

3. Практична ветеринарна гінекологія. // Гришко Д.С., Жидков Д.М., Бондаревський М.М. та ін. – Харків: РВВ ХЗВІ, 1999. – 92 с.

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ПАТАЛОГИЙ ШЕЙКИ МАТКИ У КОРОВ

М.М. Бондаревский, Харьковская государственная зооветеринарная академия
Приведены результаты применения цервиксскопа, разработанного автором, для диагностики заболеваний эндоцервикса у коров с гипоэстральным половым циклом. Показана высокая лечебная эффективность каплаэстрола при эрвикспатиях у коров. Эндогенные гормоны положительно влияют на полноценность феноменов стадии возбуждения полового цикла и активизируют функциональную активность эндоцервикса. В свою очередь каротин имеет одно из решающих значений для процессов восстановления слизистой оболочки и полноценного ее функционирования

Ключевые слова: корова, шейка матки, цервиксскоп, диагностика, половой цикл

DIAGNOSTICS & COW CERVIX DISEASE TREATMENT

M. Bondarevskiy, Kharkiv state veterinary academy

This article highlights the experimental research results on cervix-scope application. The outfit was developed by the inventor for the -cervix disease diagnostics of the cows with the latent heat cycle. Kaplaestrol preparation proved to be efficient by the cow cervix disease. Endo-gene hormones proved to stimulate estrus & functional activity of the cervix. Carotin affects the mucous membrane & promotes induced processes & performance function.

Key words: cows, cervix, cervix-scope, diagnostics, sexual cycle.

УДК 57.043

ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ ЭНДО- И ЭКЗОЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ РАЗМОРАЖИВАНИИ СПЕРМИЕВ БЫКОВ

А. Д. Бугров

Институт животноводства УААН

В результате нахождения критических зон при размораживании спермы быков, замороженной с эндо- и экзоцеллюлярными криопротекторами установлено, что повреждение спермиев начинается при температуре около $-40 \div -35$ °C, достигает максимума около -10 °C и завершается с таянием последних кристаллов льда. Эндоцеллюлярные криопротекторы замедляют процессы миграционной рекристаллизации

Ключевые слова: эндо- и экзоцеллюлярные криопротекторы, сперма быков, критические зоны, деконсервация.

В литературе имеются сообщения, свидетельствующие о повышенном интересе многих исследователей к процессу размораживания биологических объектов и спермы сельскохозяйственных животных, сохраненной в жидком азоте. Это связано с восстановлением жизнеспособности спермиев, зависящей от скорости отогрева [1-3]. В то же время только отдельные работы направлены на выявление повреждающих факторов при деконсервации [1-4], поэтому механизм повреждений спермиев при отогреве недостаточно изучен и требует уточнения.

Очередным этапом раскрытия механизма гибели спермиев при размораживании, по-видимому, станет нахождение критических (повреждающих) зон при размораживании спермы быков, замороженной с эндо- и экзоцеллюлярными криопротекторами. Одна из задач настоящей статьи — определение этих зон при размораживании.

Методика и результаты исследований. В опытах использовали нативную сперму быков, отвечающую требованиям стандарта. В первой серии опытов брали для разбавления и замораживания среду следующего состава: 11,5 %-ный раствор лактозы - 63 мл, желтка - 30 мл, глицерина - 7 мл. Сперму разбавляли 1:1 при температуре 30 - 35 °С. Для последующих опытов использовали среду следующего состава: вода дистиллированная - 100 мл; лактоза - 11,5 г; желток - 20 мл и криопротекторы на 100 мл среды: этиленгликоль - 6 мл; полиэтиленоксид (ПЭО) молекулярной массы (М м) 100 - 6 мл; ПЭО-400 - 8 мл; диметилсульфоксид (ДМСО) - 6 мл. В качестве криопротекторов также использовали 11,5%-ную лактозу и сахарозу, 22%-ную рафинозу с 20 мл желтка на 100 мл раствора. Сперму разбавляли указанными средами в два раза (тогда соответственно уменьшалось конечное содержание криопротекторов), выдерживали в холодильнике в течение 4 - 5 ч при температуре 2 °С - 4 °С. Замораживали сперму в гранулах на фторопластовой пластине с температурой от -70 °С до -76 °С. Гранулы после двухминутной выдержки на пластине погружали в жидкий азот и хранили их в нем не менее суток.

Для нахождения критических зон при размораживании готовили спиртовую баню в пищевом термосе при постоянном помешивании электро-мешалкой. Минусовую температуру в ванне создавали добавлением в спирт жидкого азота и контролировали ее термометром с точностью до -0,5 °С.

По достижении температуры -10 °С в спиртовую ванну погружали стерильный пенициллиновый флакон на 2/3 его высоты с постоянной фиксацией в этом положении. Спустя 4 - 5 мин во флакон из жидкого азота переносили гранулу и выдерживали ее при -10 °С в течение 30 мин. Оттаивали гранулу во флаконе, содержащем 1 мл 2,8 %-ного натрия лимоннокислого, трехзамещенного, пятиводного при температуре 38-40 °С. Через 1-2 мин оценивали подвижность спермиев в баллах, а флаконы со спермой ставили в термостат для инкубирования при температуре 38 °С. Активность спермиев определяли через каждый час инкубирования до полной гибели всех клеток. Переживаемость исчисляли в часах, включая появление единичных спермиев с прямолинейно-поступательными движениями.

Аналогичные операции получасовой выдержки гранул проводили при температурах спиртовой ванны соответственно -5, -15, -20, -30, -40, -50, -70, -196°С (табл. 1).

В контроле сперму оттаивали путем переноса гранул из жидкого азота в изотонический раствор того же цитрата натрия при температуре 38-40 °С.

Каждый опыт ставили на 5-10 разделенных эякулятах.

Из таблицы видно, что количество и живучесть клеток после получасовой выдержки при минусовых температурах варьируют не только от температуры, но и от вида криопротектора и его защитных свойств.

Количество живых спермиев после 30-минутной выдержки при температуре -70°С было на уровне контроля. Не изменился и показатель живучести, однако он имел тенденцию к снижению при консервировании спермы с 7,5 % глицерина лактозой, ПЭО-400.

Влияние получасовой выдержки замороженной спермы при минусовых температурах на ее качество

Показатель	Криопротектор		Температура выдержки спермы, °С									
			0	-5	-10	-15	-20	-30	-40	-50	-70	-196
Активность Живучесть	глицерин, %	3,5	2,55 3,97	- -	0,1 0,05	- -	0,81 0,46	1,77 2,55	3,6 8,0	4,0 11,1	4,2 13,4	4,15 13,3
Активность Живучесть		7,5	4,25 12,7	- -	2,75 3,0	- -	1,68 1,65	2,68 4,5	3,68 7,46	3,62 6,99	3,87 8,93	4,18 11,8
Активность Живучесть	Этиленгликоль		2,5 4,25	0,1 0,1	0,5 0,25	- -	1,3 1,15	3,5 18,05	3,9 26,35	4,2 34,3	4,8 37,7	4,8 47,5
Активность Живучесть	полиэтиленоксид	Мм 100	0,9 3,75	0,7 0,67	1,2 2,0	- -	1,4 6,0	1,8 23,2	2,8 23,9	2,9 25,9	2,8 22,3	3,25 23,6
Активность Живучесть		Мм 400	0 0	0 0	0 0	- -	0,5 0,75	1,7 5,5	2,9 10,6	2,9 15,1	2,9 14,1	3 17,5
Активность Живучесть	сахароза		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1,8 3,75	2,85 4,9	2,4 5,0	3,3 14,4	3,4 15,8
Активность Живучесть	лактоза		0 0	0 0	0 0	0 0	1,8 6,2	2,8 15,2	3,3 18,3	3,5 18,7	3,5 18,6	3,6 16,7
Активность Живучесть	рафиноза		0 0	0 0	0 0	0 0	0,75 0,75	1,75 5,5	3,0 8,0	3,35 15,6	3,5 16,8	3,5 16,9

С повышением температуры спиртовой ванны до -50 °С и выдержки спермы, консервированной с 3,5% глицерина, качественные показатели снижались незначительно. Активность спермиев после выдержки при -40 °С также понизилась на недостоверную величину. В то же время показатель живучести значительно уменьшался ($p < 0,01$). Выдержка спермы в спиртовой ванне при температуре -30 °С и выше до 0 °С достоверно снижала подвижность и живучесть спермиев. Максимальная гибель клеток отмечалась при температуре около 10 °С. Получасовая выдержка спермы, консервированной с конечным 7,5%-ным содержанием глицерина, по-иному влияла на характер изменения качества спермы в приведенных диапазонах. Так, выдержка при -70 °С снизила показатель живучести на 3 условные единицы ($p < 0,1$).

При -50 и -40 °С активность снизилась на 0,4 балла ($p < 0,1$), а живучесть соответственно на 4,9 и 4,6 условной единицы ($p < 0,05$). Выдержка спермы в ванне с температурой -30, -20 и -10 °С достоверно понижала активность и показатель живучести спермиев. Наибольшая гибель наблюдалась при температуре около -20 °С. Выдержка спермы и ее последующий отогрев при 40 °С не снизили качественных показателей спермы в сравнении с контролем.

Получасовая выдержка спермы, замороженной с 3 % этиленгликоля, показала, что снижение количества живых клеток и их живучесть при задержке размораживания были аналогичны показателям для спермы, консервированной с 3,5 % и глицерина. Максимальная гибель отмечалась в диапазоне температур около -10 °С. Аналогичные результаты получены на сперме, консервированной с ДМСО и ПЭО-100.

Следует отметить, что ПЭО-400, в отличие от ПЭО-100, не защищает спермии при размораживании и после выдержки при температурах -5, -10 и -15 °С. Спермии, консервированные в сахарозной среде после получасовой выдержки, не защищены от повреждений при температурах от -5 до -20 °С, в рафинозной и лактозной - от -5 до -15 ÷ -18 °С.

Вероятно, защитные свойства проникающих и непроникающих криопротекторов неоднозначны. В первом случае защитное свойство эндоцеллюлярных соединений проявляется внутри клетки и в окружающей среде. Экзоцеллюлярные действуют непосредственно на внеклеточную среду и опосредовано через цитоплазматическую мембрану на внутриклеточное содержимое, ограждая клетку от повреждений. Известно, что с появлением жидкой фазы при температуре $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ образуются каналы, мало изменяющие объем с повышением температуры до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. По-видимому, при этих температурах получасовая выдержка обуславливает длительное воздействие повреждающих факторов. В это время происходит как бы повторное замораживание или рост кристаллов, так как температурная остановка создает условия для замораживания с малой скоростью. Такая длительная остановка, или задержка, отогрева приводит к возникновению центров кристаллизации внутри клетки или возникновению в процессе миграционной рекристаллизации более крупных эндоцеллюлярных кристаллов, если таковые имели место ранее.

Постепенное повышение температуры вызывает перемещение кристаллов. Поэтому не исключается и механическое повреждение спермиев.

С повышением температуры выше $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ сеть каналов расширяется. При температуре около $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ пространства между кристаллами заполняются гипертоническими растворами. При этих температурах масса льда составляет около 98 %. Повышение температуры до $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ снижает объем льда до 90 %. Можно полагать, что в этом диапазоне температур повреждение и гибель спермиев наступают от рекристаллизационных процессов и от воздействия гипертонических солей.

Дальнейшее повышение температуры до $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выше сопровождается увеличением межкристаллической жидкости. Кристаллы приобретают однородные контуры. Вероятно, в этих условиях повреждение спермиев наступает от длительной экспозиции с концентрированными растворами.

Нашими опытами установлена более высокая повреждаемость клеток при размораживании спермы, консервированной в непроникающих криопротекторах. Очевидно, степень проявления повреждающего действия перекристаллизации и концентрированных растворов в этом случае проявляется в большей степени, поскольку глицерин и другие эндоцеллюлярные криопротекторы снижают интенсивность рекристаллизационных процессов при оттаивании и, разбавляя концентрированные растворы, уменьшают их вредное действие. Об этом свидетельствует меньшая повреждаемость клеток в разбавителях, содержащих большой процент глицерина.

Известно, что защитные свойства непроникающих криопротекторов (сахарозы, лактозы и др.) при замораживании спермы ниже, чем эндоцеллюлярных (глицерина, ПЭО-100 и др.). По-видимому, это частично связано с повреждением клеток при отогреве, как показано в нашей статье.

Выводы:

1. Размораживание в диапазоне температур от -196 до $-70 \div -60\text{ }^{\circ}\text{C}$ не вызывает повреждений спермиев. Критическая зона повреждений спермиев в процессе размораживания начинается при температуре около $-40 \div -35\text{ }^{\circ}\text{C}$, достигает максимума около $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ и завершается с таянием последних кристаллов льда. Такая закономерность характерна для всех изученных криопротекторов. Разработана методика определения повреждающих зон в процессе размораживания биологических объектов.

2. Эндоцеллюлярные криопротекторы - глицерин, этиленгликоль, ДМСО и ДМФА - предохраняют спермиев от повреждений при размораживании в критической зоне более полно, чем метилцеллозольв, диэтиленгликоль, и гораздо эффективнее, чем экзоцеллюлярные криопротекторы. С увеличением концентрации глицерина и других проникающих криопротекторов их защитная роль в ограждающих средах при размораживании возрастает.

С увеличением молекулярного веса полиэтиленгликолей и полиэтиленоксидов степень их защитных свойств при размораживании понижается.

Библиографический список

1. Бугров А. Д. Способ оттаивания замороженной спермы быков в различной упаковке// Животноводство.- 1976. - № 12. - С. 57-59.

2. Бугров А. Д. Повреждения спермиев при оттаивании и пути устранения// Животноводство.- 1977. - № 12. - С. 57-59.

3. А. с. 552967 (СССР). Способ размораживания биологических объектов. Бугров А. Д., Осташко Ф. И., Олексенко Т. И.- Опубл. в Б. И., 1977, № 13.

4. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. – К.: Колос, 1968. - 248 с.

ЗАХИСНА РОЛЬ ЕНДО- І ЕКЗОЦЕЛЮЛЯРНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ ПРИ РОЗМОРОЖУВАННІ СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

О. Д. Бугров, Інститут тваринництва УААН

При дослідженні критичних зон розморожування сперми бугаїв, замороженої з ендо- і екзоцелюлярними криопротекторами, встановлено, що пошкодження сперміїв починається при температурі близько $-40 \div -35$ °C, досягає максимуму близько -10 °C і завершується з таненням останніх кристалів льоду. Ендоцелюлярні криопротектори сповільнюють процеси міграційної рекристалізації.

Ключові слова: ендо- и екзоцелюлярніе криопротектори, сім'я бугаїв, критичні зони, деконсервація.

ENDOCELLULAR & EXOCELLULAR FREEZING PROTECTORS IMPACT ON BULL SEMEN BY THAWING

A. Bugrov , the Institute of animal science, UAAS

This article highlights the experimental research results on the critical point identification by the bull semen thawing. The sperm was frozen by the endocellular & exocellular freezing protectors application. Sperm damage proved to initiate by $-40 - 35$ °C. the process acceleration occurs at -10 °C & it finishes by the last ice crystals thaw. Endocellular freezing protectors brake the recrystalization migration processes.

Key words: freezing protectors, bull semen, critical points, thaw, endocellular & exocellular freezing protectors