

УДК 591.463.11

*Е. Ю. Гуминская, С. С. Бабаева***МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛНОЦЕННОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

Приведены результаты изучения динамики патологических форм сперматозоидов и число сперматозоидов с поврежденной акросомой, а также взаимосвязь показателей лабораторной оценки с выживаемостью in vivo и оплодотворяющей способностью. Установлено, что в свежесполученной сперме содержание патологических форм сперматозоидов в среднем составило $8,7 \pm 0,7\%$, сперматозоидов с поврежденной акросомой – $3,6 \pm 0,4\%$. После разбавления спермы, замораживания и оттаивания количество таких клеток увеличилось до $12,0 \pm 0,8\%$ и $7,2 \pm 0,4\%$ соответственно. Оплодотворяемость после осеменения оцененной спермой составила 75,4%.

Введение

Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных является могучим двигателем прогресса в животноводстве. Благодаря фундаментальным исследованиям выдающихся биологов России В. К. Милованова и И. И. Соколовской оно нашло широкое применение во всем мире. В молочном скотоводстве, как ни в одной другой отрасли животноводства, искусственное осеменение является неременным условием быстрого улучшения племенных и продуктивных качеств животных. Благодаря искусственному осеменению во многих странах прогрессивно увеличивается генетический потенциал животных, и продуктивность их превышает 7–9 тыс. килограммов молока за лактации. Достижение высоких показателей продуктивности стало возможным при использовании высокоценных быков-производителей и качественной оценке полученных эякулятов. В настоящее время 5 госплемпредприятий Республики Беларусь укомплектованы высококлассными племенными быками. Кроме оценки племенной ценности быков-производителей, особое внимание уделяют лабораторной оценке полученных эякулятов. Цель оценки – определить биологическую полноценность сперматозоидов, т. е. способность вызвать оплодотворение и дать начало здоровому потомству. Проводят макроскопическое исследование (объем, внешний вид, запах) и микроскопическое (концентрация, подвижность). В своей работе мы дополнительно определяли патологические формы сперматозоидов, количество сперматозоидов с поврежденной акросомой (в свежей сперме и после замораживания), выживаемость сперматозоидов in vivo (в половых путях самки) и оплодотворяющую способность спермы.

Цель исследований: выявить закономерность между количеством патологических форм сперматозоидов, сперматозоидов с поврежденной акросомой и их выживаемостью in vivo и оплодотворяющей способностью.

Методика проведения исследований. Были исследованы дуплетные эякуляты 33 быков-производителей. Исследования проводились в Могилевском и Барановичском госплемпредприятиях, в лаборатории кафедры природопользования и охраны природы УО МГПУ имени И. П. Шамякина.

Содержание в эякуляте патологических форм сперматозоидов изучали при просмотре под микроскопом специально приготовленных для этой цели мазков по методике, описанной G. W. Saliabury and N. L. Van Demark [1], [2]. Отобранные с помощью дозатора пипеточного образцы спермы быка разбавляли 2,9% раствором натрия цитрата (1 мл). Температуры предметных стекол, наконечника дозатора, разбавителя и спермы перед смешиванием были одинаковыми (37–38° С). Затем небольшую каплю разбавленной спермы наносили на предметное стекло, а другим стеклом осторожно размазывали ее. Высушенные мазки в течение 2 минут окрашивали анилиновым генцианвиолетом, затем быстро промывали водой из-под крана и дистиллированной водой. После высушивания дополнительно окрашивали карболовым фуксином Циля в течение 10–15 секунд. Классифицировали ненормальности сперматозоидов как первичные (главные),

вторичные и третичные. Первичные относятся к головке или акросоме клетки (головки могут быть двойными, конусообразными, грушевидными, круглыми, сморщенными, большими, узкими и разорванными), вторичные связаны с наличием цитоплазматической капельки в средней части хвоста и третичные – с другими дефектами тела и хвоста (двойные, сломанные, изогнутые, закрученные, срезанные, извитые) [3], [4].

Частоту морфологических повреждений акросомы сперматозоидов определяли акроскопическим способом по методике, разработанной под руководством И. И. Соколовской [5]–[7]. Определение произведено при помощи микроскопа БИОЛАМ, оснащенного окулярами $\times 15$ и объективом $\times 40$, конденсором светлого и темного поля марки ОИ-19. Просмотр образцов спермы осуществляли в стерильном 10-процентном водном растворе желатина (рН = 7,0). Нативную, или оттаянную, сперму быка разбавляли раствором желатины в соотношении 1:1 для снижения интенсивности движения сперматозоидов. Затем каплю разбавленной таким образом спермы наносили на предметное стекло пастеровской пипеткой и накрывали покровным стеклом. Излишний раствор удаляли при помощи фильтровальной бумаги. Приготовленные мазки немедленно микроскопировали [8].

Процедуру извлечения сперматозоидов выполняли при помощи инструмента для извлечения зародышей. Во всех случаях для промывания матки использовали фосфатно-солевой буфер (среду Дюльбекко) в объеме 10 мл. После промывания измеряли объем полученной жидкости и определяли в ней путем подсчета в счетной камере концентрацию сперматозоидов в одном мл. Затем делали перерасчет числа клеток на 10 мл среды. Общепринятым методом определяли под микроскопом наличие подвижных клеток.

Половую охоту выявляли путем регулярного наблюдения за животными. Учитывали характер их поведенческих реакций, изменения в состоянии половых органов, а в начале эксперимента – результаты осмотра преддверия влагалища и ректального исследования матки и яичников.

Принимали во внимание, что для начала охоты более характерно беспокойство животного, усиление двигательной активности, попытки контакта с другими животными, садка на них или позволение другим животным садки на себя (проявление рефлекса неподвижности). Из половой щели можно было заметить выделение прозрачной, с голубоватым оттенком жидкой слизи, эластичность которой по мере нарастания признаков охоты возрастала. Нередко отмечалось наличие слизи на вульве, корне хвоста, седалищных буграх. Хорошо выражена отечность и гиперемия наружных половых органов.

По истечении 12–18 часов к концу охоты двигательная активность снижалась, животное успокаивалось, неохотно допускало на себя садку другого животного, уменьшалась частота прыжков на других животных. Из половой щели в момент исследования можно было видеть выделение густой мутноватой слизи.

После определения состояния охоты животное осеменяли ректо-цервикальным способом. Сперму вводили в тело матки. Извлекали сперматозоиды из верхушки рога матки в различные сроки после осеменения.

Результаты исследования и их обсуждение

В эксперименте эякулят каждого быка-производителя, кроме общепринятых методов, дополнительно подсчитывали патологические формы сперматозоидов и число сперматозоидов с поврежденной акросомой. Оценку проводили как в нативной сперме, так и после разбавления. Только после соответствия вышеперечисленных показателей оценке «хорошо» и «отлично» использовали сперму для дальнейшей оценки на выживаемость *in vivo* и оплодотворяющую способность. Разбавляли сперму стандартной лактозо-желточно-глицериновой средой.

Для разбавления использовали сперму с начальной активностью 8,0 баллов, концентрацией сперматозоидов в сперме от 1,3 до 1,5 млн/мл. Процент патологических сперматозоидов не превышал $8,7 \pm 0,7\%$. Причем количество с первичными дефектами было незначительным – в среднем $0,6 \pm 0,1\%$, число клеток с вторичными повреждениями – $2,6 \pm 0,3\%$, с третичными – $5,4 \pm 0,4\%$. Сперматозоидов с повреждениями акросомы было $3,6 \pm 0,4\%$.

После замораживания и оттаивания начальная активность спермы оценивалась 4 баллами. Процент дефектных клеток увеличился до $12,0 \pm 0,8\%$, наибольшее увеличение сперматозоидов было с третичными повреждениями (двойное тело, сломанные, изогнутые, закрученные хвосты) – $7,1 \pm 0,6\%$. Число клеток с первичными повреждениями увеличилось почти в два раза – $1,5 \pm 0,2\%$. Сперматозоидов с вторичными повреждениями увеличилось незначительно – на $0,9\%$. Количество сперматозоидов с поврежденной акросомой увеличилось до $7,2 \pm 0,4\%$ (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели качества спермы свежеполученной и после разбавления

Показатели	Свежеполученная сперма	Замороженная сперма
n = 33	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$
Патологические формы сперматозоидов (%), всего	$8,7 \pm 0,7$	$12,0 \pm 0,8$
в т. ч. первичные	$0,6 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$
вторичные	$2,6 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,3$
третичные	$5,4 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,6$
Сперматозоидов с поврежденной акросомой, %	$3,6 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,4$

Оцененную сперму проверяли на выживаемость *in vivo*. Для осеменения использовалась сперма, разбавленная так, чтобы в одной дозе находилось 37–38 млн сперматозоидов, и после оттаивания (при активности 4 балла) было около 15 млн подвижных клеток. Вся доза спермы вводилась в тело матки и, очевидно, распределялась в двух рогах матки. Если распределение было относительно равномерным, то в каждый рог должно было попасть около 19 млн сперматозоидов. Извлечение проводилось только из верхушки того рога матки, на стороне которого в яичнике созрел фолликул.

Из 60 процедур промывания матки коров и телок через 18 часов или 24 часа после осеменения только в 8 случаях не были обнаружены сперматозоиды в извлеченной жидкости. При осеменении коров и телок и вымывании через 18 часов число извлеченных сперматозоидов у коров составило – $31,6 \pm 5,4$ тыс., у телок – $38,0 \pm 6,2$ тыс. (таблица 2). Причем извлеченные сперматозоиды у телок сохраняли подвижность. Количество извлеченных сперматозоидов через 24 часа как у коров, так и у телок снизилось на $22,1 \pm 3,4$ тыс. и $21,0 \pm 3,0$ тыс. соответственно. Осеменение в конце охоты с последующим вымыванием через 18 часов число извлеченных сперматозоидов было больше – $37,5 \pm 4,0$ тыс., но при осеменении в начале охоты извлекали подвижные сперматозоиды. Извлечение через 24 часа привело к таким же результатам, но подвижность сперматозоиды сохранили только при осеменении в конце охоты. Следовательно, как у коров, так и у телок количество сперматозоидов в верхушках рогов матки с течением времени уменьшалось. Вполне вероятно, что это уменьшение связано с продолжением процесса перераспределения сперматозоидов по мере приближения овуляции, после чего они инициируются вышедшей из фолликула яйцеклеткой и перемещаются к месту оплодотворения, т.е. в яйцевод. При естественном осеменении сперматозоиды сначала попадают во влагалище и на шейку матки, затем в шейку матки и после этого в тело и рога матки, где в течение охоты постоянно изменяется состав среды. Происходят последовательно и изменения в сперматозоидах. При слишком раннем осеменении, по-видимому, нарушалась последовательность происходящих в сперматозоидах в процессе капацитации изменений, и это сказалось отрицательно на их распределении и выживаемости, а также на характере морфологических изменений.

Таблица 2 – Накопление и выживаемость сперматозоидов в матке коров и телок

Животные и сроки осеменения в течение охоты	Число извлеченных сперматозоидов, тыс.	Выживаемость сперматозоидов, %*
Извлечение сперматозоидов через 18 ч		
Коровы	31,6 ± 5,4	56,6
Телки	38 ± 6,2*	72,9*
Извлечение сперматозоидов через 24 ч		
Коровы	22,1 ± 3,4	41,6
Телки	21,0 ± 3,0	37,8
Извлечение сперматозоидов через 18 ч		
В начале	20,6 ± 4,5*	25,0
В конце	37,5 ± 4,0	85,9
Извлечение сперматозоидов через 24 ч		
В начале	18,0 ± 2,4	16,7
В конце	24,5 ± 3,5	55,5*

*% – процент животных, у которых сперматозоиды сохранили подвижность.

В обоих случаях после извлечения большинство сперматозоидов было деформировано, головки оторваны от тела в области шейки, передняя часть головок разбухшая.

Если осеменение проводилось в конце охоты, то извлеченные сперматозоиды в большинстве случаев оставались целостными, иногда с деформированными, набухшими головками (особенно в передней части) и закрученными хвостиками, но нередко с сохраненной подвижностью.

Оцененной спермой осеменено 114 животных, в т. ч. 84 коровы и 30 телок (таблица 3). Из них осеменено первый раз 111 животных и еще 3 животных после проявления повторных охот. При отсутствии оплодотворения осеменение проводили повторно такой же спермой, а при необходимости осеменяли животных и третий раз. Результаты осеменения учтены после ректального исследования подопытных животных. Оплодотворяемость после первого осеменения как у коров, так и у телок была достаточно высокая – 76,8% и 72,4% соответственно. Повторное осеменение проводилось у 2 животных (1 корова и 1 телка). Одно животное осталось неоплодотворенным – корову осеменяли третий раз. В среднем по группе оплодотворяемость составила 75,4%.

Таблица 3 – Результаты осеменения коров и телок

Показатели	Всего	В том числе	
		коров	телок
Первое осеменение, всего	111	82	29
в т. ч. плодотворно	84	63	21
%	75,6	76,8	72,4
Повторное осеменение, всего	2	1	1
в т. ч. плодотворное	1	–	1
%	50,0	–	100,0
Оплодотворилось в среднем	75,2	5,9	73,3
Третье осеменение, всего	1	1	–
в т. ч. плодотворное	1	1	–
Всего проведено осеменений	114	84	30
в т. ч. плодотворных	86	64	22
%	75,4	76,1	73,3

Выводы

1. Процент патологических форм сперматозоидов в нативной сперме не превышал $8,7 \pm 0,7\%$. Сперматозоидов с повреждениями акросомы было $3,6 \pm 0,4\%$. После замораживания и оттаивания количество дефектных клеток увеличилось до $12,0 \pm 0,8\%$. Количество сперматозоидов с поврежденной акросомой увеличилось до $7,2 \pm 0,4\%$.

2. Исследование выживаемости сперматозоидов в матке коров подтвердили общепринятое мнение: осеменять животных лучше в конце охоты перед овуляцией. Хотя количество вымытых сперматозоидов через 24 часа после осеменения в конце охоты было небольшим ($24,5 \pm 3,5$ тыс.), но они сохраняли подвижность. Достоверной разницы между количеством извлеченных сперматозоидов у коров и у телок не выявлено.

3. Оплодотворяемость оцененной спермы в среднем составила $75,4\%$. Применяемые методы исследования спермы и лактозо-желточно-глицериновая среда для ее разбавления не обеспечивают необходимого качества сперматозоидов. Оплодотворяемость по сельскохозяйственным предприятиям в среднем по республике не превышает 50% .

Литература

1. Salisbury, G. W. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle / G. W. Salisbury, N. L. Van Demark. – San Francisco : Freeman & Company 1st ed, 1961. – 639 p.
2. Валюшкин, К. Д. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных : учеб. для высш. учеб. заведений / К. Д. Валюшкин, Г. Ф. Медведев. – 2-е изд., перераб. и доп. – Минск : Ураджай, 2001. – 869 с., ил.
3. The artificial insemination and Embryo transfer of dairy and beef cattle (including information pertaining to goats, sheep, horses, swine, and other animals). A handbook and laboratory manual. Herman / Mitchell / Doak. Interstate publishers, INC, 1994. – 352 p.
4. Турчанов, С. О. Оценка и отбор быков-производителей по воспроизводительной способности : дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.01 / С. О. Турчанов. – Жодино, 2000. – 82 с.
5. Лебедев, Н. А. Устойчивость к замораживанию и оплодотворяющая способность спермы быков в зависимости от условий ее получения и разбавления : дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.01 / Н. А. Лебедев. – Горки, 2000. – 82 с.
6. Показатель биологической полноценности оттаянной спермы быков и влияние его на оплодотворяемость коров / Г. Ф. Медведев [и др.] // Международный аграрный журнал. – 2000. – № 1. – С. 35–37.
7. Антитела к семенной плазме кроликов и их влияние на результативность осеменения / И. И. Соколовская [и др.] // Вестн. с.-х. науки. – 1988. – № 7. – С. 45–52.
8. Мордань, Г. Г. Метод оценки качества свежезятой спермы быков-производителей / Г. Г. Мордань // Исследования молодых учёных в решении проблем животноводства : материалы II Междунар. науч.-практ. конф. молодых учёных и преподавателей с.-х. учеб. заведений и науч.-исслед. учреждений. – Витебск, 2002. – С. 184.

Summary

We have presented the results of studying of the dynamics of pathological spermatozoa forms and a number of spermatozoa with damaged acrosome as well as interrelation of indicators of a laboratory estimation with survival rate in vivo and impregnating ability. We have established that the content of pathological forms of spermatozoa in freshly obtained sperm has on the average made $8,7 \pm 0,7\%$, spermatozoa with damaged acrosome – $3,6 \pm 0,4\%$. After sperm dilution, freezing and thawing the quantity of such cells has increased to $12,0 \pm 0,8\%$ and $7,2 \pm 0,4\%$ accordingly. Fertilization after insemination by the estimated sperm has made $75,4\%$.

Поступила в редакцию 07.04.10.