

НОВИЙ КОМПЛЕКСНИЙ ТЕСТ ПРОГНОЗУВАННЯ ЗАПЛІДНЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ СПЕРМІЇВ

Розроблено новий комплексний тест прогнозування запліднювальної здатності спермійів — "терморезистентний тест енергії спермійів", що є сумарним показником зміни їх енергії за перші 2 години життєдіяльності. Енергію спермійів слід визначати на кореляційному доплерівському спектрометрі (ЛАОКС) як похідну маси і швидкості спермійів з прямолінійно-поступальним рухом. Коefіцієнт кореляції даного тесту з фактичною заплідненістю телиць становить: $r=+0,768\pm 0,121$.

Теоретична запліднювальна здатність спермійів, розрахована за терморезистентним тестом їх енергії, має високу достовірність ($P>0,99$) критерію відповідності ($\chi^2=2,76$) фактичній заплідненості телиць від першого осіменіння цією спермою.

Для забезпечення інтенсивного відтворення поголів'я тварин, особливо при широкому використанні кріоконсервованої сперми бугаїв, великого значення набувають досконалі методи її оцінки. Основним критерієм цієї оцінки є запліднювальна здатність спермійів, що зумовлено їх основною біологічною властивістю. Запліднювальну здатність визначають як прямим способом — за результатами осіменіння корів і телиць, так і непрямим — лабораторними дослідженнями нативної чи заморожено-відталої сперми. Оцінка прямим способом трудомістка, довготривала і не завжди об'єктивна, оскільки запліднюваність корів залежить не тільки від якості сперми, але й значною мірою від фізіологічного стану самки, зумовленого впливом зовнішніх і внутрішніх факторів, а також від дотримання вимог штучного осіменіння. Тому прогнозуванню запліднювальної здатності спермійів за допомогою лабораторних методів присвячено значну кількість наукових розробок.

Запліднювальна здатність спермійів зумовлена збереженням як рухових факторів, так і структур головки — ядра і акросоми,

© В.П. Буркат, Л.О. Бегма, А.А. Бегма, 2000

що залежать від стану їх мембран. При криоконсервації сперми дуже часто з'являються "приховані пошкодження" [1]. Це незначні пошкодження мембранних структур спермій, які проявляються лише через деякий час після розморожування в результаті обмінних процесів або прискореного перекисного окислення ліпідів мембран [2]. Тому навіть використання морфологічних методів оцінки стану акросом розморожених спермій не завжди корелює з їх запліднювальною здатністю. Інші тести — оцінка збереження внутріклітинних ферментів, запліднення *in vitro* — виявляють приховані пошкодження і мають високі кореляції із запліднювальною здатністю ($+0,5 \pm 0,9$) [3—5], але через тривалість і труднощі вимірювань можуть використовуватись лише як допоміжні. Враховуючи, що запліднювальна здатність спермій є інтегральним показником, більшість авторів для її прогнозування пропонують використовувати комплексні тести [1, 6].

Найпростішим комплексним методом, який широко використовується в практиці штучного осіменіння, є оцінка виживаності заморожено-відталого сперми [7]. Цей метод легкодоступний, однак він не позбавлений цілої низки недоліків:

1. Він базується на вимірюванні рухливості, а це метод суб'єктивний і має високу ступінь похибки.

2. Тривалість вимірювання за вказаним методом — 5 і більше годин. За цей час проявляються вже не лише "приховані пошкодження" спермій, але й вплив середовища. А оскільки в статевому тракті самки спермії не залишаються в середовищі, його вплив на показники якості сперми повинен бути усунутий.

3. За даними деяких авторів [1], кореляція даного показника із запліднювальною здатністю проявляється лише при використанні низьких концентрацій активних спермій у спермодозі (нижче порогового рівня).

Завдяки цьому загальноприйнятій метод оцінки криоконсервованої сперми за виживаністю може бути лише орієнтовним. Для стандартизації замороженої сперми за запліднювальною здатністю повинні використовуватись нові методи контролю, які відповідали б таким вимогам: об'єктивність; комплексність; швидкість і простота вимірювання; високий рівень кореляції із запліднюваністю самиць.

Розробка нових комплексних тестів прогнозування запліднювальної здатності спермій заморожено-відталого сперми бугаїв і була метою зазначених досліджень.

Методика досліджень. Дослідження проводили на заморожено-відталій спермі бугаїв, що належать Київському і Полтавському обплемпідприємствам.

Якість сперми оцінювали на розробленому нами лазерному аналізаторі якості сперми (ЛАОКС) [9, 10], робота якого базується на використанні методу кореляційної доплерівської спектрометрії. ЛАОКС складається із джерела монохроматичного випромінювання, термостатованого оптичного блоку і IBM-сумісного комп'ютера із периферичним обладнанням. Принцип його роботи полягає в реєстрації розсіяного на рухливих сперміях лазерного світла, який має доплерівський зсув за частотою, і завдяки комп'ютерній обробці обчислюється кореляційна функція наступних показників: рухливість спермій; кількість спермій з прямолінійно поступальним рухом (ППР), виражена в балах (за 10-бальною шкалою); швидкість спермій з ППР (виражається у мкм/с); енергія спермій — новий комплексний показник спермій з ППР, що характеризує здатність забезпечувати їх доставку до яйцеклітини і чисельно залежить від маси рухливих клітин та швидкості їх руху (виражається в умовних одиницях).

Для прогнозування теоретичної запліднювальної здатності показник енергії спермій визначали відразу ж після розморожування сперми і повторно через 2 год її термостатування у водній бані при 38°C.

Крім того, запліднювальну здатність спермій (фактичну) встановлювали прямим методом — після штучного осіменіння корів і телиць в одну охоту в господарствах Київської та Полтавської областей. Облік запліднюваності самок проводили через 3 місяці після осіменіння за результатами ректальних досліджень і відсутності перегулів.

Для порівняння теоретичної і фактичної запліднювальної здатності спермій використовували критерій χ^2 -квадрат [11].

Результати досліджень. Енергія спермій як комплексний показник маси і швидкості спермій з ППР є найбільш інформативним показником із усіх вимірюваних на ЛАОКС. Однак він, як і інші показники, не виявляє клітин з "прихованими пошко-

дженнями". Для того щоб встановити ці пошкодження, після розморожування і першої оцінки проводили інкубацію розмороженої сперми в 2,9%-му розчині цитрату натрію протягом двох годин при 38° С і повторно визначали енергію спермій. Дві години були встановлені тому, що, за нашими даними, саме за цей час уже відбувається зміна енергетичних показників спермій з "прихованими пошкодженнями", але ще не проявляється вплив середовища. Деякі автори [12] також пропонують прогнозувати запліднювальну здатність спермій за повторною оцінкою через дві години і рекомендують назву цього показника як "терморезистентний тест". Тільки оцінку проводять не за енергією спермій, а за їх рухливістю.

На основі результатів дворазового вимірювання ми розраховували сумарний показник енергії спермій за перші дві години після розморожування, який назвали "терморезистентним тестом енергії спермій" (TRT_{2e}) і обчислювали за формулою:

$$\text{TRT}_{2e} = E_0 + 2E_2,$$

де TRT_{2e} — "терморезистентний тест енергії спермій" — показник суми енергії за дві години після розморожування; E_0 — енергія спермій після розморожування (початкова); E_2 — енергія спермій через дві години термостатування сперми при 38°С; 2 — проміжок часу між дослідженнями (дві години).

Дослідження проводили на заморожено-відталій спермі 46 бугаїв, яку спочатку оцінювали за показником TRT_{2e} , а потім визначали фактичну заплідненість корів після їх осіменіння цією спермою.

Результати досліджень свідчать, що після використання сперми з низьким показником TRT_{2e} (25—37 од.) кількість корів, запліднених від першого осіменіння, становила 52% при коливанні від 50 до 54,3% (тобто нижче 55%). З підвищенням "терморезистентного тесту енергії спермій" запліднюваність самиць прогресивно зростала: так, сперма з TRT_{2e} 43 од. мала запліднювальну здатність 60%, 48 од. — 72%, 60 од. — 80,5% і т.д.

Коефіцієнт кореляції показника TRT_{2e} із заплідненістю корів становив:

$$r = +0,622 \pm 0,118 \text{ при } P < 0,001.$$

На основі аналізу зв'язку "терморезистентного тесту енергії спермій" із заплідненістю корів від першого осіменіння цією спермою були виведені його критерії для розрахунку теоретич-

ної запліднювальної здатності заморожено-відталого сперми. Так, сперма низької якості (запліднювальна здатність нижче 55%) мала TPT_{2e} менше 37 од., пониженої якості (55—65%) — 37—45 од., середньої якості (66—75%) — 46—55 од., високої якості (вище 75%) — більше 55 одиниць.

Виробничу перевірку цього критерію прогнозування запліднювальної здатності кріоконсервованої сперми проводили в господарствах Київської області за фактичною заплідненістю телиць від першого осіменіння попередньо оціненою спермою. Для цього були відібрані 30 серій кріоконсервованої сперми і проведена лабораторна оцінка її запліднювальної здатності за "терморезистентним тестом енергії спермій". Фактичну запліднювальну здатність сперми перевіряли за заплідненістю 1000 телиць у 15 господарствах. У кожному з них один і той же технік осіменяв дві групи телиць спермою різної запліднювальної здатності, визначеною за прогнозуючим тестом. Результати виробничої перевірки подані в таблиці у вигляді протокольних даних. Вони свідчать про те, що теоретична запліднювальна здатність спермій, розрахована за комплексним показником TPT_{2e} , в основному відповідає фактичній. У 23 серіях сперми вона була встановлена точно, у 6 випадках теоретичні дані були близькі до фактичних (наприклад, при прогнозуванні заплідненості 65—75% було одержано фактично 77,1; 76; 75,9%). І лише в одному випадку розбіжність становила понад 10%.

Розрахований за даними виробничої перевірки критерій хі-квадрат ($\chi^2 = 2,76$), підтвердив високу достовірність ($P > 0,99$) відповідності фактичної запліднювальної здатності теоретичній, а також те, що одержані розбіжності мають випадковий характер.

Коефіцієнт кореляції "терморезистентного тесту енергії спермій" з фактичною заплідненістю телиць у даному випадку становив: $r = +0,768 \pm 0,121$; при $P < 0,001$. Вищий коефіцієнт кореляції, одержаний при виробничій перевірці, порівняно з попередніми дослідженнями, пояснюється тим, що запліднювальну здатність спермій перевіряли виключно на телицях.

Висновок. "Терморезистентний тест енергії спермій" може бути використаний для визначення теоретичної запліднюваль-

Протокольні дані виробничої перевірки прогнозування запліднювальної здатності спермій

№ п/п	Назва господарства	Серія замороженої сперми	Енергія		ТРТ _{2E}
			0 год E ₀	2 год E ₂	
1	"Княжицький"	33770893	24,6	9,51	43,6
2	"Княжицький"	17610492	39,5	14,1	67,7
3	"Гоголівський"	10160395	19,0	5,87	30,7
4	"Гоголівський"	10170395	30,2	12,03	54,3
5	"Красилівський"	9630395	22,9	12,1	47,1
6	"Бортинчі"	6920497	20,5	7,5	35,5
7	"Бортинчі"	692A0497	20,6	7,8	36,2
8	"Іскра"	6860497	27,3	8,34	44,0
9	"Іскра"	686A0497	31,4	10,35	52,0
10	"Бобрицьке"	193400493	32,6	8,13	48,9
11	"Іванківський"	23660592	34,1	8,34	50,8
12	"Іванківський"	15560492	44,2	16,2	76,6
13	"Воронківський"	5140497	24,0	9,23	42,5
14	"Воронківський"	514A0497	33,9	13,4	60,7
15	"Семиполківський"	684A0497	24,4	8,53	41,5
16	"Семиполківський"	6840497	21,4	8,25	37,9
17	"Плодорозсадницький"	7310497	18,6	1,77	22,1
18	"Плодорозсадницький"	731A0497	13,5	4,23	21,9
19	"Любарецький"	37420496	28,3	8,52	45,3
20	"Любарецький"	54900496	27,8	8,64	45,1
21	"Україна"	440496	29,7	8,43	46,6
22	"Україна"	1370192	18,2	10,7	39,6
23	"Бобрицьке"	774A0497	36,5	10,45	57,5
24	"Бобрицьке"	7740497	20,6	15,6	51,8
25	"Лан"	26540692	41,8	10,5	62,8
26	"Лан"	2140292	36,7	10,9	58,5
27	"Рогозів"	25260692	21,7	10,2	42,1
28	"Рогозів"	2160192	34,1	8,34	50,8
29	"Семиполківське"	1370192	44,9	18,9	82,7
30	"Семиполківське"	23020592	38,3	15,2	68,7

* фактична заплідненість телиць повністю відповідає прогнозованій теоретичній запліднювальній здатності спермій

ної здатності спермій, яка має високу достовірність ($P > 0,99$) критерію відповідності ($\chi^2 = 2,76$) фактичній заплідненості телиць від першого осіменіння цією спермою.

Теоретична запліднювальна здатність, %	Фактична заплідненість телиць, %
55—65	59*
> 75	83,3*
< 55	51,2*
> 75	83,8*
65—75	70,6*
< 55	53,1*
< 55	54,3
55—65	60*
65—75	77,1
65—75	76
65—75	74,2*
> 75	63,3
55—65	59,4*
> 75	70
55—65	68,8
< 55	50*
< 55	54*
< 55	51,4*
55—65	62,3*
65—75	70,2*
65—75	75,9
55—65	56,8*
> 75	70,3
65—75	72,7*
> 75	82,7*
> 75	75,7*
55—65	63,3*
65—75	75*
> 75	80,8*
> 75	89,5*

1. Saacke R.G. Semen quality in relation to semen preservation // J. Dairy.—1983.— 66, № 12. — P. 2635—2644.

2. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Гулевский А.К. Молекулярно-клеточная концепция криоповреждения клетки: роль трансмембранных дефектов // Криобиология.—1987. — № 2. — С. 3—10.

3. Graham J.K., Foote R.H. Dilauroylphosphatidylcholine Liposome Effect on the to Acrosome Reaction and in Vitro Penetration of Zona-Free Hamster Eggs by Bull Spetm // Gamete Research.—1987.— 2. — P. 147—158.

4. Davis A.P., Foote R.H. Relationship of Sire Fertility to Acrosomereacted and Motile Spermatozoa After Treatment with Liposomes // J. Dairy Sci. — 1987. — 70. — P. 850—857.

5. Strzezek J., Swidowicz K. Kryobiochemische Weranderungen an Spermien und deren Befruchtungs kapazität //Zuchthygiene.—1986. — 21. — № 2. — S. 64—70.

6. Мороз Л.Г. Теоретические аспекты низкотемпературной консервации спермы сельскохозяйственных животных. // Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных.—1988. — С. 7—56.

7. Инструкция по организации и технологии работы станций и предприятий по искусственному осеменению с.-х. животных. — М.: Колос.— 1981. —157 с.

8. Пат. 13369, Україна, МКН^д А 61 Д 19/02. Спосіб оцінки якості сперми. // М.В. Зубець, А.А. Бегма, Ф.М. Пеньков та ін.— Опубл. 28.02.97, Бюл. № 1.

9. ДСТУ 3535—97. Сперма бугаїв нативна. Технічні умови.

10. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов. — Минск, 1961. — 220 с.

11. Kozimplic J., Sosnova J. Termorezistentni test spermii a plodnost byku //Veter. Med. — 1985.— 30. — P. 385—392.

Інститут розведення і генетики тварин УААН