

змогу продовжити термін їхньої життєздатності з рухливістю не менше 5 балів від трьох до п'яти діб без істотного зниження запліднювальної здатності. Це дає можливість повністю використовувати розріджену сперму бугаїв-плідників.

3. Спосіб штучного гіпобіозу сперми бугаїв може бути з успіхом використаний в умовах маршрутно-кільцевої системи організації штучного осіменіння корів і телиць.

1. *Милованов В.К.* Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных. — М.: Изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1962. — 696 с.

2. *Осташко Ф.И.* Длительное хранение спермы производителей сельскохозяйственных животных в замороженном состоянии. — М.: Сельхозиздат, 1962. — 28 с.

3. *Смирнов И.В., Поставная И.В.* Хранение семени быков посредством инактивации живчиков угольной кислотой // Доклады советских ученых к 5-му Международному конгрессу по биологии воспроизведения и искусственного осеменения животных. — 1964. — С. 31 — 34.

Інститут розведення і генетики тварин УААН

Національний аграрний університет

УДК 636.082.453.53

М.П. ЖУРАВЕЛЬ

ВПЛИВ ГІПООСМОЛЯРНСТІ НА ХАРАКТЕР І МЕХАНІЗМ УШКОДЖЕННЯ СПЕРМІЇВ ШЛЯХОМ СПЕЦИФІЧНОЇ ДЕФОРМАЦІЇ ЇХ

Як відомо, на різних етапах заморожування і відтавання сперми можуть відбуватися значні зрушення осмотичного тиску як у бік гіперосмолярності, так і гіпоосмолярності, тобто порушується осмотична рівновага між протоплазмою спермія і середовищем, яке оточує клітину. Про це повідомляють автори багатьох робіт. Однак досліджень, присвячених

© М.П. Журавель, 2001

Розведення і генетика тварин. 2001. Вип. 34

безпосередньо вивченню впливу розчинів різної осмолярності на спермії, в літературі не так уже й багато. Насамперед — це роботи В.К. Милованова, В.О. Морозова, І.В. Смирнова, Ф.І. Осташко, А.Д. Бугрова, Є.М. Платова та інших дослідників.

Перш за все, результати цих робіт змусили переглянути питання про стеносмотизм сперміїв. Виявилось, що спермії в багатьох випадках здатні витримувати досить значні відхилення від ізоосмолярності, причому в гіперосмолярних розчинах їхня життєздатність зберігається краще, ніж у гіпоосмолярних. Враховуючи цю обставину, деякі автори рекомендували гіперосмолярні розчини для розбавлення сперми перед зберіганням і заморожуванням.

Так В.О. Морозов (1940, 1957, 1959, 1963) використовував у своїх дослідках розріджувач з концентрацією глюкози і лимоннокислого натрію у півтора-два рази вище ізоосмолярного рівня. Автор довів, що при дії ізоосмолярних розчинів частина сперміїв може переходити у стан зворотної інактивації, яку назвали осмотичним анабіозом. Вивести спермії із стану анабіозу можна шляхом нормалізації осмотичного тиску, що досягається добавлянням до сперми ізоосмолярних розчинів, а також підвищенням температури. За В.О. Морозовим, перехід сперміїв до активного стану відбувається порівняно повільно — при температурі $+38-40^{\circ}\text{C}$ протягом 10—15 хв.

У класичних роботах І.В. Смирнова встановлено неоднакову стійкість сперміїв за їхньою реакцією на вплив осмотичних зрушень. Такі відмінності спостерігаються не тільки в еякуляті різних плідників, а і в одного й того самого плідника. На думку автора, в кожному еякуляті частина сперміїв витримує значні відхилення від ізоосмолярності, тоді коли більш слабкі гинуть при порівняно невеликих зрушеннях осмотичного тиску.

І.В. Смирновим (1957, 1963, 1964) вперше у світі встановлено і вивчено явище специфічної деформації сперміїв у гіпоосмолярних розчинах. Автор цей негативний артефакт пояс-

нював тим, що спермій згинається в точці з'єднання тіла з хвостом, неначе складається навпіл. Не зважаючи на це, хвіст продовжує енергійно коливатись і спермій швидко рухається вперед з відігнутою назад головою і тілом. І під час спостереження при невеликому збільшенні в полі зору мікроскопа створюється враження, що спермій рухається зігнутою частиною і хвостом вперед. Насправді хвіст залишається у звичайному положенні щодо напрямку руху.

Далі І.В. Смирнов констатує, що процес деформації спермійів відбувається не миттєво, а протягом деякого часу — від декількох секунд до декількох хвилин. І перегину підлягають тільки рухливі спермії: чим енергійніше здійснюється коливання хвоста, тим швидше відбувається перегин спермія. Мертві спермії, а також ті, які перебувають у стані анабіозу, не деформуються. Можливо, це явище було покладено в основу рекомендацій багатьох авторів вводити розріджувач з гліцерином поступово і тільки в охолоджену сперму з температурою, близькою до 0 °С. За таких умов рухливість спермійів призупиняється і їхня деформація не відбувається. А як відомо, гліцерин, який додають у середовище, знижує осмотичний тиск у розріджувачі і створює, таким чином, гіпоосмолярні умови.

Проте, оскільки дослідження деформованих спермійів у звичайних препаратах (роздавлена крапля), проведені І.В.Смирновим, дають певний відсоток помилок, ми для визначення цього показника використали мазки сперми як непофарбовані, так і пофарбовані фіолетовим чорнилом і 5% -м водним розчином еозину. Фарбування чорнилом посилює різкість зображення спермійів, а фарбування розчином еозину, крім того, дає змогу диференціювати живих і мертвих спермійів. Приготовлені мазки використовували для порівняння підрахунку кількості спермійів, ушкоджених шляхом деформації за допомогою світлового мікроскопа при збільшенні у 600 разів. Дослідження механізму деформації спермійів здійснювалося шляхом електронної мікроскопії при збільшенні у 10000 — 78000 разів.

Підготовку препаратів для електронної мікроскопії прово-

дили за такою методикою. Кожний еякулят від бугаїв плідників ділили на дві частини. Одну з них розбавляли ізотонічним розчином цитрату натрію (2,9%) у співвідношенні 1:10, другу — в такому самому співвідношенні гіпоосмолярним розчином цитрату натрію (1,86%) при температурі +38—40 °С. Одержані зразки сперми бугаїв відмивали триразовим центрифугуванням в кокадилатному буфері (рН 7,2 — 7,4), який містить 300 М сахарози. Фіксація здійснювалася в 2,5% -му глютаральдегіду на фосфатному буфері (рН 7,2—7,4) з 4%-м вмістом сахарози протягом 1 год. при кімнатній температурі і 2 год. у холодильнику при 2—4 °С. Кількість фіксатора за об'ємом бралась із розрахунку в 1 мл 104 — 105 клітин. У подальшому спермії відмивали триразовим центрифугуванням у тому самому буфері та дофіксували 1%-м розчином Os₅O₄, зневоднювали в ряді спиртів висхідної концентрації і поміщали в суміш епоксидних смол +S аралдит. Ультратонкі зрізи, одержані на ультрамікромомі ЛКБ, константували 2 %-м спиртовим розчином ураніацетату і лимоннокислим свинцем, після чого проглядали під електронним мікроскопом ІЕМ -100 СХ. При цьому вивчали морфологічні зміни чотирьох структурних елементів спермія: головки, шийки, тіла і хвоста. На кожному зрізі товщиною 500 А досліджували по 30 фрагментів кожного із вказаних структурних елементів.

Використання світлової і електронної мікроскопії дало можливість розкрити механізм деформації сперміїв. Спочатку на каудальній частині тіла спермія під дією гіпоосмолярного розчину відбувається відшаровування клітинної мембрани, яка потім переходить на краніальну частину хвоста. Набрякла і відшарована мембрана підтягує хвіст спермія до нижньої (каудальної) частини тіла, до речі виникає не різкий злам (перелом), а невелика петля, що практично неможливо побачити в полі зору світлового мікроскопа. Утворюється своєрідний мішок, заповнений продуктами розпаду протоплазми.

Постає питання, чому деформація відбувається безпосередньо в цій частині спермія? На нашу думку, це відбувається тому, що при скороченнях хвоста, який зумовлює рух

спермій, каудальна частина спермія, залишаючись нерухо-
мою, випробовує максимальну механічну напругу. Ця обста-
вина пояснює, чому деформуються тільки рухливі спермії, а
також чому найбільший відсоток деформованих спермійв спо-
стерігається при порівняно невеликих ступенях гіпоосмоляр-
ності (65% від ізоосмолярної концентрації цукрів і солей).
Вплив на спермії більш значних відхилень від ізоосмолярності
відразу не призводить до загибелі спермія, а отже, деформація
просто не встигає відбутися.

При дії гіперосмолярних розчинів відбувається не набу-
хання, а навпаки, часткове зневоднення спермійв і, можливо,
деяке ущільнення структури клітини. Відшарування мембрани
в таких розчинах не відбувається.

Таким чином, поява в спермі деформованих спермійв є
безпомилковим свідченням того, що на певному етапі об-
робки сперми мав місце вплив на спермії гіпоосмолярного
середовища.

Національний аграрний університет

УДК 636.082.453.53

М.П. ЖУРАВЕЛЬ

К ИСТОРИИ ПРОБЛЕМЫ ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ПОСРЕДСТВОМ АНГИДРОБИОЗА

Несмотря на то, что высказывания о необходимости раз-
работки метода длительного хранения спермы посредством
высушивания (ангидробиозом, ксеробиозом) встречаются в
литературе очень часто, экспериментальные работы в этом
направлении весьма немногочисленны.

Одна из первых работ по высушиванию спермы быка бы-
ла проведена В.А. Морозовым в 1940 г. Методика, предложен-

© М.П. Журавель, 2001