

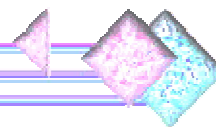
Е. Ю. ГУМИНСКАЯ, С. С. БАБАЕВА

ОПЛОДОТВОРЯЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ

Введение. Одним из важных условий эффективного ведения молочного скотоводства является поддержание физиологически обоснованного ритма воспроизводства животных и равномерность проведения отелов по сезонам года. Устранение значительных сезонных колебаний в обеспечении животных полноценным кормлением, предоставление им оптимальных условий содержания, а также применение искусственного осеменения позволяют достигать высокого уровня воспроизводства стада.

Следует отметить, что в молочном скотоводстве, как ни в одной другой отрасли животноводства, искусственное осеменение является непременным 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. кг молока за лактацию.

Крупные достижения в области селекции и молочной продуктивности скота в последние годы не снизили значения метода искусственного осеменения, а напротив, повысили его роль. Одновременно возросли и требования ко всем технологическим элементам метода. Особенно большое внимание уделяется разбавлению и хранению спермы [1]. От совершенства технологии разбавления во многом зависит эффективность использования оцененных по потомству высокоценных быков-производителей [2]. Следует, однако, учитывать и то, что результаты использования ценного генетического материала непосредственно в хозяйствах определяются многими другими факторами. Большое значение имеет точность выбора времени осеменения в течение охоты, а также срок сохранения оплодотворяющей способности введенных в половые пути сперматозоидов. Обычно если известно время начала охоты, то осеменение проводится



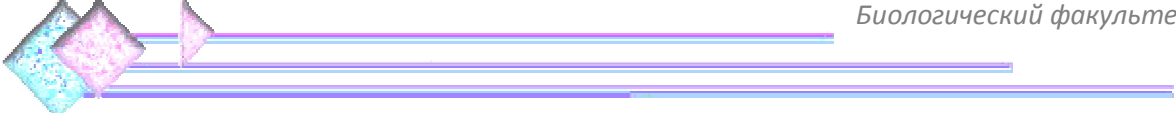
ближе к концу половой охоты, так, чтобы приблизить его ко времени овуляции. В этом случае может не потребоваться повторное осеменение.

В Беларуси двукратное осеменение в течение охоты является обычным. Вызвано это тем, что нередко осеменение проводится не в оптимальное время в течение охоты, а также недостаточно высокой выживаемостью сперматозоидов в половых путях коровы в связи с несовершенной технологией разбавления спермы или неудовлетворительным состоянием матки к моменту осеменения.

Цель работы – выяснить факторы, которые непосредственно влияют на конечные результаты осеменения. Поэтому при выполнении работы большое внимание было уделено методам оценки структурных изменений сперматозоидов при замораживании и оттаивании спермы, а также определению ее оплодотворяющей способности.

Материал и методика исследований. От каждого быка использовано по два дуплетных эякулята. Сперму предварительно оценивали по внешним признакам, густоте, подвижности и концентрации сперматозоидов [3]. Кроме того, определяли процент патологических форм сперматозоидов и с дефектами акросомы по модифицированному методу И. И. Соколовской [4]. Просматривали в препарате 100 сперматозоидов, обладающих прямолинейным поступательным движением, и вычисляли процент клеток с повреждениями акросомы. Бактериологическое исследование проводилось по общепринятому методу.

Содержание в эякуляте патологических форм сперматозоидов изучали при просмотре под микроскопом специально приготовленных для этой цели мазков по методике, описанной у G. W. Saliabury и N. L. Van Demark [5], [6]. Отобранные с помощью дозатора пипеточного образцы спермы быка разбавляли 2,9-процентным раствором натрия цитрата (1 мл). Температура 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

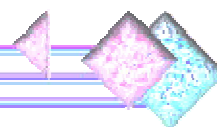


Циля в течение 10–15 секунд. Классифицировали ненормальности сперматозоидов как первичные (главные), вторичные и третичные. *Первичные* относятся к головке или акросоме клетки (головки могут быть двойными, конусообразными, грушевидными, круглыми, сморщенными, большими, узкими и разорванными), *вторичные* связаны с наличием цитоплазматической капельки в средней части хвоста и *третичные* – с другими дефектами тела и хвоста (двойные, сломанные, изогнутые, закрученные, срезанные, извитые) [1]. Для сперматозоидов каждого вида животных характерна своя структура и величина; не исключены и некоторые индивидуальные особенности. Появление в эякуляте значительного числа клеток с явными отклонениями в их структуре (*тератоспермия*) сопровождается понижением плодовитости производителя.

Частоту морфологических повреждений акросомы сперматозоидов определяли акроскопическим способом по методике, разработанной под руководством И. И. Соколовской [4]. 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 желатины (рН = 7,0), изготовленном и расфасованном в УП «Могилевский завод ветеринарных препаратов». 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 [7].

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, попытка 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 ректоцервикальным способом. Сперму вводили в тело матки.

Осеменение проводили в начале охоты или в конце ее. При этом использовали животных с естественной или индуцированной путем введения эстрофана на 10–11-й дни полового цикла охотой. Извлекали сперматозоиды из верхушки одного из рогов матки (ипсилатерального яичнику с созревающим фолликулом) спустя 18 и 24 часа после осеменения.

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 1 мл. Затем делали перерасчет числа клеток на 10 мл среды. Общепринятым методом определяли под микроскопом наличие подвижных клеток.

Результаты исследования и их обсуждение. Эксперименты проведены на Могилевском госплемпредприятии и в лаборатории кафедры природопользования и охраны природы УО МГПУ им. И. П. Шамякина.

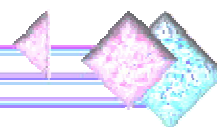
Использованы дуплетные эякуляты 9 быков-производителей. Из данных таблицы 1 видно, что усредненные показатели качества использованной спермы быков-производителей Могилевского племпредприятия достаточно высоки. Начальная активность – 8,0 баллов, концентрация сперматозоидов

в сперме – $1,20 \pm 0,03$ млн. клеток в мл. Сперматозоидов с патологическими формами было несколько больше, чем в предыдущих экспериментах, – $9,6 \pm 0,5\%$. Однако количество их с первичными дефектами было менее одного процента – $0,7 \pm 0,04\%$. Третичные повреждения составили $5,9 \pm 0,4\%$. Сперматозоидов с повреждениями акросомы было менее 5% ($3,8 \pm 0,5\%$).

Таблица 1 – Показатели качества спермы, свежеполученной и замороженной после разбавления ЛЖГ средами

Показатели	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$
<i>Неразбавленная сперма</i>	
Подвижность сперматозоидов, баллов	$8,0 \pm 0,0$
Концентрация сперматозоидов, млрд./мл	$1,2 \pm 0,1$
Патологические формы, всего %	$9,6 \pm 0,5$
в т. ч. первичные	$0,7 \pm 0,0$
вторичные	$2,9 \pm 0,2$
третичные	$5,9 \pm 0,4$
Сперматозоидов с поврежденной акросомой, %	$3,8 \pm 0,5$
<i>Замороженная сперма</i>	
Подвижность сперматозоидов, баллов, ЛЖГ	$3,6 \pm 0,2$
Выживаемость спустя 5 ч, баллов, ЛЖГ	$0,9 \pm 0,1$
Патологические формы, всего %, – ЛЖГ	$15,8 \pm 0,9$
в т. ч. первичные	$2,2 \pm 0,4$
вторичные	$3,8 \pm 0,2$
третичные	$9,9 \pm 0,9$
Сперматозоиды с повреждениями акросомы, %, – ЛЖГ	$10,0 \pm 0,7$

После замораживания и оттаивания показатели качества снизились. Подвижность в среднем оказалась ниже допустимой (4 балла) – $3,6 \pm 0,2$ балла, выживаемость – $0,9 \pm 0,1$ балла. Из числа сперматозоидов с патологическими формами наибольшее количество ($9,9 \pm 0,9\%$) занимали третичные повреждения (дефекты тела и хвоста). Увеличилось количество сперматозоидов с поврежденной акросомой – $10,0 \pm 0,7\%$, что соответствует удовлетворительному показателю качества спермы (8–11%).

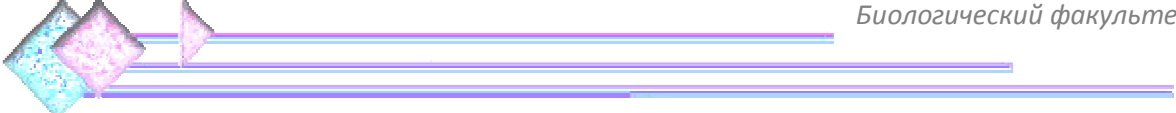


На трех фермах СПК «Овсянка» было продолжено изучение оплодотворяющей способности спермы, разбавленной ЛЖГ средой. Всего было осеменено ЛЖГ средой 80 животных. Из них 62 коровы и 18 телок. Результаты осеменения учтены после ректального исследования подопытных животных спустя 2 месяца.

Из 80 подопытных животных оплодотворилось 59. Всего потребовалось 97 осеменений. Общая оплодотворяемость составила 60,8% (таблица 2). После первого осеменения оплодотворилось 45 животных или 56,3%. После осеменения 14 животных, повторявших охоту, стельными стали 11 или 78,6%. Следует отметить, что в этом эксперименте не подбирались специально контрольная группа животных. Для контроля был использован показатель оплодотворяемости коров и телок, осеменяемых в этот период по этой ферме. Оплодотворяемость составила 60,6%.

Таблица 2 – Результаты осеменения коров и телок спермой, разбавленной ЛЖГ средой

Показатели	ЛЖГ		
	всего	в том числе	
		коров	телок
Первое осеменение, всего	80	62	18
в т. ч. плодотворное	45	36	9
%	56,3	58,0	50,0
Повторное осеменение, всего	14	9	5
в т. ч. плодотворное	11	6	5
%	78,6	66,6	100,0
Оплодотворилось в среднем	48,9	59,1	60,8
Третье осеменение, всего	3	3	–
в т. ч. плодотворное	3	3	–
Всего проведено осеменений	97	74	23
в т. ч. плодотворных	59	45	14
%	60,8	60,8	60,8

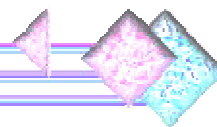


Полученные в результате серии экспериментов данные показали, что ЛЖГ среда не обладает всеми необходимыми для разбавителей свойствами при замораживании спермы в пайеттах. При сохранении достаточно высокой подвижности сперматозоидов после оттаивания и инкубации в течение 5 ч она не в полной мере обеспечивает сохранение структуры сперматозоидов. К такому выводу мы пришли на основании изучения структуры сперматозоидов двумя методами: определением содержания в эякуляте патологических форм сперматозоидов и числа клеток с повреждениями акросомы. Снижение плодовитости может быть обусловлено тем, что продвижение ненормальных сперматозоидов в половом тракте самки к месту оплодотворения нарушено и не накапливается там необходимого числа половых клеток (в половом тракте некоторых видов животных есть места, которые не пропускают сперматозоиды с патологиями) или же с неспособностью таких клеток вызвать оплодотворение и последующее развитие зародыша.

Учитывая, что при проведении экспериментов использованы животные с различным течением послеродового периода и проявлением охоты естественной или индуцированной эстрофаном, мы сначала проанализировали накопление сперматозоидов в верхушках рогов матки и выживаемость их в зависимости от этих факторов.

Из матки животных, которые в послеродовой период проявляли признаки эндометрита, в среднем извлекали $28,5 \pm 3,1$ тыс. ($\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$) сперматозоидов, а у животных без патологии – $25,2 \pm 1,8$ тыс. Разница несущественная ($P > 0,05$). Несущественны различия и в числе животных, у которых обнаруживали подвижные сперматозоиды (54,5% и 35,9%). Прослеживается некоторая тенденция к улучшению показателей у коров, которых лечили в послеродовой период.

Из матки животных, осемененных в естественную охоту, извлекали $26,2 \pm 4,0$ тыс. сперматозоидов, а осемененных в индуцированную охоту – $25,9 \pm 1,6$ тыс. Разница несущественная ($P > 0,1$). Процент животных, в матке которых содержались подвижные сперматозоиды, был выше среди



животных с индуцированной охотой – 42,9% (с естественной охотой – 34,8%). Но и в этом случае разница несущественная.

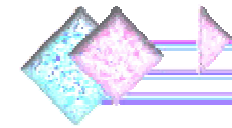
Из рогов матки *телок* в среднем извлекали $25,8 \pm 2,6$ тыс. сперматозоидов, и у 43,2% животных обнаруживались подвижные клетки. Среди животных с естественной охотой эти показатели составили соответственно $27,2 \pm 4,4$ тыс. и 25%, с индуцированной охотой – $24,3 \pm 2,7$ тыс. и 50%. Разница несущественная.

У *коров*, проявивших эндометрит после отела, извлекали из рогов матки $28,5 \pm 3,1$ тыс. сперматозоидов, а у не имевших такой патологии – $24,4 \pm 2,4$ тыс. ($P > 0,05$). Процент животных, у которых находили подвижные сперматозоиды, составил соответственно 26,0 и 54,5% ($P > 0,05$). В индуцированную охоту у коров в матке накапливалось $26,5 \pm 2,0$ тыс. сперматозоидов, у животных с естественной охотой – $17,5 \pm 2,5$ тыс.. Подвижных сперматозоидов обнаруживали только у животных с индуцированной охотой (41,3%). Но у таких животных извлечение чаще проводилось через 18 часов.

Таким образом, не выявлено существенных различий между течением послеродового периода, проявлением охоты (естественной или индуцированной эстрофаном) и накоплением и выживаемостью сперматозоидов в матке коров и телок. Во всех экспериментах при использовании ЛЖГ среды после замораживания и оттаивания увеличивалось число морфологически ненормальных сперматозоидов. В оттаянной сперме содержание их было $15,8 \pm 0,9\%$. Процент сперматозоидов с повреждениями акросомы при использовании стандартного разбавителя после замораживания спермы также увеличивался до $10,0 \pm 0,7\%$, что соответствует требованиям удовлетворительного качества (8–11%). Общая оплодотворяемость при осеменении оцененной спермой составила 60,8%.

Литература

1. 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.



2. Мордань, Г. Г. Совершенствование технологии искусственного осеменения крупного рогатого скота / Г. Г. Мордань, А. И. Будевич // Весці Акадэміі Аграрных навук Рэспублікі Беларусь. Сер. сельгас. навук. – 2002. – № 3. – С. 77–79.

3. Горбунов, Ю. А. Объективная оценка качества спермы быков по подвижности спермиев / Ю. А. Горбунов, В. В. Жаркин // Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения академиков Акад. наук Х. С. Горегляда и М. К. Юсковца, Минск, 10–11 дек. 1998 г. / Витеб. гос. акад. вет. медицины, М-во сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, Акад. аграр. наук Респ. Беларусь, БелНИИ эксперим. ветеринарии им. С. Н. Вышелесского; ред. Н. А. Ковалев [и др.]. – Минск, 1998. – С. 153.

4. 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.

5. Salisbury, G. W. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle / G. W. Saliabury, N. L. Van Demark. Freeman & Company. – 1st ed. San Francisco. – 1961. – 639 p.

6. 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.

7. Мордань, Г. Г. Метод оценки качества свежевзятой спермы быков-производителей / Г. Г. Мордань // Исследования молодых учёных в решении проблем животноводства: материалы II Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и преподавателей с.-х. учеб. заведений и науч.-исслед. учреждений / УО ВГАВМ; под ред. А. И. Ятусевича [и др.]. – Витебск, 2002. – С. 184.