

УДК 636.22/.28.082.454

Е. Ю. ГУМИНСКАЯ

**НАКОПЛЕНИЕ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКА
В МАТКЕ КОРОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗБАВИТЕЛЯ СПЕРМЫ
И ВРЕМЕНИ ОСЕМЕНЕНИЯ В ТЕЧЕНИЕ ОХОТЫ**

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия

(Поступила в редакцию 10.12.2005)

Использование искусственного осеменения в молочном скотоводстве является неперенным условием быстрого улучшения племенных и продуктивных качеств животных. Крупные достижения в области селекции и молочной продуктивности скота в последние годы не снизили значения этого зоотехнического метода, а, напротив, повысили его роль. Одновременно возросли и требования ко всем технологическим элементам метода. Особенно большое внимание уделяется разбавлению и хранению спермы. От совершенства технологии ее разбавления во многом зависит эффективность использования оцененных по потомству высокоценных быков-производителей.

Следует отметить, что результаты использования ценного генетического материала непосредственно в хозяйствах определяются точностью выбора оптимального времени осеменения в течение охоты, а также сроком сохранения оплодотворяющей способности введенных в половые пути сперматозоидов. Высокая жизнеспособность половых клеток *in vivo* может сгладить недостатки в определении оптимального времени осеменения и повысить его результативность.

Нами был разработан состав двухфракционной среды для разбавления спермы быка на основе цитратного буфера (ЦЛЖГ). При разбавлении спермы этой средой достигались стандартные показатели выживаемости сперматозоидов *in vitro*, повышалась устойчивость их к замораживанию, что выражалось в уменьшении процента патологических форм сперматозоидов и числа их с повреждениями акросомы после оттаивания. Использование разбавленной ЦЛЖГ спермы для осеменения коров и телок существенно повышало их оплодотворяемость [4, 5], что связано с особенностями распределения их в половых путях коровы и повышением жизнеспособности.

Цель работы – изучение накопления в рогах матки, выживаемости и оплодотворяющей способности сперматозоидов быка при использовании ЦЛЖГ и стандартного (ЛЖГ) разбавителя спермы и осеменении коров в различные периоды охоты.

Материалы и методы исследования. Опыты проводили в лабораториях кафедры физиологии, биотехнологии и ветеринарии и на фермах СПК «Овсянка» Горецкого района.

В экспериментах по изучению числа накапливаемых в верхушках рогов матки сперматозоидов и выживаемости их после осеменения в различные периоды охоты было использовано 34 животных черно-пестрой породы (13 коров и 21 телка). Осеменяли их спермой, разбавленной ЦЛЖГ (опытная группа) или ЛЖГ средой (контрольная группа). Осеменение проводили в начале или в конце охоты. При этом использовали животных с естественной или индуцированной введением эстрофана на 10–11-й день полового цикла охотой. Вымывали сперматозоиды спустя 18 и 24 ч после осеменения.

Половую охоту определяли 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 [6].

После определения состояния охоты животное осеменяли ректоцервикальным способом. Сперму вводили в тело матки [7]. Извлекали сперматозоиды из верхушки рога матки [8] при помощи инструмента для извлечения зародышей. Во всех случаях для промывания матки использовали фосфатно-солевой буфер (среду Дюльбекко) в объеме 10 мл, подогретую до 38°C. После промывания измеряли объем полученной жидкости, определяли под микроскопом наличие подвижных клеток и подсчитывали количество их в счетной камере.

У 10 животных (5 коров и 5 телок) опытной группы и 11 животных (4 коровы и 7 телок) контрольной группы сперматозоиды извлекали из матки спустя 18 ч после осеменения. Через 24 ч извлечение сперматозоидов проведено у 10 животных опытной группы (5 коров и 5 телок) и 9 (5 коров и 4 телки) контрольной группы.

Коров № 612, 037, 56912, 948 и 384 использовали в двух экспериментах, № 147 – в трех, а животное «Белка» – в четырех экспериментах. Всего выполнено через 18 ч 29 процедур и через 24 ч – 21 процедура извлечений сперматозоидов.

В экспериментах использованы коровы-первотелки 2002 г. р., предназначенные по различным причинам для выбраковки. До начала эксперимента у ряда животных регистрировали задержку половой охоты, отсутствие оплодотворения после 1–4 осеменений, аборт или рождение мертвого плода, наличие признаков воспалительного процесса в половых органах.

После аборта или при обнаружении признаков эндометрита до включения в эксперимент животных лечили. Обычно вводили в матку комплекс антибиотических веществ в 50 мл физиологического раствора 2–3 раза с интервалом 3–5 дней. Проводили санацию матки и по окончании каждой процедуры извлечения сперматозоидов. Ни у одного животного не было выявлено каких-либо морфологических отклонений в половом тракте, обнаруживаемых клиническим исследованием.

Большинство используемых в экспериментах телок – интактные животные. Их осеменяли в естественную охоту. Пять животных (№ 696, 108, 912, 142, 808) до использования в эксперименте были дважды осеменены, но не оплодотворились. Для эксперимента охоту у них вызывали введением 2 мл эстрофана.

Помимо проведения этих экспериментов в СПК «Овсянка» на трех фермах было продолжено изучение оплодотворяющей способности спермы, разбавленной ЦЛЖГ и ЛЖГ средами. Использовали сперму 5 быков-производителей. Всего было осеменено 191 коров и телок: спермой, разбавленной ЦЛЖГ средой – 111 животных, ЛЖГ средой – 80 животных.

Данные экспериментов по изучению накопления сперматозоидов в рогах матки и их выживаемости в течение 18 и 24 ч после осеменения животных были обработаны с учетом применяемой среды для разбавления спермы и сроков осеменения в течение охоты. Использовали стандартные программы для ПЭВМ.

Результаты и их обсуждение. Данные, полученные при проведении экспериментов, обобщены в табл. 1.

Из 50 процедур промывания матки коров и телок через 18 или 24 ч после осеменения только в 6 случаях не были обнаружены сперматозоиды в извлеченной жидкости. В опытной группе такой результат наблюдали у одной коровы, в контрольной – у 5 животных (у 2 коров и 3 телок). Эти данные указывают на возможность влияния среды для разбавления спермы на характер распределения введенной дозы спермы в матке и накопление сперматозоидов в верхушке рогов, т.е. там, где формируется их депо до овуляции и момента оплодотворения. Срок промывания матки не влиял на результаты извлечения.

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 бы 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.

Минимальное количество извлеченных половых клеток у коров через 18 ч составило 1,0 млн, максимальное – 5 млн (в среднем по группам $3,0 \pm 0,5$ и $2,4 \pm 0,3$ млн), а через 24 ч – соответственно 0,5 и 3,5 млн ($2,0 \pm 0,4$ и $1,0 \pm 0,3$ млн).

Т а б л и ц а 1. **Накопление и выживаемость сперматозоидов в матке коров и телок**

Животные. Сроки осеменения в течение охоты	Число извлеченных сперматозоидов, млн		Выживаемость сперматозоидов, %*	
	1	2	1	2
<i>Извлечение сперматозоидов через 18 ч</i>				
Коровы	3,0 ± 0,5	2,4 ± 0,3	55,5	37,5
Телки	4,8 ± 0,7	1,1 ± 0,3	60,0	0,0
<i>Извлечение сперматозоидов через 24 ч</i>				
Коровы	2,0 ± 0,4	1,0 ± 0,3	16,6	16,6
Телки	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,5	20,0	25,0
<i>Извлечение сперматозоидов через 18 ч</i>				
В начале	2,9 ± 0,5	1,3 ± 0,4	0	0
В конце	4,1 ± 0,6	2,3 ± 0,4	88,8	37,5
<i>Извлечение сперматозоидов через 24 ч</i>				
В начале	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0	0
В конце	2,3 ± 0,4	1,9 ± 0,3	33,3	40

П р и м е ч а н и е. 1 – сперма, разбавленная ЦЛЖГ; 2 – сперма, разбавленная ЛЖГ.
*% – процент животных, у которых сперматозоиды сохранили подвижность.

У телок через 18 ч извлекали от 1,0 до 7,0 млн (в среднем 4,8±0,7 и 1,1±0,3 млн), а через 24 ч – от 0,5 до 2,5 млн сперматозоидов (1,7±0,2 и 1,2±0,5).

Следовательно, как у коров, так и у телок количество сперматозоидов в верхушках рогов матки с течением времени уменьшалось независимо от используемой среды для разбавления спермы. Вполне вероятно, что это уменьшение связано с продолжением процесса перераспределения сперматозоидов по мере приближения овуляции [9], после чего они инициируются вышедшей из фолликула яйцеклеткой и перемещаются к месту оплодотворения, т.е. в яйцевод.

У коров и телок I группы число извлеченных сперматозоидов независимо от срока промывания матки было более высоким, чем у животных II группы. Однако существенна разница ($P<0,05$) только для телок при проведении процедуры через 18 ч. В это время у 60,0% телок I группы в промывной жидкости из матки присутствовали подвижные сперматозоиды, тогда как ни у одного животного II группы подвижных сперматозоидов не было обнаружено. У коров I группы в это время подвижные сперматозоиды также выявлялись чаще (55,5%), чем в контрольной группе (37,5%).

Большое влияние на накопление и выживаемость сперматозоидов в течение 18 или 24 ч оказало время осеменения в течение охоты. После осеменения в начале охоты у коров и телок в рогах матки содержалось меньше сперматозоидов, чем после осеменения в конце охоты. Разница особенно заметна для животных обеих групп при промывании матки через 24 ч ($P<0,05$).

Между группами животных различия в числе сперматозоидов также были значительными. У коров и телок опытной группы в матке половых клеток содержалось больше, чем у животных контрольной группы ($P<0,05$). Только через 24 ч после осеменения различие между группами не достоверно.

Наиболее существенное влияние срок осеменения в течение охоты оказал на выживаемость сперматозоидов. После осеменения в начале охоты подвижные сперматозоиды не были обнаружены у животных обеих групп и через 24 ч, и через 18 ч.

После осеменения в конце охоты подвижные сперматозоиды обнаруживались через 24 ч у 33,3 и 40,0% животных опытной и контрольной групп, а через 18 ч – соответственно у 88,8 и 37,5% животных.

Наиболее вероятно, что преждевременно размещенные в теле матки сперматозоиды оказывались в неадекватной их функциональному состоянию среде, в которую должны были поступить позднее, когда уже и сама среда могла обладать другими свойствами.

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 [10].

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.

В оба срока 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.

Результаты изучения оплодотворяющей способности спермы, разбавленной ЦЛЖГ и ЛЖГ средами, подтвердили ранее полученные данные о преимуществе ЦЛЖГ среды и полностью соответствуют выводам экспериментов.

Т а б л и ц а 2. Оплодотворяемость коров и телок спермой, разбавленной ЦЛЖГ и ЛЖГ средами

Показатель	ЦЛЖГ			ЛЖГ		
	всего	в том числе		всего	в том числе	
		коров	телок		коров	телок
Первое осеменение, всего	111	82	29	80	62	18
в т.ч. плодотворно	84	63	21	45	36	9
%	75,6	76,8	72,4	56,3	58,0	50,0
Повторное осеменение, всего	2	1	1	14	9	5
в т.ч. плодотворное	1	–	1	11	6	5
%	50,0	–	100	78,6	66,6	100
Оплодотворилось (в среднем), %	75,2	75,9	73,3	48,9	59,1	60,8
Третье осеменение, всего	1	1	–	3	3	–
в т.ч. плодотворное	1	1	–	3	3	–
Всего проведено осеменений	114	84	30	97	74	23
в т.ч. плодотворных	86	64	22	59	45	14
%	75,4	76,1	73,3	60,8	60,8	60,8

Прежде всего следует отметить, что оплодотворяемость коров и телок в опытной группе была в среднем на 14,6% выше, чем в контрольной группе (соответственно 75,4 и 60,8%). Различие характерно и для коров (76,1 и 60,8%), и для телок (73,3 и 60,8%).

Особенно велика разница между группами была в оплодотворяемости после первого осеменения. В опытной группе она составила 75,6% (76,8% для коров и 72,4% для телок) и 56,3% в контрольной (58,0 и 50,0% соответственно).

Выводы

1. Качество спермы, в значительной мере определяемое составом разбавителя и технологией разбавления спермы, а также сроки осеменения в течение охоты оказывают существенное влияние на накопление в верхушках рогов матки и выживаемость сперматозоидов.

2. При осеменении коров и телок спермой, разбавленной ЦЛЖГ средой, в рогах матки накапливалось больше сперматозоидов (от $1,7 \pm 0,2$ до $4,8 \pm 0,7$ млн), а сохранение жизнеспособности в фиксированные сроки отмечалось чаще (33,3–88,8%), чем при использовании спермы со стандартным разбавителем (от $1,0 \pm 0,3$ до $2,4 \pm 0,3$ млн и 37,5–40,0% соответственно). Осеменение животных в конце охоты независимо от разбавителя и способа разбавления спермы способствовало накоплению в матке большего числа сперматозоидов, чем при осеменении в начале охоты.

3. Оплодотворяемость коров и телок, осемененных разбавленной ЦЛЖГ средой спермой, была в среднем на 14,6% выше, чем при разбавлении спермы стандартной средой.

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. P. 114.
2. Семяков В. Г. Криоконсервирование спермы быков и баранов: Обзор. информ. / ВНИИТЭИ агропром. М., 1991.
3. Семяков В. Г. Рациональное использование быков-производителей: Обзор. Информ. / ВНИИТЭИ агропром. М., 1985.
4. Медведев Г. Ф., Гуминская Е. Ю. // Вестник БГСХ. № 1. 2005. С. 81–86.
5. Гуминская Е. Ю. // Весці НАН Беларусі. Сер. аграр. навук. 2005. № 2. С. 79–83.
6. Валушкин К. Д. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных: учебн. пособ. для вузов. Мн., 2001.
7. Песоцкий В. В., Исаченко В. В. // Разведение и искусственное осеменение крупного рогатого скота. 1988. № 20. С. 56–57.
8. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle / Lefebvre Rejean, Chenoweth Peter J. Prost Maarten, Leclear Calvin T., et al. // *Boil Reprod.* 1995. Vol. 53. N 5. P. 1066–1074.
9. Hunter RHF, Flechon B., Flechon JE. Distribution, morphology and trithelium interaction of bovine spermatozoa in the oviduct before and of the ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue and Cll.* 1991. N 23. P. 641–656.
10. Hawk H. W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle // *J. Daire Sci.* 1987. N 70,7. P. 1487–1503.

E. Yu. GUMINSKAYA

ACCUMULATION AND SURVIVAL OF BULL SPERMATIZOIDS IN THE UTERUS OF COWS IN DEPENDENCE ON SPERM DILUENT AND INSEMINATION TIME DURING HUNTING

Summary

Survival rate and accumulation of spermatozoids in the uterus of cows and heifers and their fertility after insemination with sperm diluted with CLYG (citrate-lactose-yolk-glycerin)(test) and LYG (lactose-yolk-glycerin)(control) extenders have been investigated. More spermatozoids accumulated at the uterine horns ($1,7 \pm 0,2$ до $4,8 \pm 0,7$ million, in the control from $1,0 \pm 0,3$ to $2,4 \pm 0,3$ million) and survival rate of bull spermatozoids were much longer ($33,3$ – $88,8\%$, in the control $37,5$ – $40,0\%$) when CLYG extender was used. Insemination of cows at the end of hunting irrespective of diluent and ways of sperm diluting promoted accumulation of grater number of spermatozoids in the uterus than at the beginning of hunt. Fertility rate of cows and heifers in the testing group was higher at $14,6\%$ on average than in the control group.