



УДК 632.2:57.08

КАЧЕСТВО СПЕРМЫ БЫКОВ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Рецензенты: д.-тор б.наук, академик УААН Осташко Ф.И.; канд. с.-х. наук Тихона Г.С.

А.Д. Бугров, С.А. Сидашова
Институт животноводства УААН

В статье показано, что сохранность спермиев быков при ее криоконсервации в жидком азоте в полной мере зависит от исходного уровня подвижных спермиев. Установлено, что при исходной оценке нативной спермы в 9; 8; 7,5; 7,0; 6,5 и 6,0 баллов получено после замораживания 6,5; 4,63; 4,47; 3,85; 3,0 и 2,0 балла, что составило в % от исходной подвижности 72,0; 57,88; 59,60; 55,00; 45,10; 33,3 % и брака: 0,0; 4,5; 7,05; 23,82; 50,0; 100,0, соответственно. Показано негативное влияние мертвых спермиев на переживаемость живых. Установлена высокая взаимосвязь этих показателей.

Ключевые слова: **сперма быков, качество, подвижность, переживаемость, криоконсервация, корреляция.**

Существующие технологии криоконсервирования спермы быков-производителей позволяют сохранять 30,0-50,0 % подвижных спермиев с прямолинейно-поступательным движением, что существенно снижает качественные показатели размороженной спермы [1-3]. О механизмах повреждений в процессе замораживания-оттаивания имеется достаточно обширная литература [4-8]. Однако недостаточно изучена способность спермиев переносить процесс замораживания в зависимости от ее качества при получении и жизнеспособность подвижных спермиев в зависимости от уровня мертвых клеток. Изучение указанных факторов позволит выяснить их влияние на эффективность способов замораживания и наметить перспективу научного поиска по совершенствованию способа криоконсервации спермиев и других клеток.

Цель настоящих исследований состояла в изучении влияния исходной подвижности нативной спермы быков и после криоконсервации, и установление влияния мертвых спермиев на живые.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились на основе первичных записей в лабораторных журналах, проведенных в разные периоды научно-исследовательской работы, которые ранее не публиковались или недостаточно проработаны и проанализированы и актуальны в настоящее время. Замораживание спермы проводилось в глюкозо-цитратном разбавителе с конечным 7,5 % содержанием глицерина по объему в полиэтиленовых ампулах по равномерно-ускоренному режиму. При этом учитывалась подвижность спермиев при получении и после криоконсервации [9-10]. Во втором опыте сперму в открытых гранулах замораживали на фторопластовой пластине [11]. Опыты по влиянию уровня соотношения живых и мертвых спермиев на выживаемость и их живучесть при температуре 38,0 °С проводились на разделенных эякулятах. Инактивацию разбавленной в 2,9 % растворе цитрата натрия спермы проводили путем двукратного ее погружения в жидкий азот на 3-5 минут и размораживания [12]. Результаты опытов вносили в таблицы и проводили их статистическую обработку [13].

Результаты исследований. В табл. 1 и рис. 1 приведена результативность замораживания 229 эякулятов быков-производителей Харьковской облгосплемстанции при опытном хозяйстве «Украинка». Из них с подвижностью



9,0 баллов было 3 эякулята (19,5%), 8,0 баллов - 111 (52,8 %), 7,5 балла - 43 (19,6 %), 7,0 баллов - 68 (25,3 %), 6,5 балла - 2 (0,87 %), 6,0 баллов - 2 (0,87 %).

1. Влияние начальной подвижности нативной спермы быков на ее подвижность после криоконсервации (n=228)

Подвижность после замораживания, баллы	Качество спермы после получения, баллы												Всего. %
	9,0		8,0		7,5		7,0		6,5		6,0		
	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%	
2	-	-	2	1,8	2	4,65	8	11,8	1	50	2	100	6,55
3,0	-	-	2	1,8	-	-	8	11,8	-	-	-	-	4,36
3,5	-	-	1	0,9	1	2,3	3	4,41	-	-	-	-	2,18
4,0	-	-	31	27,9	12	27,9	30	44,1	1	50	-	-	32,31
4,5	-	-	29	26,1	8	18,6	10	14,7	-	-	-	-	20,52
5,0	-	-	32	28,8	19	44,1	8	11,8	-	-	-	-	25,76
5,5	1	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43
6,0	-	-	11	9,9	1	2,3	1	1,47	-	-	-	-	5,67
7,0	2	66,6	2	1,8-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,74
N	3	-	111	-	43	-	68	-	2	-	2	-	229
%	1,88		52,8		19,6		25,3		0,5		0,2	-	
Σ	19,5	-	513,5	-	192,5	-	261,5	-	6	-	2	-	997
M, балл	6,5	-	4,62	-	4,47	-	3,85	-	3,0	-	2,0	-	4,35
% от исходной	72,2	-	57,75	-	59,6	-	55,0	-	46,5	-	33,3	-	57,6

Примечание. n - количество эякулятов.

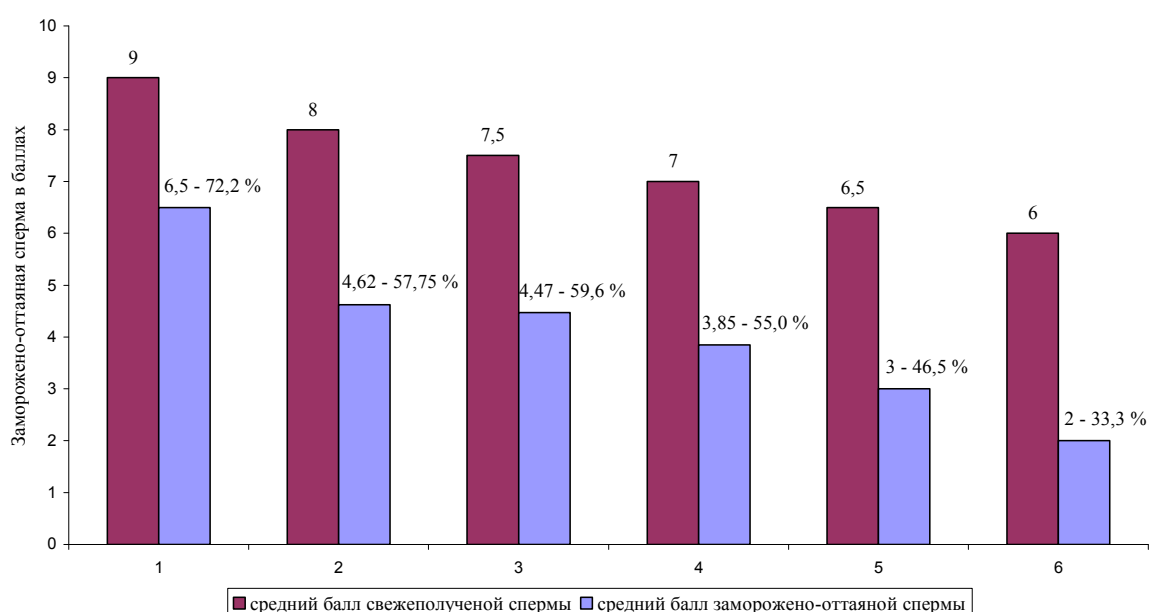


Рис. 1. Бальная подвижность спермиев быков до и после криоконсервации.

Подвижность спермиев при получении составила в среднем $M=7,55$ балла. Подвижность спермиев после замораживания составляла: соответственно: 6,5 и 4,63; 4,47; 3,85; 3,0 и 2,0 балла, в % к первоначальной оценке (относительный показатель): 72,2; 57,75; 59,60; 55,00; 46,5; 33,3 % брака: 0,0; 4,5; 7,05; 23,82; 50,0; 100,0. Средний балл подвижности составил 4,35 балла - или 57,61 % от исходной. Процент брака ниже 4,0 баллов 13,1 % (30 эякулятов), ниже 3 баллов - 6,14 % (14 эякулятов).

Данные исследований показывают о прямой коррелятивной зависимости результатов замораживания от подвижности спермиев при получении $r=0,81$.



Исходя из полученных материалов, перспективным направлением исследований является разработка и создание комфортных условий содержания высокоценных быков-производителей и их сбалансированного кормления по всем показателям энергетического, аминокислотного, микро и макроэлементного состава с учетом режима использования.

К сожалению, работ в этом направлении исследований за последние десять лет недостаточно [14-15]. По приведенным показателям можно провести системный анализ эффективности работы по криоконсервации спермы быков, работающих госплемстанций в Украине.

В табл. 2 приведены материалы опытов по переживаемости нативной и заморожено-оттаянной спермы быков в зависимости от уровня живых и мертвых спермиев.

2. Качество спермы быков с различным процентом живых и мертвых спермиев

Показатели качества спермы (M±m)											
Подвижность, баллы				Переживаемость, часы				Живучесть Sa, усл.ед.			
Количество мертвых спермиев, %											
0	50	75	90	0	50	75	90	0	50	75	90
Переживаемость свежеразбавленной спермы в 2,9% растворе цитрата натрия (n=27)											
8,0	3,9	2,8	1,7	9,2	8,8	8,3	7,2	44,4	24,7	15,4	8,8
0,21	0,11	0,3	0,3	0,66	0,39	1,06	1,06	5,14	2,97	2,27	2,07
Переживаемость заморожено-оттаянных спермиев в открытых гранулах с разным процентом мертвых спермиев											
3,5	2,0	1,0	-	4,9	1,7	1,3	-	4,9	1,2	0,7	-
0,4	0,15	0,7	-	1,12	0,17	0,1	-	0,1	0,21	0,14	-

Из приведенных материалов видно, что наивысшие показатели подвижности и выживаемости были в контрольной пробе без добавления мертвых спермиев (8,0 баллов, 9,2 часа, 44,4 усл.ед). После добавления к нативной сперме 50,0 % и 75,0 % мертвых спермиев эти показатели существенно снизились соответственно до 3,9 и 2,8 балла ($p=0,05$); 8,8 и 8,3 часа ($p<0,05$); 24,7 и 15,4 усл.ед ($p < 0,001$). Увеличение доли мертвых спермиев до 90,0 % достоверно снизило подвижность до 1,7 балла ($p<0,001$), выживаемость до 7,2 часа ($p<0,05$) и живучесть до 8,8 единицы ($p<0,001$). Таким образом, переживаемость половых клеток в сперме зависит от наличия в ней мертвых спермиев и чем выше их уровень, тем ниже подвижность, переживаемость и абсолютный показатель живучести живых спермиев.

Анализ показывает (см. табл. 2), что переживаемость половых клеток, подвергшихся криоконсервации, значительно ниже чем в свежеразбавленной сперме с сопоставимой подвижностью, то есть с аналогичным содержанием мертвых спермиев.

Установлено, что подвижность спермиев существенно зависела от количества мертвых спермиев в пробе ($p<0,001$). Переживаемость спермиев также существенно снижалась при повышении уровня мертвых клеток ($p<0,01$). Так выживаемость свежеразбавленной спермы с подвижностью 3,9 балла составляла 8,8 часа и живучесть 24,7 единиц, а переживаемость деконсервированной спермы с аналогичной подвижностью 3,6 балла 4,9 часа и живучестью 4,9 ед. ($p<0,01$.)

Полученные данные показывают более высокую чувствительность спермиев после криоконсервации к токсическому воздействию мертвых половых клеток. Переживаемость оттаянной спермы в открытых гранулах с наличием 75,0% мертвых клеток составляла лишь 1,3 часа, абсолютный показатель



живучести 0,7 усл.ед. в тоже время как спермии с сопоставимым количеством мертвых клеток (75,0%), не подвергшейся криоконсервации переживала 8,3 часа и показатель живучести составил 15,4 усл.ед.

Таким образом, можно сделать заключение, о том, что в процессе криоконсервации спермы оставшиеся в ней живые спермии более подвержены негативному воздействию мертвых клеток, чем в свежеразбавленной сперме.

Можно предположить, что одна из причин низкой переживаемости спермиев, перенесших криогенную обработку – это переход в активное состояние ферментов и радикалов, что приводит к сокращению выживаемости оставшихся живых спермиев. Использование в разбавителях для замораживания спермы веществ, снижающих негативное влияние мертвых спермиев на живые, одна из первоочередных задач в совершенствовании криозащитных сред.

Методику приготовления спермы с различным уровнем живых и мертвых спермиев можно использовать в учебном процессе.

Выводы:

1. Результативность криоконсервации спермы быков-производителей зависит от исходной подвижности нативной спермы. Чем выше подвижность спермиев при получении, тем больше сохраняется количество живых спермиев.
2. Добавление мертвых спермиев к живым снижает переживаемость последних нами установлена коррелятивная связь между этими показателями ($r=0,707$).
3. Показано, что деконсервированные спермии более чувствительны к токсическому воздействию мертвых клеток, чем спермии которые не подвержены криоконсервации.

Библиографический список

1. Осташко Ф.И. Длительное сохранение семени быков при температуре - 183⁰С (на укр. яз.) / Ф.И. Осташко // Соціалістичне тваринництво. - 1959. - № 11. - С. 36-39.
2. Бугров А.Д. Замораживание семени быков-производителей / А.Д. Бугров // Животноводство. - 1965. - № 7. - С. 70-72.
3. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф.И. Осташко.- К.: Урожай, 1978.- 256 с.
4. Бугров А.Д. Исследование причин гибели спермиев при их глубоком замораживании с различными криофилактическими соединениями / А.Д. Бугров // Доклады научно-производственной конференции по биологии размножения и искусственного осеменения к 100-летию со дня рождения И.И. Иванова.- Аскания-Нова, 1970.- С. 50-52.
5. Осташко Ф.И. Разработка вопросов теории и практики глубокого охлаждения и длительного хранения спермы производителей: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра. биол. наук. /Осташко Ф.И. - Х., 1968.- 55 с.
6. Бугров А.Д. Критические зоны при оттаивании спермы быков и их влияние на выживаемость спермиев / А.Д. Бугров, Т.И. Олексенко // Сельскохозяйственная биология.- 1977.- Т. XII, № 3.- С. 368-370.
7. Бугров А.Д. Изучение криозащитных свойств ряда соединений при замораживании спермы быков / А.Д. Бугров // НТБ, № 28 / НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР.- Х., 1980.- С. 73-77.
8. Осташко Ф.И. Температурные градиенты и термодинамические процессы в биологических системах / Ф.И. Осташко, В.Ф. Осташко.- Харьков, 2008.- 30 с.



9.Бугров А.Д. Используя замороженную сперму / Бугров А.Д., П.А. Кравченко // Молочное и мясное скотоводство.- 1968.- № 4.- С. 22-23.

10.Осташко Ф.И. Рекомендации по замораживанию и хранению спермы быков при температуре минус 196 °С / Ф.И. Осташко, А.Д. Бугров. - Х.: Прапор, 1968.- 32 с.

11.Бугров А.Д. Влияние состава разбавителя и способа замораживания на качество спермы / А.Д. Бугров, Н.И. Шинкаренко // Тезисы докладов к научно-производственной конференции по теории и практике воспроизведения сельскохозяйственных животных. - Х.: Прапор, 1972.- С. 68-71.

12.Бугров А.Д. Влияние мертвых спермиев на выживаемость живых в свежеразбавленной и заморожено-оттаянной сперме быков и хряков /А.Д.Бугров, С.А. Сидашева /Криоконсервация репродуктивных клеток и эмбрионов: Сб.научн. тр. / Институт проблем криобиологии и криомедицины.-Х., 1992. – С. 14-20.

13.Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии / В.С. Асатиани. - М.: Наука, 1965.- 544 с.

14.Соклакова А.В. Влияние сорбентов на жизнеспособность спермы быков, замороженной по разным технологиям криоконсервации / А.В. Соклакова, А.Б. Сушко, М.С. Савельева, М.Е. Романько // НТБ, № 97 /ІТ УААН. – 2008. – С. 146-152.

15.Ткачов О.В. Захисний вплив антиоксидантів на репродуктивні властивості жеребців / О. Ткачов, О.Сушко, С. Шапавалов, М. Долгая // Тваринництво України, 2008. - №3. – С. 30-33.

ЯКІСТЬ СПЕРМИ БУГАЇВ ДО І ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

Бугров О.Д., Сідашова С.О., Інститут тваринництва УААН

У статті показано, що збереженість спермійв бугаїв при її криоконсервації в рідкому азоті повною мірою залежить від початкового рівня рухомих спермійв. Встановлено, що при початковій оцінці нативної сперми в 9; 8; 7,5; 7,0; 6,5 і 6,0 балів одержано після заморожування 6,5; 4,63; 4,47; 3,85; 3,0 і 2,0 бали, що склало в % від початкової рухливості 72,0; 57,88; 59,60; 55,00; 45,10; 33,3 % і браку: 0,0; 4,5; 7,05; 23,82; 50,0; 100,0, відповідно. Показано негативний вплив мертвих спермійв на переживаємість живих. Встановлено високий взаємозв'язок цих показників.

Ключові слова: сперма бугаїв, якість, рухливість, переживаємість, криоконсервація, кореляція.

BULL SEMEN QUALITY PRIOR AND AFTER FREEZING PRESERVATION

Bugrov O., Sidashova S.; Institute of animal science, UAAS

This article highlights the experimental research results on bull semen quality prior and after freezing preservation. Survival rate of fresh harvested semen proved to be dependent on initial motility rate during freezing preservation in liquid nitrogen. Initial fresh harvested semen evaluation was fulfilled in the 9; 8; 7,5; 7,0; 6,5; 6,0 grade scale. After freezing 6,5; 4,63; 4,47; 3,85; 3,0; 2,0 grade decrease was observed. Percentage forms 72,0; 57,88; 59,60; 55,00; 45,10; 33,3%. Culling percentage rate equals 0,0%; 4,5%; 7,05%; 23,82%; 50,0% and 100% respectively. Negative death spermatozoon rate impact on survival rate was proved. Correlation analysis was fulfilled. Perfect correlation between the parameters was observed.

Key words: bull semen, quality, motility rate, survival rate, freezing preservation, correlation.