

спермій, каудальна частина спермія, залишаючись нерухомою, випробовує максимальну механічну напругу. Ця обставина пояснює, чому деформуються тільки рухливі спермії, а також чому найбільший відсоток деформованих спермій спостерігається при порівняно невеликих ступенях гіпоосмолярності (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 набухання, а навпаки, часткове зневоднення спермій і, можливо, деяке ущільнення структури клітини. Відшарування мембрани в таких розчинах не відбувається.

Таким чином, поява в спермі деформованих спермій є безпомилковим свідченням того, що на певному етапі обробки 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 разработки 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 была проведена В.А. Морозовым в 1940 г. Методика, предложен-

© М.П. Журавель, 2001

ная автором, была очень проста: образцы спермы помещали под стеклянный колпак и высушивали при комнатной температуре. После потери спермой около 60% воды и последующего "обводнения" (гидратация) автор наблюдал в образцах небольшое количество подвижных спермиев.

В 1949 г. С. Polge, A.U. Smith and A.S. Parkes сообщили об удовлетворительных результатах при высушивании спермы петуха. Эти авторы, по сути дела, первыми применили метод лиофилизации — удаление воды из замороженных образцов спермы. Свежеполученную сперму петуха разбавляли раствором Рингера, содержащим 30% глицерина, и высушивали при температуре -25°C . После удаления 85—90% воды и последующего восстановления её первоначального уровня сохраняли подвижность около 50% спермиев. Однако хранение спермы в высушенном состоянии при комнатной температуре в течение двух часов привело к полной гибели спермиев. О причинах такого явления авторы ничего не сообщают.

В 1950 г. A.U. Smith and С. Polge применили лиофилизацию спермы быка при температуре -25°C . После высушивания на протяжении пяти часов к высушенной сперме добавляли воду и исследовали под микроскопом. Результаты опытов были неутешительными: в поле зрения микроскопа обнаруживали лишь незначительное число подвижных спермиев. Авторы не учитывали процент потери влаги и поэтому трудно судить, насколько глубоко была высушена сперма.

Об опытах по обезвоживанию спермы человека и быка путем лиофилизации сообщил J.K. Sherman (1954, 1957). Процесс проходил при температуре -65°C , а продолжительность высушивания составляла 6, 12, 24, 36 и 48 часов. Сперму предварительно разбавляли желточно-глицериновым разбавителем, содержащим 7% глицерина. Во всех случаях были получены отрицательные результаты. Автор считает, что причиной гибели спермиев является несовершенство метода, высокая концентрация глицерина и солей в высушенных образцах спермы. Гибель спермиев могла также происходить и в процессе гидратации образцов спермы.

В 1954 г. появилось сообщение М.Д. Leid, который высушивал сперму быка при температуре -70°C . Сперму, разбавленную цитратно-желточным разбавителем, содержащим 10% глицерина, подвергали лиофилизации до такой степени, когда содержание воды во всей пробе составляло примерно 5% от исходного, а содержание глицерина повышалось не более чем на 50%. Автор наблюдал единичных подвижных спермиев лишь в том случае, когда высушиваемые образцы спермы увлажнялись тотчас же после завершения процесса лиофилизации. Живые спермии, по мнению автора, размещались в центральной зоне замороженного образца спермы, несколько менее обезвоженной, нежели периферические слои. Причиной получения столь низких результатов автор склонен считать повышение концентрации глицерина в высушиваемой сперме до токсического уровня. Попытка удаления глицерина из разбавленной спермы перед началом процесса лиофилизации не увенчалась успехом.

G. Bialy and V.R. Smith (1957) разбавляли сперму быков средой, содержащей цитрат натрия, желток куриных яиц и глицерин, конечная концентрация которого составляла 7,5%. Образцы разбавленной спермы сублимировали в ампулах, пробирках и на предметных стеклах при температуре от $+20$ до -70°C до достижения разных степеней высушивания. Показатели подвижности и выживаемости спермиев определяли визуально и путем окрашивания эозин-нигрозином. Положительные результаты были получены только при низкой температуре лиофилизации и при условии немедленного обводнения спермы после окончания процесса сублимации. Во всех случаях определение жизнеспособности спермиев путем их окрашивания давало более высокие результаты, чем визуальное определение процента подвижности. При 40%-м содержании оставшейся воды в сперме подвижность спермиев составляла 11,5%, то есть была примерно такой же, как и перед началом обезвоживания. Затем по мере высушивания этот показатель снижался и при 75%-м обезвоживании он составил 4,1%, а при 95%-м лишь единичные спермии сохраняли движение. Авторы

рекомендуют проводить обезвоживание спермы в тонких слоях, чтобы обеспечить более равномерное высушивание всех участков образца спермы.

Наиболее совершенной методикой высушивания характеризуются исследования, проведенные Н.П. Ющенко (1957). Автору впервые удалось получить высокие результаты при лиофилизации спермы быка, барана и кролика. Это первый, зафиксированный в специальной литературе, случай, когда сохранение обезвоженной спермы проводилось при относительно высокой температуре (18—20 °С) и в течение довольно продолжительного периода.

Экспериментальная часть работы Н.П. Ющенко состояла в следующем: свежеполученную сперму разбавляли обычной синтетической средой для замораживания, содержащей от 7,5 до 20% глицерина. После 12—24-часового периода эквilibрации сперму разливали в пробирки, содержащие смесь фреона с гептаном. В результате центрифугирования со скоростью 6—7 тыс. оборотов в минуту в течение 15—30 мин. происходило отделение спермиев от межклеточной среды (плазмы), затем погружали их в смесь фреона с гептаном. Пипеткой удаляли надосадочную жидкость, а оставшихся в смеси фреона с гептаном спермиев замораживали при -20 — 78 °С и высушивали в сублимационно-вакуумной установке при остаточном давлении 10^{-3} — 10^{-4} мм ртутного столба. Продолжительность высушивания составляла от 2 до 18 ч. Всего было доведено 130 опытов. Наилучшие результаты были получены при высушивании спермы быка при температуре -2 — 3 °С с продолжительностью периода сублимации 2 ч. Высушенную сперму хранили в запаянных ампулах при комнатной температуре на протяжении 18—20 месяцев. Выяснилось, что замена водной среды спермы неводной (фреоно-гептановой смесью) значительно снизила гибель спермиев. В отдельных опытах автор наблюдал восстановление подвижности 15—20% спермиев.

Н.П. Ющенко высушивал по сходной методике сперму барана и кролика. Высушенная сперма хранилась в течение 6—8 месяцев в условиях комнатной температуры, а затем обводня-

лась дистиллированной водой, растворами лимоннокислого натрия и другими растворами, применяемыми обычно для разбавления спермы. Автор наблюдал в поле зрения микроскопа восстановление подвижности части спермиев барана и кролика. Подвижных спермиев можно было наблюдать даже спустя 30 ч. с момента гидратации спермы.

Оплодотворяющую способность спермиев, сохраненных 30—40 дней в высушенном состоянии, автор проверял на крольчихах. Один из вариантов опыта дал положительные результаты. Из 23 осемененных крольчих 12 окролилось. Из них одна принесла 8 крольчат, три — по 6, четыре — по 4—5, а остальные четыре крольчихи — по 2—3 крольчонка. Таким образом, Н.П. Ющенко первым получил жизнеспособное потомство от крольчих, осемененных высушенной спермой.

В 1958 г. J.L. Albright, R.E. Erb and M.H. Ehlers перед обезвоживанием применили в качестве разбавителя спермы цельное молоко с добавкой в него 10% глицерина. Разбавленную сперму разливали в ампулы и медленно охлаждали до температуры -50°C , после чего помещали в прибор для лиофилизации на 45 мин. Лиофилизованные образцы спермы немедленно разбавляли 3%-м раствором фруктозы, температура которого была равной $+38^{\circ}\text{C}$. Авторы наблюдали примерно 5—10% спермиев, движущихся прямолинейно-поступательно. В работе не сообщается, почему был использован гипотонический (3%-й) раствор фруктозы.

Несомненный интерес представляют работы американских исследователей Н.Т. Meryman and E. Kafig (1959, 1963). В первоначальных опытах (1959) по лиофилизации спермы быка авторы получили положительный результат: от коровы, осемененной спермой, подвергавшейся высушиванию, родилась здоровая телочка. Важной чертой примененной авторами методики является отсутствие в разбавителях глицерина. Сперму разбавляли цельным коровьим молоком, цитратно-желточным разбавителем или же изотоническим раствором цитрата натрия (2,9%) и наносили на поверхность нейлоновой ткани по площади, равной $19,4\text{ см}^2$ ($2,54 \times 7,62$), с отверстиями

диаметром 1 мм и помещали в камеру для высушивания. За счет снижения степени вакуума в системе создавались определенные условия сублимации: при испарении влаги температура образца спермы понижалась до -3 — -40 °С. Продолжительность высушивания составляла 7 мин. Затем восемь высушенных и сразу же обводненных проб спермы смешивали и использовали для осеменения.

Те же авторы провели рекогносцировочный опыт по хранению высушенной спермы в условиях комнатной температуры. Пробы спермы хранили в сушильном шкафу над парами пятиоксида фосфора. После 24-часового хранения исследователи наблюдали подвижных спермиев.

В пробах, которые хранились в течение одной недели, также были обнаружены подвижные спермии. В 1963 г. Н.Т. Мегуман and E. Kafig повторили свои опыты, но получили отрицательные результаты. Поэтому авторы считают, что первоначальный успех был случайным. Причины последующих неудач остались не выявленными.

J. Anderson and Н.Т. Мегуман (1960) в процессе высушивания спермы быка путем лиофилизации использовали различные разбавители и разные условия сублимации, в том числе применяли методику, предложенную Н.П. Ющенко (1957). Для удаления глицерина использовали окислители (марганцовокислый калий, двуххромовокислые калий и натрий, хромовую кислоту). Для обезвоживания замороженной спермы был использован и ацетон. Однако ни один из примененных вариантов не дал положительного результата.

R.G. Saacke and J.O. Almgvist (1961) предприняли попытку лиофилизировать сперму быка с использованием методов, предложенных М.Д. Leid (1954), Н.П. Ющенко (1957) и Н.Т. Мегуман, E. Kafig (1959). Ни один из 250 экспериментов не дал положительных результатов. Авторы пришли к выводу, что наличие глицерина в разбавленной сперме приводит к образованию восковидного осадка, который обволакивает клетки, что затрудняет процесс высушивания, а при восстановлении спермы этот осадок растворяется с большим трудом. Уст-

ранение глицерина по способу, предложенному Н.П. Ющенко, не решило эту проблему. Электронно-микроскопическое исследование высушенных, а затем восстановленных спермиев показало, что в процессе обезвоживания нарушается целостность цитоплазматической мембраны и это, по мнению авторов, является одной из возможных причин гибели спермиев.

G.S. Singh and D.J. Roi (1967) использовали различные по составу разбавители, разную температуру лиофилизации, а также определенные значения вакуума. Наивысшая подвижность спермиев после лиофилизации составляла в среднем для спермы быка $26,2 \pm 2,0\%$, а для буйвола — $22,1 \pm 2,3\%$. Такая подвижность была достигнута после полного высушивания образцов спермы. Однако это утверждение вряд ли соответствует действительности, поскольку степень обезвоживания спермы оценивалась авторами только визуально.

На сложность хранения спермы животных в высушенном состоянии указывают Е.М. Платов и А.Н. Успенский (1967). Они отмечают, что решение этой проблемы немыслимо без глубоких теоретических и экспериментальных исследований и что познание причин, вызывающих потерю подвижности спермиев, сыграет значительную роль в решении этой трудной задачи. Одной из таких причин авторы считают повреждение сократительного белка спермиев. Поэтому целью их исследования было изучение действия вакуумной сушки спермы барана на функцию контрактильных элементов спермиев.

Методика, предложенная авторами, сводилась к следующему: свежеполученный эякулят барана делили пополам и разбавляли одну часть глюкозо-желточно-цитратной средой, а другую — этой же средой с добавкой в нее глицерина из расчета, чтобы концентрация его в разбавленной сперме составляла 7%. Охлажденную и адаптированную сперму разливали по 0,5 мл в ампулы, которые затем присоединяли к вакуумной установке с величиной вакуума 10^{-3} мм ртутного столба. В вакууме сперма замерзала при температуре -2 — 3 °С. Высушивание спермы проводилось в течение 20—70 мин.

Чтобы ускорить процесс высушивания, в качестве погло-

тителя влаги использовали пятиокись фосфора. Высушенную сперму немедленно обводняли дистиллированной водой до первоначальной массы и готовили препараты для изучения подвижности и состояния сократительных элементов спермиев по методике, предложенной Х. Гофманом-Берлингом (1957). Было установлено, что уменьшение первоначальной массы высушенной спермы без глицерина на 60—65% не влияет на количество спермиев с вибрирующим жгутиком. Даже при потере 87—88% первоначальной массы количество спермиев с неповрежденными сократительными элементами составляет 10—45%, хотя подвижные спермии полностью отсутствуют. При высушивании спермы в среде, содержащей глицерин, количество спермиев с неповрежденными сократительными элементами примерно такое же, как и в первом варианте, но в этом случае наблюдали спермиев, сохранивших подвижность. В среде с глицерином при потере 35% влаги сохраняло подвижность до 10—15% спермиев, а при обезвоживании до 57% наблюдались единичные поступательно движущиеся спермии. Отмечено также, что для повреждения контрактильных белков спермиев барана требуется большая степень обезвоживания, чем та, при которой происходит полное прекращение подвижности. Отсюда авторы делают вывод, что подвижность спермиев не связана с нарушением функций контрактильных белков.

К числу наиболее удачных экспериментов по высушиванию спермы быка относятся исследования E.V. Larson, E.F. Graham and B.G. Grabo (1974). Эти авторы сообщили о рождении одного теленка. А в 1976 г. на VIII Международном конгрессе по воспроизводству и искусственному осеменению животных E.V. Larson and E.F. Graham доложили о получении нескольких телят после осеменения коров высушенной спермой. Авторы лиофилизировали сперму быка в среде без глицерина. Свежеполученную сперму разбавляли специальным разбавителем, состоящим из 50% трисбуферной смеси, 30% - раствора цитрата натрия и 20% желтка. В состав трисбуферной смеси входит N -трис-метил-2-аминоэтансуль-

фоновая кислота (325 мосм), титрованная до рН 7,2 трисом аминокетаном (325 мосм).

Разбавленную и охлажденную до 5 °С сперму выдерживали пять часов, а затем замораживали на блоках сухого льда (-78 °С) в форме гранул объемом 0,025 мл. Гранулы общей массой 400 г помещали в камеру и подвергали сублимации при температуре -50 °С с величиной вакуума ниже 30 мторр и температурой конденсатора -196 °С. После трехсуточного высушивания образцы спермы содержали 50% влаги (потерю влаги определяли путем взвешивания), а спустя шесть суток — всего лишь 7%. Одну часть высушенных образцов спермы помещали в жидкий азот на хранение, а вторую хранили в условиях комнатной температуры (25 °С) в течение 28 суток. Высушенные образцы спермы восстанавливали раствором цитрата натрия на водяной бане при температуре 37 °С, а затем проводили осеменение коров дозой спермы 2 мл, содержащей 160 млн. спермиев. Изучение различных степеней высушивания спермы позволило авторам сделать выводы, что подвижность спермиев практически не изменялась до уровня, наблюдаемого при обезвоживании спермы, содержащей всего лишь 30% влаги. При содержании в сперме около 3% влаги были обнаружены только единичные подвижные спермии. Электронно-микроскопические исследования акросом показали, что их повреждения наблюдались при 7%-й влажности, а содержание аспартаминотрансферазы практически не изменилось при влажности 0,5%.

По мнению авторов, способность к оплодотворению спермиев, подвергшихся значительному обезвоживанию, представляет собой реальное и повторимое явление. Одна из трех осемененных коров принесла нормальное потомство даже при осеменении почти полностью высушенной спермой, хранившейся в течение одного месяца при температуре - 25 °С.

Таким образом, разработка длительного хранения спермы в высушенном состоянии находится пока в начальной стадии. Число работ, посвященных непосредственно этой проблеме, крайне невелико: сообщения об успешном высушивании спер-

мы исчисляются буквально единицами. Почти все работы имели чисто эмпирический характер. Теоретические исследования по этому вопросу фактически отсутствуют. Ни в одной работе не указываются конкретные причины гибели спермиев при высушивании: высказываются лишь предположения о возможности действия тех или иных факторов. Кроме того, показателем слабой разработанности данного метода является то обстоятельство, что почти все авторы, сообщившие о положительных результатах, в дальнейшем не смогли повторить свои же собственные эксперименты.

Национальный аграрный университет

УДК 636.082.453.53

В.П. БУРКАТ, Л.О. БЕГМА, А.А. БЕГМА, П.А. КРУГЛЯК

СПОСІБ РАЦІОНАЛЬНОГО ВИКОРИСТАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ-ЛІДЕРІВ

Існуючий рівень технології кріоконсервації сперми бугаїв на племпідприємствах України дає змогу одержувати від кожного плідника в середньому 19 тис. спермодоз на рік. Для ефективного використання бугаїв-лідерів загальнопородного значення вихід спермодоз повинен становити не менше 50—100 тис. на рік. Значним резервом збільшення виходу їхньої спермопродукції може бути використання спермодоз із зниженим числом рухливих сперміїв (5—8 млн.). Однак питання практичного використання таких спермодоз носить дискусійний характер. За деякими літературними даними (R. Jondet, 1980; С.А. Сидашева, 1991; Ф.И.Осташко, 1995),

© В.П. Буркат, Л.О. Бегма, А.А. Бегма, П.А. Кругляк, 2001

Розведення і генетика тварин. 2001. Вип. 34