. Коли ж ми різко охолоджували спермії у морозильній камері, то у них наставав температурний шок. Коли цю сперму відтаювали, було встановлено, що сперматозоїди загинули.

Розсіяне світло не має суттєвого шкідливого впливу на життєдіяльність сперміїв. Прямі сонячні промені викликають їх загибель протягом 20 – 30 хвилин. Можливо, негативний вплив сонячних променів пов'язаний з дією ультрафіолетового їх спектра та термічною дією інфрачервоних променів. У зв'язку з цим, роботу з спермою слід проводити в приміщеннях з завішеними вікнами або в повністю закритих.

Коли ми поміщали спермії в гіпотонічні розчини або звичайну воду, вони гинули. В цей час їх хвостики скручувалися кільцем або напівкільцем. В гіпертонічному розчині кухарської солі спермії також гинули, але вже від зневоднення. Їх хвостики мали зигзагоподібну форму. Все це свідчить про те, що різка зміна осмотичного тиску є згубною для сперматозоїдів. Нормально свою життєздатність спермії зберігали лише в ізотонічному розчині. Слід відмітити, що гіпертонічний розчин спермії

переносили легше ніж гіпотонічний.

Цікавим є той факт, що спермії яким різко змінювали тиск до гіпертонічного 2% розчину NaCl гинули, а під час постійного доведення розчину до такої ж концентрації, залишалися на деякий час рухливими і поновлювали рухливість в ізотонічному середовищі.

Гіпертонічні розчини невисокої концентрації переносилися сперматозоїдами. Гіпертонічні і гіпотонічні розчини не вбивали усіх сперміїв. Поодинокі сперматозоїди переносили перебування до доби (термін спостереження) в таких розчинах як 0,2% і 2% NaCl. Під час таких невеликих відхилень від ізотонії як 0,8% і 1,2% розчину NaCl активність сперматозоїдів майже не знижувалася. Наші спостереження узгоджуються з даними літературних джерел [2, 3].

Вважаємо, що слід суворо слідкувати за тим, щоб усі розчини які використовуються для роботи з спермою були ізотонічними і особливо щоб сперма не мала контакту з водою яка діє на них згубно.

Розроблений нами спосіб оцінки якості сперми полягає в тому, що сперма наноситься на предметне скельце при t 38-40°С, і перед оцінкою розбавляється дистильованою водою, яка викликає загибель сперміїв за рахунок різниці осмотичного тиску. В цей час живі спермії закручують хвостики тим інтенсивніше, чим більш фізіологічно повноцінною була статеві клітина. Потім, за формою закручування хвостиків під мікроскопом підраховують кількість добрих, задовільних і незадовільних фізіологічно сперматозоїдів, а також мертвих, що мають ламану або пряму форму.

Результати порівняльного вивчення нового

Таблиця. Результати визначення якості сперми різними способами

Спосіб визначення якості сперми	Кількість проб	Показники якості сперми, (%)			Наявність матеріалу, що підтверджує результати досліджень
		добра	задовільна	незадовільна	
Активність під мікроскопом	10	80,0	-	20,0	-
Живі і мертві	10	80,0	-	20,0	10
Новий спосіб	10	50,0	30,0	20,0	10

способу з класичними надано в табл. 1. Ці дослідження існуючих сьогодні методів визначення фізіологічної повноцінності сперміїв (активність під мікроскопом; живі та мертві спермії) і запропонованого нового способу, показали, що спосіб визначення якості сперми методом різкої зміни осмотичного тиску дає можливість отримати більш точні результати дослідження, так як можна диференціювати кінцеві показники за трьома величинами: добра, задовільна та незадовільна.

В той же час, загальноприйняті методи дозволяють провести оцінку тільки за двома показниками: добра та незадовільна. Крім того, новий метод дозволяє залишити зафіксований препарат, що підтверджує результати досліджень і який завжди можна перевірити в майбутньому, бо є можливість зберігати даний препарат необмежений час. Завдяки новому способу можна також отримати більш точні результати досліджень порівняно з класичними методами.

Крім цього, для здійснення дослідження новим способом потрібно менше обладнання та на його виконання необхідно менше затрат праці і часу, а також без додаткових досліджень за допомогою розробленого способу можна визначити вміст патологічних форм сперміїв.

Висновки.

1. Підвищення температури середовища посилює рух сперміїв, зниження – послаблює їх

рух та скорочує термін життєздатності. Температура тіла (36 – 40°) приводить спермії в стан високої активності, але вони швидко гинуть. Підвищення температури до 47°С призводить до загибелі сперміїв. Найкраще спермії зберігаються за температури від 0 до 15°С. Розсіяне світло не має суттєвого шкідливого впливу на життєдіяльність сперміїв. Прямі сонячні промені викликають їх загибель протягом 20 – 30 хвилин.

2. Різка зміна осмотичного тиску є згубною для сперматозоїдів. Гіпотонічні розчини та звичайна вода вбивають сперміїв. В гіпертонічному розчині кухонної солі спермії також гинуть, але вже від зневоднення. Все це свідчить про те, що нормально свою життєздатність спермії зберігають лише в ізотонічному розчині. Гіпертонічний розчин спермії переносять легше ніж гіпотонічний.

3. Новий спосіб оцінки сперми з різкою зміною осмотичного тиску дає можливість отримати більш точні результати, так як є можливість диференціювати кінцеві показники. Важливим є також те, що після дослідження залишається підтверджуючий матеріал – зафіксований препарат.

Перспективи подальших пошуків. На перспективу планується проведення досліджень з визначення ефективності оцінки якості сперми методом різкої зміни осмотичного тиску у інших видів сільськогосподарських тварин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дзіцюк В. В. Цитогенетична оцінка плідників / В.В. Дзіцюк // – Тваринництво України. – №10. – 2008. – С. 6 – 9.
2. Максудов Г. Ю. Оценка качества семени животных. / Г. Ю. Максудов, В.А. Артющкова, Е. В. Трошко. – Пушино, 1987. – 42 с
3. Милованов В. К. Биология воспроизведения искусственного осеменения животных / В. К. Милованов. – М. – 1962, – 695 с.
4. Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / [Шипилов В. С., Зверева Г. В., Родин И. И., Никитин В.Я.]. – М.: – Агропромиздат, 1988. – 335 с.
5. Студенцов А. П. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения / А.П. Студенцов, В. С. Шипилов, В. Я. Никитин, М. Г. Миролюбов [и др.] // М.: Колос, 2000. – 494 с.
6. Яблонський В.А. Практичне акушерство, гинекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В. А. Яблонський – К.: Мета, 2002 р. – 319 с
7. Яблонський В. А. Ветеринарне акушерство, гинекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / А.В. Яблонський, С. П. Хомин, Г.М. Калиновський, Г. Г. Харута [та ін.] // Вінниця: Нова книга, 2008. – 600 с.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ У БЫКОВ МЕТОДОМ РЕЗКОЙ СМЕНЫ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ

Самойлюк В. В., Буров В. А., Назарец А. А.

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепропетровск

Установлено, что повышение температуры среды усиливает движение сперматозоидов, снижение – ослабляет их движение и сокращает время выживаемости. Лучшие всего спермии сохраняют свою жизнеспособность при температуре от 0 до 15°C. Рассеянный солнечный свет не имеет значительного влияния на жизнеспособность сперматозоидов. Прямые солнечные лучи вызывают их гибель на протяжении 20 – 30 минут. Резкая смена осмотического давления действует на спермии губительно. Гипотонические растворы и обычная вода убивают спермии. В гипертоническом растворе поваренной соли спермии тоже гибнут. Нормально свою жизнеспособность спермии могут сохранять только в изотоническом растворе. Гипертонический раствор сперматозоиды переносят лучше чем гипотонический. Благодаря новому способу оценки спермы за резкой сменой осмотического давления можно получить более точные результаты, так как есть возможность дифференцировать конечные показатели и после исследования остается подтверждающий материал – зафиксированный препарат

Оценка качества спермы, спермии, способ оценки спермы, зафиксированный препарат

ESTIMATION OF QUALITY OF SPERM FOR BULLS BY METHOD OF CHANGING OF OSMOLALITY

V. Samoylyuk, V. Burov, A. Nazarets

Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University

It is set that the increase of temperature of environment strengthens motion of spermatozoa, decline – weakens their motion and abbreviates time of survivability. The best of all spermatozoa save the viability at a temperature from 0 to 15°C. the Dissipated sunlight does not have considerable influence on viability of spermatozoa. Direct sunbeams cause their death during 20 – 30 minutes. The sharp changing of osmolality operates on spermatozoa of ruinously.

Hypotonic solutions and ordinary water kill spermatozoa. In hypertensive solution of kitchen salt better sperm transfer. Normally the viability spermatozoa can save only in physiological solution. Hypertensive solution spermatozoa carry better what hypotonic. Due to the new method of estimation of sperm after the sharp changing of osmolality it is possible to get more exact results, because there is possibility to differentiate eventual indexes and after research there is confirmative material - fixed preparation

Estimation of quality of sperm, spermatozoa, method of estimation of sperm, fixed preparation
