

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

**УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

Кафедра физиологии, биотехнологии и ветеринарии

БИОТЕХНИКА РАЗМНОЖЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

**ЧАСТЬ 2. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ
САМЦОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ**

**Для студентов специальности 1-74 03 01 – зоотехния
специализаций 1-74 03 01 01 – биотехнология и селекция
животных, 1-74 03 01 03 – птицеводство, 1-74 03 01 06 –
производство свинины на промышленной основе**

Горки 2008

Одобрено методической комиссией зооинженерного факультета 16.07.2008 (протокол № 9).

Составили: Г. Ф. МЕДВЕДЕВ, Н. И. ГАВРИЧЕНКО, И. А. ДОЛИН.

УДК 619:591.16

Биотехника размножения сельскохозяйственных животных.
Часть 2. Получение и оценка качества спермы самцов сельскохозяйственных животных и птиц: методические указания / Белорусская государственная сельскохозяйственная академия; сост. Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, И. А. Долин. Горки, 2008. 52 с.

Приведены по трем темам занятий цель, материалы и оборудование, описаны сущность и использование различных методов получения спермы от производителей сельскохозяйственных животных и птиц и оценки качества ее, дано разъяснение влияния на сперматозоидов физических и химических факторов.

Для студентов специальности 1-74 03 01 – зоотехния специализаций 1-74 03 01 01 – биотехнология и селекция животных, 1-74 03 01 03 – птицеводство, 1-74 03 01 06 – производство свинины на промышленной основе.

Таблиц 4. Рисунков 6.

Рецензент профессор И.С. СЕРЯКОВ.

© Составление. Г.Ф. Медведев,
Н.И. Гавриченко, И.А. Долин, 2008

© Учреждение образования
«Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2008

Тема 4. ПОЛУЧЕНИЕ СПЕРМЫ ОТ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Цель занятий: приобретение студентами навыков обращения с производителями сельскохозяйственных животных и птиц и получение спермы различными методами.

Объекты исследования и оборудование: искусственные вагины для быка, барана, хряка, жеребца; спермоприемники и фильтры; штативы для спермоприемников и искусственных вагин; поролоновая (капроновая) протирка для вагин, кружка Эсмарха; дистиллированная вода, 2–3%-ный раствор натрия гидрокарбоната, 0,02%-ный раствор фурацилина, физиологический раствор, 70%-ный спирт этиловый; тампоны, пропитанные 96%-ным спиртом-ректификатом, марлевые салфетки, вата; стерильный вазелин; компрессор или шары Ричардсона, термометры, стеклянные воронки, пинцеты, корнцанг; бык, баран (козел), хряк, жеребец, чучело свиньи, животное-манекен для получения спермы от быка; овца (коза) и кобыла в охоте; станки для получения спермы от быка и барана, палка-водила для быка; самцы птиц; стеклянная посуда (цилиндры мерные и мензурки емкостью 100, 200, 500 мл), весы; тазы эмалированные, кастрюля эмалированная на 3 – 5 л, ерши и щетки для рук; резиновые или поролоновые губки для рук; полотенца, бумага фильтровальная, пищевая алюминиевая фольга; перчатка резиновая и полиэтиленовые одноразовые; электроэякуляторы для быка и барана; автоклав, сушильный шкаф, термостат для вагин, простой и электрический стерилизатор, бактерицидная лампа; газовая или электрическая плита.

Методические указания. Занятия проводятся в лаборатории и ветеринарной клинике кафедры, на пункте искусственного осеменения свиней (овец, кобыл). На первом занятии студенты должны познакомиться с устройством искусственной вагины, правилами сборки и подготовки и затем под контролем преподавателя научиться собирать и готовить приборы для получения спермы от производителей всех сельскохозяйственных животных.

После этого преподаватель объясняет студентам правила обращения с производителями (быком, хряком, жеребцом, бараном), методы подготовки их для получения спермы. Особое внимание уделяется соблюдению техники безопасности при использовании горячих жеребцов и буйных быков. Студенты, которые не имеют навыков обращения с этими животными, должны строго следовать указаниям преподавателя и действовать только совместно с ним. При этом наибольшую осторожность необходимо проявлять при фиксации производителя в месте его размещения, а также во время подвода к самке (манекену) и первых попытках садки. При работе с хряками следует узнать их норы. Подготовив быка и манекена, один или два студента под

контролем преподавателя получают сперму (1–2 эякулята) и определяют ее внешние свойства. На последующих занятиях сперму получают от барана, жеребца, хряка, а также – от самцов птиц.

4.1. Получение спермы от производителей в искусственную вагину

4.1.1. Устройство искусственной вагины

Искусственная вагина состоит из следующих частей:

цилиндра или корпуса, изготовляемого из толстой вулканизированной резины (для быка и хряка), эбонита (для барана), оцинкованного железа или алюминия (для быка, жеребца, хряка);

тонкостенной резиновой камеры, поверхность которой с одной стороны – гладкая, с другой – несколько шероховатая. Диаметр камеры для быка и жеребца равен диаметру корпуса, для барана – меньше диаметра корпуса, а для жеребца – несколько шире диаметра узкой части корпуса (табл. 1);

Т а б л и ц а 1. Размеры цилиндров и резиновых камер искусственных вагин (см)

Производитель	Цилиндр		Камера	
	Длина	Диаметр	Длина	Диаметр
Бык: российская	30	8	55–65	6,2
европейская	30,35,41	8	65	6,8
Баран	20	4,8 – 5,5	30 – 40	3,3
Хряк	26–41	8	70	6,2
Жеребец	54	13	90	9,3

резиновых колец, которые используются для крепления камеры на корпусе искусственной вагины для быка, хряка и жеребца; для вагины барана кольца не предусмотрены;

краника эбонитового или полиэтиленового (его вставляют в отверстие патрубка на корпусе для регулирования давления при нагнетании воздуха в вагину быка, хряка и барана);

спермоприемника – резервуара, в который попадает сперма после эякуляции. Для вагины быка применяется полиэтиленовый одноразовый спермоприемник; в европейской модели прибора в качестве спермоприемника используется градуированная пробирка (нередко двухстенная). Для барана – спермоприемник одностенный или двухстенный стеклянный. В искусственной вагине для жеребца – спермоприемник резиновый в виде широкого стакана, а для хряка используется специальный пластмассовый спермоприемник или широкогорлая

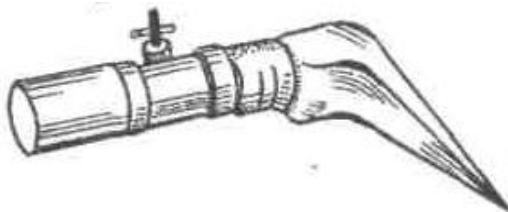
стеклянная банка емкостью 500–1000 мл. При мануальном способе получения спермы от хряка используются сосуды изотермические со специальными мешками с фильтрами;

кладыша полиэтиленового – имеется только в вагине для хряка. Вставляется в вагину со стороны спермоприемника и служит для предотвращения полного смыкания стенок резиновой камеры.

Кроме того, имеются *эбонитовая палочка* для смазывания поверхности резиновой камеры вазелином и поролоновая или капроновая *протирка для мытья вагин*, а также *защитный теплоизолирующий (утеплительный) чехол* для обеспечения необходимой температуры (38°C) при использовании полиэтиленового спермоприемника и градуированной пробирки в европейской модели.

Для быка имеются несколько моделей искусственных вагин, отличающихся размерами и конструктивными особенностями (рис. 1). Чаще используют искусственную вагину укороченную (длина 30 см). На резиновом корпусе таких вагин (диаметр 8 см) имеется воронкообразный патрубок с отверстием для подачи воды и воздуха. В европейской модели вагины для быка (Minitub) – корпус длиной от 30 до 41 см. Камера из латексной резины, коричневатого цвета; поверхность гладкая или шероховатая; патрубок в корпусе металлический, вместо краника – металлическая завинчивающаяся пробка с отверстием для нагнетания воздуха и устройством для герметизации. В качестве спермоприемника используется градуированная пробирка емкостью 15 мл (нередко двустенная); присоединяется спермоприемник при помощи направляющего резинового конуса. Спермоприемник и резиновый конус прикрываются утеплительным чехлом.

а



б

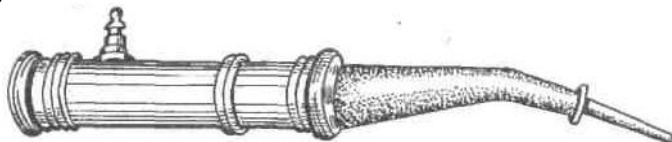


Рис. 1. Искусственная вагина для быка:

а – укороченная с одноразовым спермоприемником; б – европейская модель.

Искусственная вагина для барана конструктивно подобна вагине для быка и отличается лишь размерами и устройством патрубка. Для герметичной фиксации в патрубке эбонитовый краник сначала вставляют в отрезок сложенной вдвое толстой резиновой трубки или в резиновую пробку с отверстием и затем в патрубок вагины. Отверстие в пробке для краника легко сделать при помощи специального прибора. Он состоит из набора заточенных трубок различного диаметра. В верхней (укрепленной) части трубок имеется отверстие для металлического стержня, посредством которого вращают трубку и вырезают отверстие в пробке (рис. 2).

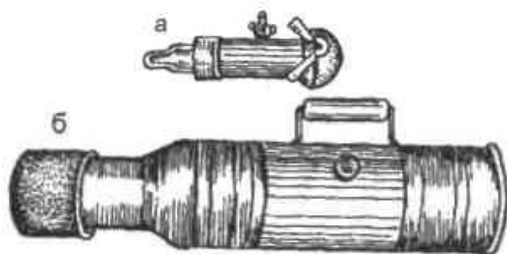


Рис. 2. Искусственная вагина:
а – для барана; б – для жеребца.

Для хряка чаще применяют искусственную вагину, предназначенную для быка, но в зависимости от размера полового члена производителя ее укорачивают на 10–25 см. В моделях приборов для хряков, предложенных в лаборатории А.В. Квасницкого (Полтавский институт свиноводства), цилиндр выполнен из жести; обогрев электрический или водяной; спермоприемник – пластмассовый. В различных странах (Япония, США и др.) предложен ряд более удобных и совершенных моделей вагин для хряка. Однако в связи с повсеместным внедрением мануального способа получения спермы от хряков искусственные вагины в настоящее время почти не используются.

Корпус искусственной вагины для жеребца (длина 54 см) имеет суженную часть (горловину), и на нем укреплена скоба для фиксации рукой при получении спермы. На патрубок для подачи воды навинчивают пробку (возможно с клапаном для выхода воздуха).

4.1.2. Сборка искусственной вагины

Использованные или новые части искусственной вагины (корпус, камеру, фиксирующие резиновые кольца и держатель спермоприемника) тщательно моют горячим 2 – 3%-ным раствором натрия гидро-

карбоната, многократно ополаскивают чистой горячей водой и высушивают. Перед сборкой убеждаются в целостности корпуса вагины и резиновой камеры, в соответствии диаметров отверстия патрубка и краника для подачи воздуха и исправности краника. Если краник проворачивается туго, его слегка смазывают вазелином. Для обнаружения повреждений камеры ее растягивают двумя руками за концы и осматривают каждую сторону; в момент растяжения повреждения хорошо заметны. Неиспользованные новые резиновые камеры выворачивают гладкой поверхностью внутрь. Удобнее это сделать следующим образом: через всю камеру проводят корнцанг и захватывают противоположный конец, затем постепенно выворачивают ее.

Камеру вставляют в корпус, заворачивают концы ее и поочередно натягивают на концы цилиндра. Чтобы не было перекосов, после натягивания одного конца камеры вагину переворачивают вниз и приподнимают за свободный конец камеры, выравнивают ее и натягивают на цилиндр. При натяжении камеры сначала отвернутые края ее двумя руками натягивают на цилиндр, а затем ладонью руки выравнивают просвет. При правильном натяжении камеры диаметр внутреннего просвета искусственной вагины должен быть на всем протяжении одинаковый и не меть складок. Завернутые концы камеры должны быть примерно одинаковой величины; их закрепляют с каждой стороны резиновыми кольцами.

В искусственную вагину для хряка (со стороны спермоприемника) рекомендуют вставить полиэтиленовый вкладыш. Он способствует свободному передвижению спермы в спермоприемник. В качестве спермоприемника используется полулитровая (литровая) банка. Ее присоединяют к вагине при помощи отрезка резиновой камеры; в верхней части отрезка делают небольшое отверстие для выхода воздуха во время эякуляции хряка.

В вагине для барана вследствие разницы в диаметрах резиновой камеры и цилиндра камера натягивается с трудом. Но на цилиндре удерживается прочно и не требует дополнительной фиксации кольцами. При выполнении этой процедуры не следует растягивать камеру, чтобы не допустить образования воронкообразного расширения; камера должна загибаться внутрь под прямым углом.

4.1.3. Порядок подготовки искусственной вагины к работе

Подготовка искусственной вагины включает выполнение следующих последовательных работ:

Мытье искусственной вагины производится после каждого получения спермы с помощью протирки 2–3%-ным раствором натрия углекислого или 1–1,5%-ным раствором кальцинированной соды. После этого вагину тщательно ополаскивают чистой горячей водой

для удаления остатков соды, затем – дистиллированной и высушивают или насухо вытирают полотенцем.

Стерилизация искусственной вагины

Автоклавирование искусственных вагин проводят при температуре 105°C и давлении 0,3–0,5 избыточных атмосфер в течение 15–20 мин. Перед автоклавированием на оба конца искусственной вагины надевают полотняные колпаки или закрывают ее концы пергаментной бумагой.

При кипячении искусственные вагины стерилизуют в кипящей дистиллированной воде не менее 20 мин.

Стерилизация 96%-ным спиртом-ректификатом применяется как дополнительный способ. Спиртовой тампон при этом зажимают корнцангом или пинцетом, вводят инструмент в середину искусственной вагины и тщательно протирают внутреннюю поверхность камеры по направлению к одному концу, затем поворачивают вагину и обрабатывают другую часть камеры.

Стерилизация спермоприемника.

Стерилизация стеклянных спермоприемников кипячением или *автоклавированием* производится при таких же условиях, что и искусственных вагин.

Стерилизация сухим жаром проводится при температуре 160–180°C в течение 40–60 минут (спермоприемник предварительно закрывают крышкой и заворачивают в бумагу). *Стерилизация спиртом:* в спермоприемник наливают 3–4 мл 70%-ного спирта, увлажняют им все участки внутренней поверхности, а затем сливают в банку с отработанным спиртом; наружную поверхность протирают спиртовым тампоном. Для удаления капель спирта спермоприемник 3–4 раза промывают 1%-ным раствором двууглекислой соды или 2,9%-ным раствором натрия лимоннокислого. *Стерилизация фламбированием* производится над некопящим пламенем спиртовки или зажженного спиртового тампона. Сухой чистый спермоприемник захватывают пинцетом, осторожно подносят к пламени и тщательно обжигают наружную и внутреннюю поверхность. Таким же образом обеззараживают и крышку спермоприемника. *Стерилизация полиэтиленовых спермоприемников* проводится с помощью бактерицидных ламп. Спермоприемники раскладывают в один ряд и выдерживают под лампами в течение 40–50 минут.

Заполнение искусственной вагины водой. Вода перед заполнением вагины должна иметь температуру около 60°C, а к моменту получения спермы – 43–45°C. В вагину для быка образца 1942 г. заливают 450–500 мл воды, в укороченную – 200–300 мл; в вагину для хряка – 300–400 мл, для барана 150–180 мл, для жеребца – 1,5–2,0 л.

Заполнение спермоприемника водой. В спермоприемнике для

быка вода должна иметь температуру 30–35°C, для барана – 25–30°C; заливают воду температуры соответственно 35–40 и 30–35°C.

Смазывание резиновой камеры. Внутренняя поверхность резиновой камеры смазывается стерильным вазелином или синтетической средой с помощью эбонитовой палочки, которую предварительно обеззараживают спиртовым тампоном, смоченным в 96%-ном спиртеректификате. Для обеззараживания конец палочки обхватывают тампоном и несколькими движениями назад и вперед тщательно обрабатывают ту часть ее, которая будет соприкасаться с внутренней поверхностью камеры, затем концом палочки берут вазелин из банки и круговыми движениями, начиная с конца вагины, равномерно смазывают поверхность камеры. Отрезок ее (длиной 2–3 см в вагине для барана, 4–6 см – для быка и хряка и 8–10 см – для жеребца) со стороны спермоприемника не смазывается для предупреждения попадания вазелина в сперму.

Присоединение спермоприемника. При использовании одноразового полиэтиленового спермоприемника для быка корпус вагины со стороны спермоприемника обворачивают полоской стерильной фильтровальной бумаги для предупреждения попадания вазелина в сперму. Полоску выдвигают на 1–1,5 см за край корпуса, сверху на корпус вагины одевают спермоприемник и закрепляют его кольцами. В европейской модели вагины спермоприемник в виде стеклянной пробирки прочно укрепляется в узкой части латексной конической трубки, присоединенной к вагине.

В вагине для барана спермоприемник не крепится, но при получении спермы придерживается пальцами. К вагине для жеребца спермоприемник присоединяется одеванием его на узкий конец (горловину); в момент совокупительных движений производителя он удерживается в таком положении рукой. К искусственной вагине для хряка спермоприемник присоединяется при помощи обеззараженного отрезка резиновой камеры с отверстием; отрезок укрепляют на корпусе вагины резиновыми кольцами. К металлической вагине пластмассовый спермоприемник присоединяется посредством специальной резиновой муфты или же отрезка камеры для вагины барана.

Нагнетание воздуха в искусственную вагину. Воздух в вагину нагнетается с помощью баллона, двойных шаров Ричардсона или специального компрессора до смыкания стенок камеры и образования щели или треугольной складки. В искусственную вагину для жеребца воздух не нагнетается, давление создается перемещением в ней воды. В жестяную вагину для хряка воздух нагнетают через тонкий патрубок в пространство между внутренней стенкой корпуса и резиновой камерой. Шары Ричардсона посредством стеклянного тройника соединяют длинными резиновыми трубками с патрубком и манометром

(ртутным или водяным). По показаниям манометра во время получения спермы следят за давлением в вагине и при необходимости понижают или увеличивают его до необходимого уровня: 15–20 мм ртутного или 40–50 см водяного столба. Устройство для нагнетания воздуха имеется и в ряде зарубежных моделей искусственной вагины для хряка. Оно остается присоединенным к кранику в процессе получения спермы. Это необходимо для регулирования давления, к которому очень чувствительны хряки.

Измерение температуры в искусственной вагине. Температуру в вагине проверяют непосредственно перед взятием спермы. Перед измерением вагину несколько раз покачивают для равномерного обогрева ее стенок, поворачивают ее спермоприемником вверх, обеззараживают термометр ватным тампоном, смоченным 96%-ным спиртом-ректификатом и вставляют его в открытый конец вагины. Температура в вагине должна быть не ниже 40°C и не выше 42°C. Но при использовании укороченной вагины с одноразовым спермоприемником или европейской модели температуру устанавливают не ниже 42°C и не выше 55°C.

В лабораториях племпредприятий после стерилизации к вагине присоединяют спермоприемник, заливают в нее воду и помещают в термостат при необходимой температуре. Перед получением вагину смазывают вазелином, затем в нее нагнетается воздух.

4.1.4. Получение спермы от быка

Условия и место получения спермы. Сперму от быка получают на корову, другого быка, вола или же на чучело. Использование быков-производителей в качестве подставных животных неблагоприятно отражается на качестве их спермы, поэтому практикуется редко. Взятие спермы с использованием механических установок более целесообразно по сравнению с подставными животными: снижается микробная контаминация эякулятов, улучшаются условия работы техников, повышаются технологические свойства спермы и удлиняются сроки эксплуатации производителей. Наиболее популярны механическое чучело с амортизирующим устройством и подвижное чучело.

Получают сперму в манеже, а в теплое время года – и на открытой площадке. Манеж должен быть просторным, высотой не менее 4 м, площадью – 70 м² или более. В нем устанавливается одно или несколько чучел и станки (устройства) для фиксации животных-манекенов. Сзади станка или чучела пол покрывают прочными резиновыми матами или ковриками из другого эластичного материала. Возле стенок манежа устанавливают защитные барьеры, обеспечивающие безопасность работы с животными.

Взятие спермы проводят в утренние часы до кормления производителей. Именно такая очередность производственных процессов необходима потому, что одновременное сочетание акта кормления и взятия спермы является одним из факторов, предрасполагающих к развитию импотенции.

Получение высококачественной спермы возможно лишь при условии хорошей подготовки быков непосредственно перед ее взятием. При этом важное место должно отводиться функциональной подготовке. Целостная эффективная система подготовки их к получению спермы включает следующие мероприятия.

1. Гигиена манекена (животного, чучела). До начала работы животных, на которых получают сперму, необходимо тщательно почистить, чтобы во время садки производителя микроорганизмы с частицами грязи и пыли с них не попадали в воздух, на половой член производителя и в искусственную вагину. Если используют чучело, то его моют теплой водой с мылом, высушивают и обеззараживают 2%-ным раствором хлорамина. Можно использовать для мытья и обеззараживания раствор перекиси водорода. Обработку чучела проводят обычно сразу после окончания получения спермы.

2. Гигиена быка-производителя – чистка, подмывание препуция и высушивание. Наружную поверхность препуция обмывают теплым раствором фурацилина и насухо вытирают бумажной салфеткой или туалетной бумагой. Можно использовать индивидуальные полотенца. Если препуций сильно загрязнен, то его моют теплой водой с мылом, а затем обмывают раствором фурацилина. Полностью животное моют за день до получения спермы или не ранее, чем за 1–1,5 ч до получения, и тщательно высушивают.

3. Подвязывание стерильного фартука.

4. Функциональная подготовка к взятию спермы быков молочных пород: ввод в манеж, подвод к манекену, одна холостая садка, выдержка возле манекена 2,5 мин, две холостые садки и получение эякулята. Такая же подготовка и перед получением второго эякулята. При отсутствии фартука во время холостых садок половой член производителя необходимо отводить в сторону, чтобы он не касался манекена или чучела. Быков мясных пород после подвода к манекену не сдерживают, а позволяют сделать три холостых садки, затем берут первый эякулят; второй эякулят обычно получают без предварительных холостых садок.

5. Температура в искусственной вагине с одноразовым полиэтиленовым спермоприемником устанавливается в пределах 45 – 46°C (возможно до 55°C).

6. Проводка производителя и получение второго эякулята не позднее, чем через 10–15 мин.

7. Регулярная смена манекена, замена чучела на манекена или наоборот, смена места получения спермы, присутствие других животных в манеже.

Техника получения спермы от быка. В манеж для взятия спермы вводят быка с помощью палки-водила длиной около 2 м, зафиксированной за носовое кольцо. Производителя подводят к животному-манекену, выдерживают 1–2 мин (не более 3 мин) и допускают садку. В момент прыжка быка оператор, расположенный справа и сзади подставного животного или чучела, левой рукой осторожно смещает за препуциальный мешок половой член производителя в правую сторону и направляет его в искусственную вагину, продольная ось которой в этот момент должна совпадать с направлением полового члена. После совокупительного толчка искусственную вагину с полового члена снимают не сразу, а опускают ее с движением быка. После этого, отняв искусственную вагину, нужно перевернуть ее спермоприемником вниз, открыть краник, чтобы выпустить из вагины воздух, дать стечь эякуляту в спермоприемник и отделить его от вагины. От вагины стеклянный спермоприемник отделяют постепенно и осторожно, затем закрывают крышкой. В современной модели прибора полиэтиленовый спермоприемник оставляют на цилиндре вагины и при помощи прибора "Молния" герметизируют в нем полученный эякулят, после чего ножницами отделяют эту часть и передают в лабораторию.

4.1.5. Получение спермы от хряка

От хряков сперму получают в манеже пункта искусственного осеменения. В качестве манекена используют чучело свиньи. Конструкции чучел разнообразны, но все они имеют сплошную поверхность, что позволяет легко мыть и дезинфицировать ее. Чаще используется деревянное чучело. По внешнему виду оно похоже на свинью, и это способствует более быстрой выработке у хряков условных половых рефлексов и обеспечивает в последующем хорошее их проявление. Искусственная вагина фиксируется внутри чучела. Наружная поверхность задней части его имеет воронкообразное углубление с отверстием в центре. Оно совпадает с просветом искусственной вагины. Для обеспечения скольжения и попадания полового члена хряка в вагину углубление в стенке чучела делают гладким и скользким. Это достигается путем нанесения на деревянную поверхность кисточкой раствора органического стекла в ацетоне или дихлорэтаноле. При получении спермы в холодном помещении внутрь чучела помещается электрическая лампочка. Включают ее в сеть в момент получения спермы. Это предотвращает снижение температуры в искусственной вагине. На спермоприемник надевают ватно-марлевый чехол.

Нередко используются чучела, представляющие собой простые лавки. На расстоянии примерно 60 см от задней части чучела размещают опоры для передних конечностей хряка. Лавку обивают мягким материалом, а сверху – кожей. При получении спермы на такое чучело искусственную вагину техник держит в руке или же получает сперму мануальным способом. В помещении чучело размещается так, чтобы хряк подходил к нему сзади и с боков, но не спереди. Особое внимание обращают на высоту задней части чучела и наличие удобной для хряка поверхности пола (не скользкой, ребристой).

После садки на чучело хряк делает поисковые движения penisом, при этом все глубже и глубже вводит его в вагину. После нескольких глубоких совокупительных движений он успокаивается и начинает выделять сперму. Хвост у него в это время закручивается кверху, семенники подтягиваются ближе к анальному отверстию, мошонка становится слабо напряженной и несколько отвисшей. После окончания эякуляции хряка удаляют из манежа, искусственную вагину вынимают из чучела, отсоединяют от нее спермоприемник и передают его в лабораторию.

4.1.6. Получение спермы от жеребца

Сперму от жеребца получают на открытой ровной площадке среди двора или под навесом. В холодную дождливую погоду получать сперму лучше в закрытом помещении (манеже) с высоким потолком. Получают сперму на кобылу в охоте. Тазовые конечности ее фиксируют случной шлейей, хвост забинтовывают.

После подготовки кобылы два человека выводят жеребца на подвоях. Спокойных жеребцов может выводить один человек. Как только у производителя хорошо проявится эрекция (пенис приподнимается к брюху), его сразу же пускают на кобылу. Техник по взятию спермы находится с правой стороны кобылы, в нескольких шагах; вагину удерживает в правой руке. Один из его помощников находится с другой стороны и во время садки жеребца должен быстро отвести хвост кобылы в сторону и постоянно удерживать его. Техник в момент начала садки быстро приближается к животному, искусственную вагину прижимает к крупу кобылы, а левой рукой берется за половой член жеребца вблизи головки (ладонь руки обращена вниз) и направляет его в вагину. Касание рукой полового члена не тормозит половых рефлексов у жеребцов. Не следует только дотрагиваться до головки пениса. Как только половой член производителя попадет в искусственную вагину, ее необходимо прижать обеими руками к крупу кобылы. При этом левая рука фиксирует скобу корпуса, а правая располагается сверху спермоприемника; угол наклона вагины спермоприемником вверх 30–35°. При получении спермы от крупных же-

ребцов технику помогает удерживать вагину помощник. Жеребец делает мощные совокупительные движения, и чтобы вагина не отходила вперед необходимо особый упор делать на спермоприемник. Эякуляция проявится быстрее, если головка пениса будет достигать суженной части горловины. Здесь возникает необходимое для выделения спермы давление. Во время совокупительных движений необходимо следить за состоянием резиновой камеры вагины. Если возникает опасность срыва ее с цилиндра или нарушения целостности, то немедленно ослабляют пробку патрубку и выпускают немного воздуха; затем опять пробку плотно закручивают. При разрыве камеры воздух и вода выходят из цилиндра и жеребец немедленно прекращает садку.

Садка у лошадей продолжается 1–1,5 мин, эякуляция происходит в течение 10–20 с. Об эякуляции можно судить по ритмичному сокращению мускулатуры корня хвоста, вследствие чего он поднимается и опускается, а также путем ощущения продвижения спермы по мочеполовому каналу вблизи мошонки. Совокупительные движения во время выделения спермы прекращаются.

В конце эякуляции жеребец медленно опускается (сползает) с кобылы. Вместе с ним опускают искусственную вагину спермоприемником вниз, а затем медленно и осторожно, чтобы не потерять часть эякулята, снимают с полового члена. Следует учитывать, что головка пениса в это время сильно увеличена и грубое и быстрое снятие вагины может причинить боль производителю. Если садка по какой-то причине не получилась, то жеребцу делают проводку в течение нескольких минут и затем опять подводят к кобыле.

4.2. Использование других методов для получения спермы от производителей

Мануальный метод получения спермы от хряка. При получении спермы хряки менее чувствительны к температуре в вагине, чем быки, но для них очень важным является давление. При коитусе необходимое давление создается после введения закрученной головки пениса в сильно складчатый цервикальный канал. В зависимости от состояния мышечной оболочки шейки матки давление в нем периодически изменяется. Соответствующие условия можно симулировать путем обхвата выдвинутого пениса пальцами руки, на которую одета теплая, смазанная латексная перчатка. Давление, создаваемое рукой, легко вызывает эякуляцию. Этот прием, названный *мануальным методом*, вытеснил традиционный метод искусственной вагины и в настоящее время повсеместно используется для получения спермы.

При этом методе после вскакивания хряка на чучело или свиноматку в охоте и первых начальных движениях полового члена осторож-

но кладут на него левую руку в перчатке. Когда совокупительные движения хорошо проявятся и половой член окажется выдвинутым полностью, обхватывают головку и плавным движением назад пытаются распрямить естественную ее извитость. Давление усиливают, что вызывает более энергичные совокупительные движения, и вскоре начинается эякуляция. На протяжении всей эякуляции, которая длится 305 с (колебания от 181 до 366 с), давление на головку пениса не должно ослабевать.

После начала эякуляции конечную часть полового члена обычно отводят в сторону и несколько вниз. Сперму собирают в изотермический сосуд со специальным мешком с фильтром. Можно использовать простую стеклянную теплую (температура 30°C) банку. На нее также кладут фильтр (марлевый). Фильтр необходим для отделения густой желеобразной фракции спермы.

Первые порции спермы содержат небольшие количества желатинаподобного вещества, которое остается вблизи головки полового члена, и сразу же выделяется прозрачная или слегка мутноватая фракция. Длительность выделения первой фракции около 50 с (24–79 с). Ее не собирают, а собирают только последующую фракцию, которая имеет молочно-белую окраску и богата сперматозоидами. Длительность выделения этой фракции – 140 с (от 92 до 195 с). Концентрация сперматозоидов в начале выделения фракции достигает 0,33 – 0,48 млрд/мл, но к концу уменьшается до 0,01 – 0,03 млрд/мл. После основной фракции выделяется в течение 106 с (с колебаниями от 39 до 161 с) третья фракция сероватого цвета; ее также не собирают. К концу эякуляции хряк опять начинает делать совокупительные движения и выделяется при этом желеобразная фракция спермы. Объем фракций составляет соответственно $8,6 \pm 2,0$ мл, $185,7 \pm 21,9$ мл и $116,1 \pm 20,0$ мл. В целом объем эякулята равен $310,4 \pm 30,0$ мл (Медведев Г.Ф., Ходыкин Д.С., 2007).

Используя этот способ, можно уверенно распознать и отделить основную фракцию спермы от остальных, снизить микробную загрязненность спермы, объективно и точно оценить весь процесс эякуляции.

При получении спермы от хряков следует строго соблюдать правила гигиены. Даже при хороших условиях содержания хряки обычно загрязнены и при садке их на чучело поднимается много пыли. Больше всего загрязнена кожа живота и препуция. Поэтому незадолго до получения спермы хряка необходимо помыть под душем либо в специальной установке, где кожа не только смачивается, но и механически очищается щетками и затем высушивается теплым воздухом.

Получение спермы от быка с помощью электроэякулятора. В практике иногда возникает необходимость применить метод электроэякуляции. Обычно этим методом получают сперму от молодых, не

приученных к искусственной вагине быков для оценки качества их спермы, а в центрах по искусственному осеменению – и от старых, хромых быков, которые не могут сделать садку. Перед получением спермы производителя фиксируют в станке, прямую кишку освобождают от каловых масс и подмывают препуций. При наличии современного прибора зонд с электродами вставляют в прямую кишку и прижимают книзу. После этого делают электрические стимулы в соответствии с рекомендованным инструкцией режимом, при этом напряжение тока постепенно повышают. Вначале при невысоком напряжении происходит выделение секрета луковичных желез, затем следует обильное выделение секрета пузырьковидных и предстательной желез, и наконец семенная жидкость по каплям стекает по волосам препуция или из отростка уретры выдвинутого полового члена. Обычно сперма выделяется спонтанно, пассивно, но иногда отмечается эрекция пениса и оргазм. В таких случаях эякулят нередко теряется. Оргазм часто сопровождается поворотом головки полового члена вокруг продольной оси. Это же можно наблюдать и при массаже и при получении спермы в искусственную вагину. В момент электроэякуляции сперму собирают как и при ректальном массаже. Объем эякулята чаще больше стандартного.

Получение спермы от быка методом массажа. Известно, что во время полового возбуждения сперматозоиды из канала придатка семенника перемещаются в ампулы спермиопроводов и сохраняются там до момента эякуляции. Массажом можно вызвать сокращение ампул и выделение половых клеток наружу.

Перед получением спермы быка выдерживают возле коровы в охоте, чтобы вызвать у него половое возбуждение. Затем руку вводят в прямую кишку на глубину 25 – 35 см; при необходимости освобождают ее от каловых масс. В момент расслабления находят твердый червеобразный орган – мочеполовой канал. Двигая по нему рукой вперед, отыскивают мягкую шейку мочевого пузыря с лежащими на ней ампулами спермиопроводов в виде эластичных трубок толщиной почти с палец, а по бокам от них – грушевидные пузырьковидные железы. Производят осторожный массаж желез спереди назад и таким же образом массируют ампулы спермиопроводов. Обычно двухминутного массажа бывает достаточно для того, чтобы выделилась сперма. Если массировать только пузырьковидные железы, то, как правило, выделяется семенная жидкость без сперматозоидов.

Так как пенис при массаже часто не выдвигается и не наступает эрекция, то для предотвращения загрязнения спермы волос вокруг отверстия препуция тщательно подмывают и вытирают насухо. Сперму собирают в чистый стаканчик, подставленный к отверстию препуция, или специальное приспособление, входящее в комплект электроэякулятора.

Полученная этим методом сперма нередко загрязняется мочой, имеет более высокое содержание секрета пузырьковидных желез и вообще худшее, чем в нормально эякулированной жидкости соотношение отдельных компонентов. При грубом и неумелом массаже возможны травмы спермиопроводов и пузырьковидных желез. Этим методом используют лишь иногда для получения спермы от тех быков, которые по какой-либо причине не в состоянии выделить сперму в искусственную вагину (слабые или больные задние конечности, слишком вялое проявление половых рефлексов и др.).

4.2.1. Режим получения спермы от производителей

От молодых бычков (начиная с 10-месячного возраста) получают 1 – 2 эякулята в неделю. С 18-месячного возраста от быков обычно получают по два эякулята в день с промежутком в 5–15 мин; интервалы между взятием спермы – 3–4 дня или более (в зависимости от половой потенции производителя). При получении трех эякулятов в день промежутки между взятием составляют 4–5 дней (3 раза за две недели).

От взрослых баранов сперму получают во время случного сезона ежедневно или через день по 3–4 эякулята (2 раза утром с промежутком в 5–10 мин и 1–2 раза вечером); молодых производителей используют реже (1–2 эякулята в день).

От козла сперму берут 2–3 раза в неделю.

У жеребца сперму также получают во время случного сезона по одному эякуляту 5 – 6 дней подряд с последующим перерывом в 1 – 2 дня для отдыха.

У хряка при умеренном режиме использования получают один эякулят через 3–4 дня.

4.3. Получение спермы у самцов птиц

Для получения спермы от самцов птиц предложены различные методы (спермособирателя, электроэякуляции, искусственной вагины), однако наиболее удобным и эффективным оказался метод массажа живота.

Получение спермы от петухов. Петухов изолируют от самок и через 15 – 20 дней начинают приучать к ручному массажу. Перед получением спермы клоаку освобождают от каловых масс и протирают стерильной марлевой салфеткой. Затем помощник ставит петуха на стол, придерживая левой рукой в области груди. Одновременно ладонью правой руки поглаживает несколько раз спину от последних шейных позвонков до корня хвоста (на поглаживание петух реагирует подниманием хвоста). После этого левой рукой фиксирует конечности петуха и берет его под мышку. Правой рукой нажимает на заднюю

часть брюшной стенки петуха, что приводит к выпячиванию клоаки. Техник подставляет стерильный спермоприемник (флакон, широкую короткую пробирку) к клоаке петуха, а другой рукой слегка надавливает на нее с обеих сторон и делает массирующие движения. Это вызывает эрекцию копуляторного органа и эякуляцию. Сперма медленно стекает в подставленный спермоприемник.

Получают сперму от петухов один раз в день или через день. Объем эякулята у самцов различных пород колеблется от 0,2 до 0,9 мл, чаще 0,2 – 0,5 мл. Концентрация сперматозоидов в сперме 3,0 – 3,5 млрд. в мл.

Получение спермы от индюков. Подготовку самцов начинают за 1,5 месяца до намеченного срока осеменения. Их переводят на рацион племенного периода; продолжительность светового дня увеличивают с 7 – 8 ч до 14 ч в сутки. Используют индюков с 8-месячного возраста. Получают сперму методом ручного массажа. Индюка помещают на специальный столик (станок) в горизонтальном положении. Оператор-массажист левой рукой фиксирует его так, чтобы кисть руки была свободной; потом кистями обеих рук в течение нескольких секунд делает легкий двусторонний массаж вдоль лонных костей по направлению от грудной клетки к хвостовой части. Техник по взятию спермы в это время при помощи анатомического пинцета проводит обработку клоаки и области вокруг нее стерильным ватным тампоном, смоченным 0,02%-ным раствором фурацилина, а после – сухим тампоном. Затем оператор-массажист ребром правой ладони делает 8 – 10 легких ударов по задней мягкой части живота. Техник в это время большим и указательным пальцами правой руки поглаживает вокруг клоаки самца, а затем сжимает с боковых сторон кольцо клоаки до появления копуляторного органа и извержения спермы.

На ряде птицефабрик сперму получают на специальном столике, который на роликах передвигается вдоль рядов клеток, где содержатся самцы. Плоскость столика находится на уровне пола клетки. Перед взятием спермы индюка извлекают из клетки и ставят на стол. При легком поглаживании мягкой части живота у приученного, натренированного индюка появляется половое возбуждение, эрекция и эякуляция. Чтобы получить большие эякуляты, техник по взятию спермы должен производить пальцами движения вокруг копуляторного органа имитирующее выдавливание. На получение спермы от одного самца затрачивается около одной минуты.

Более часто для получения спермы от индюков используют специальные станки. В станке, используемом на птицефабриках СНГ, имеется углубление длиной 25 см, шириной – 22 см, глубиной – 12 см. В углублении фиксируют индейку и накрывают ее щитком (30x30 см, высотой 12 см), изготовленным из проволочной сетки. Щиток прикреплен к столу одной из боковых сторон и свободно откидывается. Он

предохраняет индейку от травм, которые может нанести самец в момент проявления рефлекса топтания. На столик помещают индюка. При виде самки индюк возбуждается и делает попытку к спариванию. После этого у него слегка массируют мягкую часть живота или вокруг клоаки. Это способствует подготовке половых органов к эякуляции. В момент эрекции и появления копуляторного органа техник большим и указательным пальцами левой руки надавливает на него с боков. В правой руке он удерживает вакуумный или обычный стеклянный спермоприемник, в которые собирается сперма при эякуляции. Выделение спермы происходит обычно через 35–40 с после начала подготовки самца.

Вакуумный спермоприемник состоит из термостабильной пробирки (сосуда), резиновой пробки с двумя отверстиями, двух термостабильных стеклянных трубок, изогнутых под углом 90°, резинового шланга длиной 70 см и стеклянного мундштука.

После 2–3 процедур у самцов вырабатывается условный рефлекс на массаж и для получения спермы достаточно манипуляций, связанных с обработкой клоаки. Сначала от самца получают 0,05–0,15 мл спермы, а после выработки условного рефлекса – 0,3–0,4 мл. Максимальный объем одного эякулята достигает 1,25 мл.

Индюков, у которых не удастся выработать условного рефлекса на массаж, стимулирующего эякуляцию (3 – 5%), а также выделяющих сперму низкого качества, выбраковывают. Сперму получают не более двух раз в неделю.

Сперму у гусак получают так же, как и у индюков. Гусаки выделяют 0,1–1,3 мл спермы с концентрацией 0,3–0,9 млрд. сперматозоидов в 1 мл.

Контрольные вопросы

1. Каковы принципы устройства искусственной вагины и какие условия необходимо создать в ней, чтобы обеспечить рефлекс эякуляции у самца?
2. Правила и последовательность подготовки искусственной вагины для получения спермы.
3. Какие животные (фантомы) используются при получении спермы от быков?
4. В чем заключается подготовка быков-производителей для получения спермы? Каковы основные мероприятия по стимуляции у них половой функции?
5. В каких случаях применяют методы массажа и электроэякуляции для получения спермы от быков?
6. Правила обращения со спермой после получения? Как проводится предварительная оценка спермы?

7. Какие методы применяют для получения спермы от хряков? Особенность эякуляции у них?

8. Какой основной метод получения спермы у жеребца?

9. Каких животных используют в качестве манекена при получении спермы от жеребца, хряка, барана?

10. Оптимальный режим получения спермы от быка, хряка, барана и жеребца?

11. Какие факторы влияют на объем и качество получаемой от самцов спермы?

12. Какой основной метод получения спермы от самцов птиц? Какой оптимальный режим использования петухов, индюков, гусаков?

Тема 5. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ

Из предложенных и используемых методов оценки качества спермы выделяют *обязательные* и *дополнительные*. Обязательной оценке подвергается каждый взятый эякулят. Дополнительными методами оценивают свежеполученную сперму периодически (один раз в 3–6 мес) в зависимости от технологии и условий работы племпредприятия.

К обязательным методам относят: *1) оценку внешних свойств спермы, 2) оценку спермы по густоте и подвижности сперматозоидов и 3) определение концентрации сперматозоидов в сперме.*

Дополнительные методы, используемые для более полной характеристики качества спермы, включают: *1) определение процента морфологически ненормальных сперматозоидов; 2) определение процента живых сперматозоидов путем дифференциальной окраски; 3) определение метаболической активности сперматозоидов (по скорости обесцвечивания метиленовой сини, индексу фруктолиза, показателю рН и др.); 4) определение абсолютного показателя живучести сперматозоидов* и др.

Методические указания. Занятия (два или три по 2–4 ч) по оценке качества спермы сочетают с получением спермы от различных производителей. Если в клинике кафедры есть возможность получить сперму от самцов нескольких видов сельскохозяйственных животных и птиц, то студенты должны использовать это для приобретения практических навыков обращения с производителями, изучения техники получения спермы и применения обязательных методов оценки ее качества. Дополнительные методы оценки качества спермы могут изучаться поочередно на различных занятиях. Студентам следует внимательно отнестись и к просмотру фильмов по тем темам, которые не обеспечены соответствующим видом животных. На отдельном занятии можно освоить методы оценки сохраняемой спермы. Особое внимание

следует уделить оценке подвижности сперматозоидов и выяснению частоты повреждений акросомы.

5.1. Обязательные методы оценки качества спермы

Цель занятий: приобретение студентами навыков оценки внешних свойств спермы, определения подвижности и концентрации сперматозоидов в сперме.

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные – бык и корова (манекен) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных); термостат для микроскопа; микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями ОИ-35 либо МКИ-11, микроскоп МБИ-11 (МБИ-14) с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; обогревательные столики; дозаторы пипеточные, градуированные микропипетки на 0,1 мл и пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл; пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; марлевые салфетки; мерные цилиндры; камеры Горяева; лейкоцитарный и эритроцитарный меланжеры (смесители); 96%-ный этиловый спирт, эфир, дистиллированная вода, 3%-ный раствор натрия хлорида; шары Ричардсона или резиновый баллон (для продувания смесителей); наборы стандартов для определения концентрации сперматозоидов в сперме; спектрофотометр или фотоэлектрический колориметр; система автоматического компьютерного анализа спермы.

5.1.1. Оценка внешних свойств спермы

Оценка внешних свойств свежеполученной спермы производится по следующим критериям: цвету, консистенции, запаху и объему эякулята. **Цвет** спермы зависит от вида животных и насыщенности сперматозоидами. Чем выше содержание сперматозоидов в сперме, тем более белый цвет ее. Сперма барана белого цвета с желтоватым оттенком, быка – белого или желтоватого, жеребца и хряка – серовато-белого цвета. При наличии буроватого или розового (примеси крови), зеленоватого (примеси гноя) или желтого цвета (примеси мочи) сперма выбраковывается. **Запах** нормальная сперма сельскохозяйственных животных не имеет. Гнилостный или другой запах в ней может быть результатом воспалительного процесса в половых путях, и это дает основание для выбраковки эякулята. **Консистенция**, как и цвет спермы, зависит от концентрации сперматозоидов. Сперма барана сливко- или сметанообразной консистенции, быка – молочной, жеребца и хряка – водянистой. **Объем эякулята** быка измеряют в смесителе перед разбавлением, а если сперма получена в полиэтиленовый одно-

разовый спермоприемник – путем взвешивания. Взвешивают на точных весах (типа ВЛК-20, ВЛК-500, Р-2-200 или др.). Масса 1 г спермы принимается за 1 мл. В европейской модели вагины объем эякулята определяют по шкале градуированного спермоприемника. При получении спермы в стеклянный двустенный спермоприемник ее предварительно разбавляют 1:1 (добавляют 5 мл среды) и затем переливают в специальный градуированный смеситель и определяют объем. Объем эякулята барана измеряют с помощью пипетки или по делениям в одностенном спермоприемнике. Объем эякулята жеребца и хряка определяют в мерных мензурках или цилиндрах, изотермических сосудах, предварительно профильтровав сперму через четырехслойный марлевый или специальный (для хряка) фильтр. Мерная посуда должна быть сухой, стерильной и подогретой до температуры свежеполученной спермы.

Т а б л и ц а 2. Объем эякулятов самцов сельскохозяйственных животных и птиц

Вид производителя	Объем эякулята, мл		
	минимальный	средний	максимальный
Баран	0,6	1	2
Бык	2	4–6	10
Жеребец	20	70–75	300
Хряк	100	250 – 350	500
Кролик	0,2	0,5	2,0
Петух	0,2	0,5	0,6
Индюк	0,2	0,3	0,4
Гусак	0,2	0,5	1,3

5.1.2. Оценка спермы по густоте и подвижности сперматозоидов

Эта оценка производится путем просматривания спермы под микроскопом при увеличении в 120–400 раз. На чистое подогретое предметное стекло дозатором пипеточным (стерильной стеклянной палочкой или пипеткой) наносят капельку спермы и накрывают ее покровным стеклом. Желательно, чтобы каждый раз величина капельки была одинаковой, так как от этого в значительной мере зависит объективность и точность оценки. Это условие в полной мере можно выдержать при использовании дозатора пипеточного регулируемого или калиброванного на 0,03 мл. Чтобы капля равномерно растекалась под покровным стеклышком (без пузырьков воздуха) и не выходила за его края, поступают следующим образом. Держа двумя пальцами за грани (ребрышки) покровное стеклышко, касаются одной его гранью предметного стекла возле края капли под углом 45–50°. Когда капля расплывется по всей ширине стеклышка, медленно его опускают. Покровное стеклышко должно быть тщательно вытерто. Протирают его марлевой

салфеткой между большим и указательным пальцами, поворачивая за ребрышки пальцами другой руки.

Исследование проводят при температуре 38–40°C, для чего пользуются специальными термостатами или обогревательными столиками (конструкции Морозова или Пакенаса) с автоматическим регулированием температуры. Обогревательный столик помещают на предметный столик микроскопа. При помощи макровинта приближают объектив (увеличение 80 – 120х) к предметному столику микроскопа на расстояние 4–5 мм и устанавливают необходимое освещение. Обычно пользуются электрическим осветителем ОИ-35, либо МКИ-11, а при отсутствии осветителя – осветительным зеркалом. В таких случаях микроскоп необходимо расположить напротив хорошего источника света (окно помещения, лампа дневного света и т. д.). Равномерность и сила освещения достигается за счет приподнимания или опускания конденсора микроскопа и прикрытия диафрагмы. Для улучшения видимости сперматозоидов желательнее использовать конденсор темного поля ОИ-10, в поле зрения отчетливо просматриваются ярко светящиеся контуры половых клеток на темном фоне.

После подготовки микроскопа готовят мазок и помещают его на обогревательный столик. Глядя в окуляр, при помощи макровинта медленно приподнимают тубус до появления изображения в поле зрения. Затем, вращая макровинтом в ту или другую сторону, добиваются четкого изображения.

Густота спермы определяется по количеству сперматозоидов, наблюдаемых в поле зрения микроскопа. Такая оценка проводится с целью получения предварительных данных о содержании половых клеток в сперме и о необходимости дальнейшей ее оценки. Наиболее хорошо она разработана для спермы быка и барана. Имеет самостоятельное значение лишь в том случае, когда по какой-либо причине не определяют концентрацию сперматозоидов. Классифицируют сперму как густую, среднюю и редкую (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Зависимость густоты спермы от концентрации сперматозоидов

Вид производителя	Концентрация сперматозоидов в сперме, млрд. мл		
	в густой	в средней	в редкой
Баран	> 2	1–2	< 1,0
Бык	> 1	0,7–1	< 0,7
Жеребец	> 25	0,15–0,25	< 0,15
Хряк	> 0,2	0,1–0,2	< 0,1
Кролик		0,2	
Петух		3,8	
Индюк	> 8,0	6 – 8	< 6
Гусак		0,5	

Густая сперма – все поле зрения заполнено сперматозоидами без промежутков между ними (обозначается буквой Г). **Средняя сперма** – промежутки между сперматозоидами имеются, но они не превышают размеров одного сперматозоида (обозначается буквой С). **Редкая сперма** – промежутки между сперматозоидами превышают размеры спермия (обозначается буквой Р). **Олигоспермия** – в поле зрения имеются единичные сперматозоиды (обозначается буквой О). **Аспермия** – в поле зрения сперматозоиды отсутствуют (обозначается буквой А). По густоте спермы приблизительно судят о концентрации сперматозоидов.

К использованию допускается сперма быка, жеребца и хряка с оценкой “густая” и “средняя”, сперма барана – только “густая”.

5.1.3. Оценка спермы по подвижности (активности) сперматозоидов

Различают три вида движения сперматозоидов: прямолинейно-поступательное, манежное и колебательное. Нормальным для сперматозоидов движением является прямолинейное поступательное. Сперматозоиды с **манежным, колебательным** движением или **неподвижные** неспособны к оплодотворению. Подвижность сперматозоидов оценивают по 10-балльной шкале. Если около 90% сперматозоидов движутся прямолинейно поступательно, то такой сперме ставится оценка 9 баллов, если 80% – 8 баллов и т.д. **Некроспермия** – все сперматозоиды в поле зрения неподвижны; обозначается буквой Н. Свежеполученная сперма допускается к использованию по подвижности, если она не ниже 8 баллов у барана и быка, не ниже 7 баллов – у хряка, не ниже 6 – у жеребца.

Результат оценки по густоте и подвижности сперматозоидов обозначается двумя знаками, например, Г-9, С-10, Р-7 и т.д.

В ряде стран (США и др.) допускается использование спермы, в которой не менее 50% клеток обладают поступательным движением. При оценке по подвижности большое внимание уделяется характеру движения половых клеток, а также образованию в мазке из свежеполученной спермы вихрей и завихрений и их силе. В густой сперме энергично двигающиеся в одном направлении сперматозоиды образуют своеобразные потоки (“струи”). Когда такие струи сталкиваются, в поле зрения возникают темные завихрения, которые быстро исчезают.

В 5 баллов оценивается сперма, если в мазке сперматозоиды проявляют очень быстрое и энергичное поступательное движение, за счет которого чрезвычайно быстро возникают вихреобразное движение и небольшие завихрения, постоянно изменяющиеся в поле зрения.

4 балла – быстрое поступательное движение сперматозоидов и внезапное формирование вихреобразного движения и завихрений в проматриваемом мазке.

3 балла – устойчивое, средней силы поступательное движение сперматозоидов; вихревое движение и небольшие завихрения продвигаются более медленно через поле зрения.

2 балла – слабое поступательное движение, отмечаются остановки и возобновление движения сперматозоидов. Вихреобразное движение и завихрения отсутствуют.

1 балл – слабое волнообразное или колебательное движение сперматозоидов.

0 баллов – отсутствие в мазке подвижных сперматозоидов.

Для предприятий по искусственному осеменению Республики Беларусь инструкцией (1998 г.) рекомендуется при оценке спермы быка по подвижности не сразу выбраковывать густые эякуляты, в которых сперматозоиды проявляют слабое движение. Возможно, что в момент эякуляции половые клетки не успевают полностью выйти из состояния анабиоза. Поэтому капельку такой спермы необходимо разбавить одной – двумя капельками натрия цитрата, подогретого до 38–40°C, затем провести оценку в нескольких полях зрения и сделать окончательное заключение о пригодности спермы к использованию.

В крупных центрах по искусственному осеменению ряда стран используют современное оборудование, позволяющее определять концентрацию и подвижность сперматозоидов (включая прямолинейное поступательное и маневренное движение), а также их морфологию. Имеется уже три поколения систем автоматического компьютерного анализа спермы. В системах первого и второго поколения не дифференцируются клеточные фрагменты от неподвижных сперматозоидов. Поэтому необходимо проводить раствор через мембранные фильтры 0,2 μ . Системы третьего поколения анализируют каждый объект (клетку) до хвоста и если не обнаруживают его, то не включают в общее количество. Использование этих систем позволяет повысить точность оценки качества спермы и ее оплодотворяющую способность.

5.1.4. Определение концентрации сперматозоидов в сперме

Концентрацию сперматозоидов можно определить: 1) путем подсчета в счетной камере, 2) методом сравнения со стандартами, 3) с помощью фото-электроколориметра или специальных электронных счетчиков.

Определение концентрации сперматозоидов путем подсчета в счетной камере. Счетная камера Горяева представляет собой пластинку из толстого стекла, поделенную желобами на поля: центральное и два опорных. Центральное поле разделено средним поперечным желобом на две части. Это поле на 0,1 мм ниже опорных полей; на каждой половине его нанесена сетка. При помещении на опорные поля покровного стекла над сетками образуется камера 0,1 мм глуби-

ной. Чтобы шлифованное покровное стекло прочно держалось, его помещают на чистую и обезжиренную спиртом камеру и, прижимая пальцами к опорным полям, притирают до появления радужных колец.

Исследуемую сперму необходимо разбавить дистиллированной водой или 3%-ным раствором натрия хлорида. Для этого используются смесители (меланжеры). Смесители должны быть чистыми и сухими. Поэтому после использования их промывают многократно дистиллированной водой, а затем 96%-ным спиртом и эфиром (1:1) и высушивают путем продувания воздуха резиновым баллоном или шарами Ричардсона. Для удобства в работе каждый смеситель присоединяют к резиновой трубке (15–20 см), к другому концу которой присоединен кусочек зашлифованной стеклянной трубки. Перед использованием кончик пипетки смесителя обеззараживают спиртовым тампоном. Обеззараженную часть пипетки слегка погружают в сперму, берут в рот кончик резиновой трубки (отрезок стеклянной трубки) и осторожно набирают сперму до нужной метки.

Для спермы быка и барана применяют эритроцитарный смеситель (с красным шариком), для спермы жеребца и хряка – лейкоцитарный (с белым шариком).

Сперму барана разбавляют в 200 раз, набирая сперму до метки 0,5, а воду – до 101.

Сперму быка разбавляют в 100 раз, набирая ее до метки 1,0, а воду – до 101.

Сперму жеребца и хряка разбавляют в 20 раз, набирая ее до метки 0,5, а воду – до метки 11.

Смеситель зажимают пальцами с обеих сторон и встряхивают в течение 2–3 минут до полного смешения спермы с дистиллированной водой. После перемешивания первые 3–4 капли из смесителя сливают отдельно и заряжают камеру, поднеся кончик смесителя к центральному полю у края покровного стекла. Смесь при этом заполняет пространство между центральным полем и покровным стеклом. Если часть капли останется у края покровного стеклышка, ее необходимо осторожно снять комочком сухой ваты. Другую сетку можно заполнить другим образцом спермы. Камеру помещают на предметный столик микроскопа (*строго горизонтальное расположение!*), устанавливают увеличение 200х, подбирают необходимое освещение и осторожно наводят увеличение микроскоп. Сперматозоидов подсчитывают в пяти больших квадратах сетки (по диагонали), каждый из которых поделен на 16 малых квадратов.

Концентрацию сперматозоидов вычисляют по формуле

$$C = \frac{N \times D \times 4000 \times 1000}{n}$$

где С – концентрация сперматозоидов;
N – количество подсчитанных сперматозоидов;
Д – степень разбавления спермы водой;
п – количество малых квадратов, в которых производился подсчет (80);
4000 – количество малых квадратов в одном мм³;
1000 – мм³ в одном см³.

Удобнее пользоваться упрощенными формулами, которые получены из приведенной выше:

а) формула для расчета концентрации спермы барана

$$C = N/200;$$

б) формула для расчета концентрации спермы быка

$$C = N/100;$$

в) формула для расчета концентрации спермы жеребца и хряка

$$C = N/1000,$$

где С – концентрация сперматозоидов в сперме, млрд/мл;

N – количество сперматозоидов, подсчитанных в пяти больших (80 малых) квадратах.

Определение концентрации сперматозоидов методом сравнения со стандартами. Стандарты представляют собой запаянные пробирки, в которых находится похожая на сперму жидкость (раствор сернокислого бария). Содержимое каждой пробирки имеет внешний вид и оптическую плотность, соответствующие сперме различной концентрации. В наборе стандартов для спермы быка имеются образцы, соответствующие концентрации 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 и 1,4 млрд/мл, для жеребца – 10, 50, 100, 200, 300 и 500 млн/мл.

Пустую пробирку такого же диаметра, как и стандарты, заполняют исследуемой спермой и сравнивают с ними. Пробирки просматривают на свет, подбирая стандарт, близкий по прозрачности к исследуемой сперме. Указанная на стандарте концентрация принимается за концентрацию данной спермы.

Определение концентрации сперматозоидов с помощью фотоэлектроколориметра или специальных электронных счетчиков.

Электрофотоколориметрический метод основан на способности спермы ослаблять проходящий через нее пучок света пропорционально концентрации сперматозоидов. Величина ослабления света регистрируется фотоэлементами прибора ФЭК, позволяющего определить оптическую плотность спермы. Оптическая плотность различных образцов спермы при стандартном разбавлении повышается прямо пропорционально концентрации половых клеток.

Сперму необходимо исследовать сразу же после ее получения. Для этого из свежеполученного эякулята отбирают пробу спермы и разбавляют 2,9%-ным раствором цитрата натрия.

Сперму быка разбавляют в 100 раз, взяв 0,1 мл спермы и 10 мл цитрата натрия.

Сперму барана разбавляют в 400 раз, взяв 0,025 мл спермы и 10 мл цитрата натрия.

Сперму хряка разбавляют в 30 раз, взяв 0,4 мл спермы и 12 мл цитрата натрия.

Разбавление производят во флаконе емкостью 10 – 20 мл. Необходимо до получения спермы приготовить столько флаконов, сколько планируется получить эякулятов, и в них заранее внести раствор натрия цитрата. В современных приборах предусмотрен автоматический отбор пробы спермы и разбавление ее в кювете для исследования.

При взятии проб спермы необходимо стремиться к высокой точности. Пробы следует отбирать только микропипетками или пипеточными дозаторами из середины свежеполученных эякулятов, не допуская попадания пены или вазелина. Перед внесением пробы спермы в раствор микропипетки следует вытирать снаружи чистой марлевой салфеткой для удаления излишней спермы. Температура 2,9%-ного раствора цитрата натрия должна быть в пределах +20–25 °С.

Для исследования необходимы две кюветы с рабочей толщиной 10 мм. Одну из них наполняют (до метки) спермой, разбавленной 2,9%-ным цитратом натрия, вторую – только 2,9%-ным цитратом натрия.

Кюветы ставят в кюветодержатель прибора и сначала располагают на пути пучка света (с длиной волны около 550 нанометров, красный светофильтр) кювету с цитратом натрия (без спермы). Стрелка гальванометра при этом смещается. Ручками грубой и тонкой настройки ее устанавливают на "0". Затем перемещают кюветодержатель, располагая на пути пучка света кювету со спермой. В результате стрелка гальванометра укажет величину, соответствующую оптической плотности спермы.

Далее оптическую плотность спермы необходимо пересчитать в концентрацию. Для этого необходимо тщательно определить концентрацию сперматозоидов в сперме в 10–20 пробах эякулятов в счетной камере Горяева и одновременно исследовать их на приборе. Подсчет концентрации сперматозоидов в сперме в камере Горяева должен проводиться четырехкратно по каждому эякуляту путем заправки сразу двух меланжеров и двукратного подсчета в камере с каждого меланжера. При этом берется среднеарифметический результат из всех четырех подсчетов. Подсчеты одного и того же эякулята не должны отличаться между собой более чем на 10%. Нужно стремиться, чтобы отобранные для выведения калибровочной кривой эякуляты были по возможности различной концентрации – от редких до самых густых.

Определив концентрацию отобранных эякулятов и исследовав их на приборе, строят калибровочную кривую. Для этого откладывают в

определенном масштабе (лучше на миллиметровой бумаге) по горизонтальной оси известные показатели концентрации, а по вертикальной оси – соответствующие им величины оптической плотности, выявленные по прибору. На месте пересечения этих величин ставят точки, затем проводят калибровочную кривую с таким расчетом, чтобы она охватила большинство точек (рис.3).

Показатели оптической плотности



Рис. 3. Калибровочная кривая для определения концентрации спермы быков на фотоэлектроколориметре.

Калибровочную кривую следует выводить для каждого прибора в отдельности и время от времени ее проверять. При массовых исследованиях можно пользоваться коэффициентами-множителями (это возможно при прямолинейной зависимости между величиной концентрации и величиной отсчета прибора). Для этого необходимо среднеарифметическую концентрацию (15–20) эякулятов разделить на соответствующую ей среднеарифметическую величину оптической плотности тех же эякулятов.

Имея коэффициент-множитель и зная величину оптической плотности исследуемого эякулята, установленную на приборе, можно легко определить его концентрацию. Для этого необходимо перемножить эти величины.

Наиболее точно определить концентрацию сперматозоидов в сперме можно *с помощью специальных электронных счетчиков* (рис. 4). В этих приборах разбавленная сперма пропускается через капилляр так, что между электродами проходит только один сперматозоид. Головка его вызывает резкое увеличение сопротивления и это регистрируется счетчиком. Такие счетчики необходимы и при оценке качества разбавленной спермы путем *фильтрации* через сэфадекс гель/стекловату.



Рис. 4. Современный прибор для определения концентрации сперматозоидов в сперме.

Приготовленный сэфадекс гель укладывается поверх пробки из стекловаты на дно пластикового шприца, используемого в качестве фильтрационной колонки. Фильтр колонки промывается буфером и в нее вносится небольшое количество спермы. Затем система промывается большим количеством буфера и в фильтрате подсчитывается число сперматозоидов. Мертвые или поврежденные клетки, а также отдельные формы абнормальных клеток остаются в фильтрационной колонке, тогда как живые проходят через нее. Считают, что целостность мембраны и поверхности сперматозоидов определяет возможность продвижения их через такую систему. Отмечена высокая степень зависимости оплодотворяющей способности спермы от соотношения живых и мертвых сперматозоидов.

В сохраняемой сперме можно определить количество сперматозоидов (в единице объема или дозе) *по содержанию ДНК*. Для определения ее необходим буфер, специальный краситель и флуорометр. В каждом сперматозоиде содержится 3,3 пкг ДНК.

5.2. Дополнительные методы оценки качества спермы

Цель занятий: приобретение студентами навыков всесторонней оценки качества спермы с использованием дополнительных методов оценки.

5.2.1. Определение процента живых сперматозоидов путем дифференциальной окраски

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма; микроскопы МБР (МБИ или БИОЛАМ) с осветителем, МБИ-11 или МБИ-14 с телевизионной камерой; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные, петля платиновая; предметные стекла, стекла со шлифованными краями; ванночки; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; красители: эозин, берлинская лазурь; соли KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 для приготовления фосфатного буфера; дистиллированная вода, смесь спирта этилового с эфиром (1:1); обогревательный столик, устройство для сушки мазков.

Метод, предложенный В.А. Морозовым (1938 г.), основан на свойстве эозина проникать через мембрану мертвых сперматозоидов и окрашивать их; мембрана живых клеток не пропускает краску, и они остаются неокрашенными. Использование других красителей в сочетании с эозином может повышать точность метода за счет создания фона, на котором лучше просматриваются окрашенные и неокрашенные сперматозоиды.

На край обезжиренного предметного стекла наносят дозатором пипеточным (стеклянной палочкой, глазной пипеткой) маленькую капельку свежеполученной спермы и рядом с ней – капельку 5%-ного водного раствора эозина. Обе капельки быстро смешивают стеклянной палочкой (уголком шлифованного стекла) и делают тонкий мазок. Для этого прижимают торцевую гранью шлифованное стеклышко к предметному стеклу и подводят его под углом $35\text{--}40^\circ$ к капле так, чтобы она растеклась сзади него на всю ширину грани. Придерживая в наклонном положении шлифованное стеклышко большим и указательным пальцами, быстро, но плавно тянут каплю вдоль предметного стекла к другому краю; при этом капля равномерно размазывается сзади стеклышка. Мазок получается ровным, если указательный палец, фиксирующий шлифованное стеклышко, опустить несколько ниже грани предметного стекла и двигать по ней. Важно, чтобы мазок был тонким (заканчивался на расстоянии $0,5\text{--}1$ см от края предметного стекла), в таких случаях он быстро высохнет. Чтобы ускорить высыхание, его следует положить на обогревательный столик или пластину ($45\text{--}55^\circ$) и обдувать потоком теплого воздуха (можно использовать электрофен бытовой).

Высушенный мазок просматривают под микроскопом при увеличении 900х (иммерсионный объектив); увеличение 300– 400х менее подходящее для этого метода. Подсчитывают минимум 100 сперматозоидов. К окрашенным (*мертвым*) клеткам относят тех, у которых окрашена полностью головка или задняя ее часть. После подсчета выводят процент неокрашенных (*живых*) клеток.

Зарубежные организации по искусственному осеменению используют следующий рецепт красителя. Растворяют 1 г эозина синеватого (спирто- или водорастворимого, 88% содержание краски) и 4 г берлинской лазури (анилин голубой водорастворимый) в 100 мл М/8 фосфатного буфера. Для приготовления буфера растворяют 1,702 г KH_2PO_4 в 100 мл дистиллированной воды и 1,776 г безводного Na_2HPO_4 в 100 мл дистиллированной воды. Смешивают 28,5 мл раствора KH_2PO_4 и 71,5 мл раствора Na_2HPO_4 . Краситель растворяют в буфере и прогревают в водяной бане при 85°C в течение 10 мин. Финальный показатель рН красителя должен быть 6,6. Хранить буфер можно в холодильнике при 5°C.

Для приготовления мазков берут дозатором пипеточным или градуированной пипеткой 0,03 мл красителя, подогретого до комнатной температуры, и капельку спермы. Смешивают платиновой петлей (толщина проволоки 1–3 мм) или тоненькой стеклянной палочкой и делают мазок. Процедура приготовления мазка (после смешивания спермы с красителем) до помещения его на теплую пластину не должна превышать 15 с, а высушивание – более 30 с. Высушенный мазок просматривают под микроскопом при увеличении 900х.

5.2.2. Определение процента патологических (морфологически ненормальных) сперматозоидов

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма; микроскопы МБР (МБИ или БИОЛАМ) с осветителями, МБИ-11 или МБИ-14 с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные стекла, стекла с шлифованными краями, пробирки, ванночки; фильтровальная бумага; красители: эозин, берлинская лазурь, кристаллвиолет, анилин, основной фуксин; карболовая кислота, спирт этиловый; калий хлорид, натрий фтористый, KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 для приготовления фосфатного буфера; 2,9%-ный раствор натрия цитрата, дистиллированная вода, смесь спирта этилового с эфиром (1:1), марлевые салфетки; термостат, обогревательный столик, устройство для сушки мазков.

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. Это может быть обусловлено тем, что продвижение ненормальных сперматозоидов в половом тракте самки к месту оплодотворения нарушено и не накапливается там необходимое число половых клеток (в половом тракте есть места, которые не пропускают ненормальных сперматозоидов), или же с неспособностью таких клеток вызвать оплодотворение и последующее развитие зародыша.

Ненормальности головки имеют большее значение, чем ненормальности в области хвоста. В связи с этим классифицируют ненормальности сперматозоидов как: первичные (главные), вторичные и третичные. *Первичные* связаны с головкой или акросомой клетки, *вторичные* – с наличием цитоплазматической капельки в средней части хвоста и *третичные* – с другими дефектами хвоста.

В предприятиях по искусственному осеменению необходимо периодически (один – два раза в год) тщательно просматривать образцы спермы от каждого производителя и при выявлении повышенного числа ненормальных клеток внимательно обследовать животное.

При наличии фазово-контрастного микроскопа или конденсора ОИ-10 готовят сырой неокрашенный мазок. На обезжиренное предметное стекло наносят капельку спермы и капельку 0,35 М раствора калия хлорида или 40,0 mM натрия фтористого, приготовленных на 2,9%-ном растворе натрия цитрата. После смешивания делают тонкий мазок. Просматривают с использованием иммерсионного объектива 100 клеток. Можно исследовать свежеполученную и оттаянную сперму.

Более надежно исследование производить в окрашенных сухих мазках. Самый простой способ – это использование мазка, окрашенного смесью эозина и анилина голубого при определении процента живых и мертвых сперматозоидов. Однако можно готовить и окрашивать мазок непосредственно для определения патологических форм сперматозоидов.

При приготовлении мазка следует предотвратить температурный шок, в результате которого хвостики сперматозоидов закручиваются и невозможно отличить такие клетки от тех, которые образовались в семенниках. Попадание воды (например, влажное предметное стекло) также вызывает этот артефакт. Свежеполученные сперматозоиды легко разламываются в области шейки, что приводит к увеличению процента бесхвостых головок. Чтобы предотвратить такую опасность, можно до исследования сперму выдержать при комнатной температуре (сохраняемые сперматозоиды менее чувствительны к разломам).

Перед приготовлением мазка сперму разбавляют изотоническим раствором натрия хлорида или натрия цитрата. В пробирку вносят 1 мл

раствора и добавляют одну каплю спермы быка. Степень разбавления спермы барана должна быть большей, а спермы хряка и жеребца – меньшей. Температура раствора и спермы перед смешиванием должна быть одинаковой. Смешивание проводят осторожно путем легкого постукивания пальцем по нижнему концу пробирки. Каплю приготовленной смеси помещают на обезжиренное предметное стекло и делают мазок.

Если сперма хранилась несколько часов, то можно нанесенную на предметное стекло каплю спермы накрыть вторым таким же стеклом и плавно, и ровно протянуть его по первому. Мазки высушивают при температуре 36–37°C в термостате, а затем фиксируют на пламени или погружением на 1–2 мин в стаканчик с 96%-ным этиловым спиртом. После фиксации производят окрашивание. Используют различные красители. Хорошие результаты получают при двойном окрашивании анилиновым генцианвиолетом и карболовым фуксином Циля. Фиксация мазков после высушивания не требуется.

Анилиновый генцианвиолет (Эрлиха)

Раствор:

кристаллвиолет (85% красящего вещества) – 2,5 г;
этиловый спирт (96%-ный) – 12 мл.

Раствор:

анилин – 2 мл;
дистиллированная вода – 98 мл.

После полного растворения оба раствора смешивают вместе и хранят во флаконе со стеклянной пробкой.

Карболовый фуксин Циля

Раствор А:

основной фуксин (90% красящего вещества) – 3 г;
этиловый спирт (96%-ный) – 10 мл.

Раствор Б:

фенол (карболовая кислота) – 5 г;
дистиллированная вода – 95 мл.

Раствор А добавляют в *раствор Б*, смешивают и хранят во флаконе со стеклянной пробкой.

Для получения лучших результатов карболовый фуксин надо время от времени фильтровать. Хранить обе краски можно бесконечно.

Высушенные мазки окрашивают в течение 2 мин анилиновым генцианвиолетом и сразу же промывают проточной, затем дистиллированной водой и высушивают. После этого дополнительно окрашивают карболовым фуксином в течение 10–15 с или дольше, в зависимости от желательной интенсивности окрашивания; промывают проточной водой, потом дистиллированной и высушивают.

Из каждого образца спермы готовят 2–3 мазка, исследуют под микроскопом с иммерсионной системой и в каждом из них просматривают 100–200 сперматозоидов. Это дает более надежные результаты, чем просмотр большего количества клеток (до 500) в одном мазке. При подсчете ненормальных сперматозоидов придерживаются какой-либо классификации. Проще всего аномалии в структуре сперматозоидов классифицировать по измененным частям их: аномалии в области головки, шейки, средней части (тела) и хвоста (рис. 5).

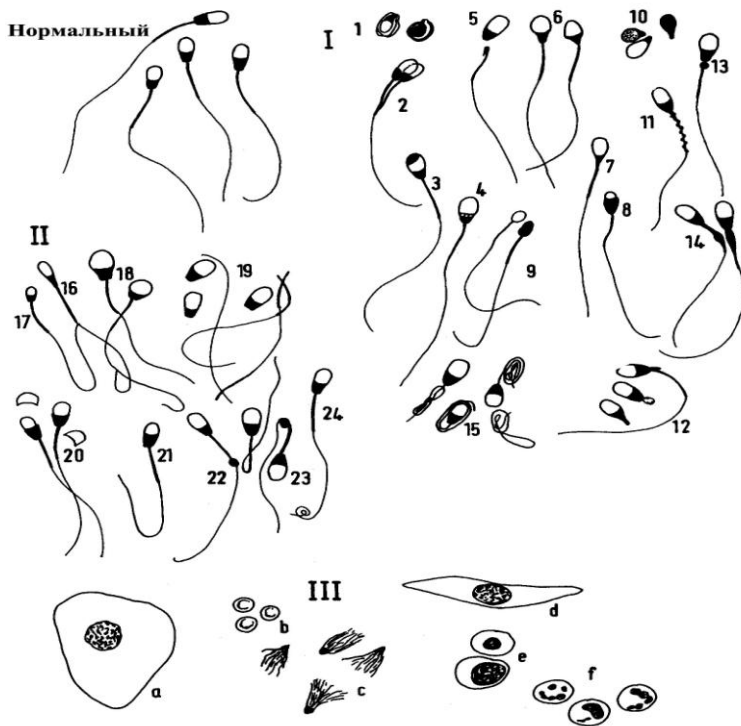


Рис. 5. Классификация патологических форм сперматозоидов в зависимости от степени влияния их на плодовитость.

Главные дефекты (I): 1 – несформировавшиеся клетки; 2 – двуденные; 3 – дефект акросомы (шишковидный сперматозоид); 4 – «корона» дефект; 5 – отделенная головка (хвост активный); 6 – грушевидные формы; 7 – головка с суживающимся основанием; 8 – головка с ненормальными очертаниями; 9 – маленькая ненормальная головка; 10 – отделенные ненормальные головки; 11 – штопорообразное тело; 12 – дополнительный хвост, культивидное тело; 13 – проксимальная цитоплазматическая капля; 14 – псевдокапелька, утолщение тела; 15 – извитой или сильно сложенный хвостик,

«даг» дефект (клок свалывшейся шерсти). *Второстепенные дефекты (II)*: 16 – узкая головка; 17 – маленькая нормальная головка; 18 – гигантская и короткая широкая головка; 19 – отделенные нормальные головки; 20 – отделенные акросомы; 21 – асимметричное прикрепление тела и хвоста; 22 – дистальная цитоплазматическая капля; 23 – правильно изогнутый хвост; 24 – закрученный кончик хвоста. *Другие клеточные элементы (III)*: а – эпителиальные клетки; b – эритроциты; с – медузоподобные образования; d – ладьевидные клетки; e – мононуклеарные лейкоциты; f – нейтрофилы (Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. Eighth Edition. 2001. 868 p. Reprinted 2007).

Головки могут быть двойными, конусообразными и грушевидными, круглыми, сморщенными, большими, узкими, удлинненными, уменьшенными, асимметричными. Наиболее частые *аномалии шейки*: сломанные шейки, бесхвостые головки. *Аномалии тела*: изогнутые, разорванные, удлинненные, утолщенные, двойные, нитевидные и рудиментарные, а также ненормальное прикрепление тела к головке. *Аномалии хвостика*: извитые, двойные, сломанные, изогнутые, закрученные и срезанные.

В сперме барана и быка содержание морфологически ненормальных сперматозоидов не должно превышать 7 – 14%, в сперме хряка и жеребца – 20%.

5.2.3. Определение метаболической активности сперматозоидов

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма, желток куриных яиц, 2,9%- и 3,6%-ный раствор натрия цитрата; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные стекла с луночками, стеклянные трубки с внутренним диаметром 0,8–1 мм, бактериологические пробирки; цилиндры мерные на 10, 100 и 1000 мл, колбы емкостью 100 мл и 1 л, банка из темного стекла с притертой пробкой; марлевые салфетки; водяная баня, метиленовая синька, физиологический раствор, минеральное (вазелиновое) масло; секундомер или часы, аналитические (точные) весы.

Предложены следующие методы определения метаболической активности сперматозоидов: измерение поглощения кислорода из расчета на стандартное число клеток, определение скорости обесцвечивания метиленовой сини, определение индекса фруктолиза и величины рН и др. Каждый из этих способов объективно отражает активность метаболических процессов, происходящих в сперматозоидах при температуре выше 20–25°C. Поэтому в большинстве случаев отмечают корреляционную связь данных, полученных с помощью этих методов, с основным показателем качества спермы – ее оплодотворяющей способностью. В практике обычно используют способ, основанный на способности сперматозоидов при отсутствии источника кислорода обесцвечивать метиленовую синьку.

Определение качества спермы по скорости обесцвечивания метиленовой синьки. В процессе гликолиза при окислении фосфоглицеринового альдегида выделяется водород, который переносится на пировиноградную кислоту, превращая ее в молочную. Метиленовая синь является хорошим акцептором водорода. При присоединении двух ионов водорода этот краситель теряет свой темно-синий цвет и превращается в лейкометиленовый синий, представляющий собой белый порошок. Водород фруктоза отдает под воздействием внутриклеточного фермента дегидрогеназы. Реакция должна происходить без доступа воздуха, так как кислород воздуха быстро окисляет лейкометиленовый синий в метиленовый.

По методу *Н.П. Шергина* на предметное стекло с луночкой дозатором пипеточным (глазной пипеткой) наносят каплю свежеполученной спермы быка или барана и добавляют каплю 0,01%-ного раствора метиленовой синьки. Быстро перемешивают обе капли стеклянной трубкой с внутренним диаметром 0,8–1 мм и набирают в нее смесь так, чтобы образовался столбик длиной около 2 см без пузырьков воздуха (пены). Трубку кладут на белую бумагу при температуре 20–22°C и наблюдают, через какое время голубой столбик обесцветится. По концам, где мениски смеси соприкасаются с воздухом, окраска обычно не изменяется. Оценивают сперму исходя из сроков обесцвечивания смеси: *хорошее качество* – для быка 5–10 и для барана 3–7 мин, *среднее* – соответственно 11–30 и 8–12 мин, *плохое* – более 30 мин для быка и более 12 мин для барана.

Раствор метиленовой синьки необходимо приготовить заранее. Для этого сначала готовят 1000 мл физиологического раствора на дистиллированной воде, затем растворяют в нем 100 мг краски. Краску переливают в банку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в закрытом шкафу.

В качестве стеклянных трубочек можно использовать кусочки разбитых шприцев-катетеров для осеменения коров. Концы таких трубочек шлифуют наждаком или напильником.

Метод Бека и Солсбери (*Beck G.H., Salisbury G.W.*). В бактериологическую пробирку (объем 10 мл) вносят 0,2 мл свежеполученной спермы и 0,8 мл желточно-цитратной среды (40 мл 2,9%-ного раствора натрия цитрата и 10 мл желтка); тщательно смешивают. Добавляют 0,1 мл раствора метиленовой синьки, приготовленного из 50 мг красителя и 100 мл 3,6%-ного раствора натрия цитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Содержимое пробирки смешивают и покрывают слоем минерального (вазелинового) масла толщиной 1,25 см.

Затем пробирку помещают в водяную баню с температурой 43–46°C. При такой температуре восстановление метиленовой синьки происходит наиболее быстро. Бактерии, попавшие в образец при по-

лучении или обработке спермы, не оказывают влияния на результаты, так как многие из них погибают. Лучшие по качеству эякуляты быка обесцвечивают краситель в течение 3–6 мин.

5.2.4. Определение абсолютного показателя выживаемости (живучести) сперматозоидов вне организма

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма, среда для разбавления спермы, оттаянная сперма; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; термостат, микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями ОИ-35 либо МКИ-11, микроскоп МБИ-11 (МБИ-14) с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; термостат для микроскопа, обогревательные столики; марлевые салфетки.

Установлена зависимость оплодотворяющей способности спермы от степени сохранения подвижности сперматозоидов при стандартных условиях (например, при температурах, близких к 0°C). В.К. Миловановым был предложен метод, который позволяет одновременно проследить за характером снижения подвижности сперматозоидов в течение всего срока хранения, определить максимальную продолжительность жизни отдельных сперматозоидов и найти оптимальную степень разбавления. В настоящее время степень разбавления спермы варьирует в более узких пределах, чем было предусмотрено автором, поэтому метод этот в полном объеме не используется. Достаточно исследовать сперму после стандартного разбавления: от 100–125 до 150–187 млн. сперматозоидов в мл из расчета получения 10–15 млн. подвижных клеток в грануле или солоmine после оттаивания.

Для исследования 1–2 мл разбавленной спермы оставляют в холодильнике при 2–4°C и ежедневно определяют подвижность сперматозоидов при температуре 38–40°C до полной их гибели. Суммируя все произведения времени (в часах), в течение которого наблюдалась та или иная подвижность, на активность сперматозоидов (в баллах), вычисляют абсолютный показатель живучести (табл. 3). Для спермы барана высокого качества он должен быть не ниже 1600, для спермы быка – 1000–1400, для спермы жеребца – 400–730. Максимальная продолжительность жизни для сперматозоидов (в часах) – для быка не менее 200, для барана – 250 и жеребца – не менее 300. В сперме хряка, разбавленной средой для долгосрочного хранения при темпера-

туре 17 – 18°C, сперматозоиды могут сохранять подвижность в течение двух – трех недель.

Для определения выживаемости сперматозоидов в замороженных эякулятах применяют экспресс-методику. Из каждого дуплетного эякулята по 2 соломинки (гранулы) оттаивают и помещают в термостат при 38°C.

Фиксируют время оттаивания и одновременно определяют исходную подвижность сперматозоидов. Через 5 часов оценку повторяют. Пригодной для осеменения считают сперму (быка), начальная подвижность которой не менее 4 баллов и через 5 ч хотя бы единичные сперматозоиды проявляли движение.

Т а б л и ц а 4. Образец записи результатов исследования спермы

Дата исследования	Время исследования	Подвижность, баллов (a)	Время сохранения подвижности, ч (t)	Произведение подвижности на время (at)
7.02	8 ⁰⁰	8	12	96
8.02	8 ⁰⁰	7	24	168
9.02	8 ⁰⁰	6	24	144
10.02	8 ⁰⁰	5	24	120
11.02	8 ⁰⁰	4	24	96
12.02	8 ⁰⁰	3	36	108
14.02	8 ⁰⁰	1	36	36
15.02	8 ⁰⁰	1	24	24
16.02	8 ⁰⁰	0	-	0
				792

5.2.5. Определение сперматозоидов с поврежденной акросомой

Объекты исследования, материалы и оборудование: замороженная в соломинах или гранулах сперма быка; 10%-ный раствор желатины (рН 7,0); фазово-контрастный микроскоп или микроскопы БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) с осветителями ОИ-19 (ОИ-35, МКИ-11) и конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО; дозаторы пипеточные и наконечники к ним или Пастеровские пипетки; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; термостат.

Акросома сперматозоидов содержит две группы ферментов, которые играют важную роль в процессе оплодотворения. Различные дефекты ее или повреждения структуры в процессе обработки и хранения спермы приводят к потере сперматозоидами оплодотворяющей способности. Такие повреждения, как правило, возникают в процессе замораживания и оттаивания спермы. При этом большое значение

имеют индивидуальные особенности производителей. Высокая частота повреждений акросомы может существенным образом повлиять на результаты осеменения. Поэтому целесообразно оценивать замороженную сперму не только по подвижности, но и по числу сперматозоидов с поврежденной акросомой. Для этой оценки используют интерференционный или фазово-контрастный микроскоп. При отсутствии их достаточно иметь микроскоп БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) и конденсор темного поля ОИ-10.

Сперматозоиды по окраске почти не отличаются от окружающей среды. Они не адсорбируют свет, не изменяют ни интенсивность, ни цвет прошедшего через них луча, поэтому микроскопия их затруднена. Однако они изменяют фазу волны света. Для обнаружения сдвига фаз используются интерференционные или фазово-контрастные микроскопы.

В фазово-контрастном микроскопе освещение устроено по методу светлого поля. Но в нем имеются: 1) дополнительная (кольцевая) осветительная диафрагма, которая помещается под конденсором (в его передней фокальной плоскости) и 2) фазовая пластинка из вещества, поглощающего свет и вносящего определенный сдвиг фаз; фазовая пластинка помещается в задней фокальной плоскости объектива, где изображается и кольцевая диафрагма. Изображения диафрагмы и фазовой пластинки (вследствие соответствия их размеров) совмещаются. Весь свет, не прошедший через объект, проходит через фазовую пластинку. Луч, прошедший через объект, распадается (подвергается дифракции) на пучки света (убывающей интенсивности), выходящие из объекта под разными углами. Этот дифрагированный свет проходит через весь зрачок объектива, в основном вне изображения кольцевой диафрагмы. Два пучка лучей – один от объекта, другой от среды, в которой находится объект, – соединяются, преобразуя при этом фазовые изменения, обусловленные объектом, в амплитудные (различной интенсивности). В результате получается видимое, фазово-контрастное изображение структуры объекта, в котором распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф.

Экспресс метод определения оплодотворяющей способности сперматозоидов (разработанный под руководством Соколовской И.И.). Этот метод позволяет определять состояние акросом непосредственно у движущихся сперматозоидов в неразбавленной или оттаянной сперме быка, а также соотношение подвижных и неподвижных клеток.

Замороженную сперму быка оттаивают и разбавляют 10%-ным раствором желатины в отношении 1:1 для создания повышенной вязкости и снижения интенсивности движения сперматозоидов. Каплю разбавленной спермы (0,03 мл) наносят на предметное стекло дозатором пипеточным (Пастеровской пипеткой) и накрывают покровным стеклом.

Сперму за пределами стекла удаляют при помощи фильтровальной бумаги. Приготовленные мазки немедленно исследуют под микроскопом БИОЛАМ, оснащенный окуляром 15х и объективом 40х и конденсором ОИ-10. Необходимый уровень освещения обеспечивается при помощи осветителя ОИ-19.

Для получения четкого изображения прикрывают диафрагму конденсора и опускают его кремальеру до упора; находят изображение сперматозоидов в светлом поле конденсора, затем наводят фокус, полностью открывают диафрагму конденсора и вводят в ход лучи темного поля. Следя за изображением, медленно перемещают кремальеру вверх до появления ярко светящихся контуров половых клеток на темном фоне.

На этом фоне можно отчетливо различить три категории клеток:

– сперматозоидов с ярким свечением всего контура головки, иногда с утолщенным передним краем – это биологически полноценные клетки с неповрежденной акросомой; у таких сперматозоидов ярко светятся также тело и хвост (рис.6);

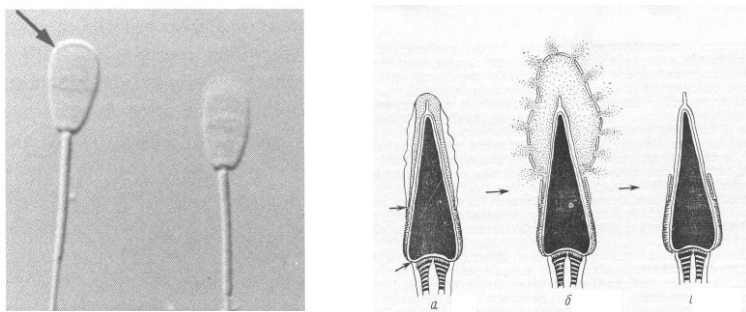


Рис. 6. Слева: сперматозоид с нормальной акросомой (показана стрелкой) и поврежденной. Справа: схема акросомной реакции и потеря плазматической и наружной акросомной мембран при оплодотворении.

– сперматозоидов с отчетливо заметным задним ядерным кольцом и хвостом, но слабо заметным контуром передней половины головки – это неполноценные половые клетки с разбухшей акросомой;

– сперматозоидов с полностью отсутствующими контурами всей передней части головки – это клетки с полностью разрушенной или утерянной акросомой.

Просматривают в препарате 100 сперматозоидов, обладающих прямолинейным поступательным движением, и вычисляют процент клеток с поврежденной акросомой. Каждый образец спермы исследу-

ют сразу после ее оттаивания и спустя 1 и 2 ч (по И.И. Соколовской – однократно). В период исследований сперму выдерживают в термостате при температуре 37°C.

В сперме *хорошего* качества через 2 ч после оттаивания не должно содержаться более 7 % дефектных сперматозоидов (из всех подвижных). В сперме *удовлетворительного* качества число таких клеток может быть от 8 до 11%. При содержании 12 % или более дефектных сперматозоидов сперма оценивается как *низкого* качества (Медведев Г.Ф., Турчанов С.О., 2000).

5.2.6. Определение подвижности сперматозоидов в оттаянной сперме по способу БелНИИЖ

Объекты исследования, материалы и оборудование: замороженная в соломинах сперма быка; 2,9%-ный раствор натрия цитрата в ампулах; 7%-ный раствор глюкозы или 9%-ный раствор лактозы; микроскопы БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) с осветителями ОИ-19 (ОИ-35, МКИ-11) и конденсор ОИ-10 или фазово-контрастный микроскоп; биотермостат, обогревательные столики, дозаторы пипеточные и наконечники к ним, глазные палочки; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; термостат.

Оттаянную в соломинке сперму выливают в ампулу с 2,9%-ным раствором натрия цитрата (1 мл, $t = 38^{\circ}\text{C}$), содержимое осторожно смешивают. В небольшой (5–10 мл) флакон наливают 1 мл 7%-ного раствора глюкозы медицинской безводной или 9%-ного раствора лактозы и добавляют 0,2 мл разбавленной после оттаивания спермы; температура спермы и раствора – 18–20°C. Небольшую каплю вторично разбавленной спермы наносят стеклянной глазной палочкой (дозатором пипеточным) на подогретое ($t = 38^{\circ}\text{C}$) предметное стекло, накрывают покровным стеклом, помещают на обогревательный столик микроскопа и просматривают при увеличении 600–800х. Подсчитывают всех сперматозоидов в пяти полях зрения, причем в каждом из них сначала учитывают подвижных. Подсчитывают общее количество просмотренных сперматозоидов и вычисляют процент подвижных.

Для лучшей видимости сперматозоидов рекомендуется использовать конденсор ОИ-10.

5.2.7. Оценка качества спермы птиц

Для оценки спермы определяют ее внешние свойства (цвет, консистенцию), объем, густоту, подвижность и концентрацию сперматозоидов. Объем эякулята определяют по верхнему мениску градуированного спермоприемника или градуированной пипеткой. Цвет и густоту спермы определяют визуально.

У индюка *густая сперма* имеет консистенцию сметаны, в 1 мл содержит 8 млрд. сперматозоидов или более. Она почти не стекает по желобку копуляторного органа, в массе своей имеет выпуклую форму. *Средняя сперма* с консистенцией густых сливок, медленно стекает по желобку толстым слоем, в 1 мл – 6–8 млрд. клеток. *Редкая сперма* с консистенцией густого молока или редких сливок тонким слоем стекает быстро по желобку, в 1 мл содержит 3–5 млрд. сперматозоидов.

Подвижность сперматозоидов оценивают под микроскопом, нередко в смешанных эякулятах (от 7–10 самцов), а концентрацию – путем подсчета в счетной камере и с помощью ФЭК или спектрофотометра. Вследствие высокой концентрации оценка подвижности сперматозоидов по 10-балльной системе затруднена.

Н. Канарейкин (1975) использовал 6-балльную систему оценки качества спермы индюков:

1 балл – движение сперматозоидов настолько энергично, что едва можно различить отдельные клетки;

2 балла – движение сперматозоидов энергичное, но можно различить отдельные клетки;

3 балла – движение спокойное поступательное;

4 балла – слабое (ленивое) замирающее движение;

5 баллов – слабое колебательное движение;

6 баллов – сперматозоиды неподвижные.

Для осеменения рекомендует использовать сперму индюков с оценкой 1 и 2 балла.

Контрольные вопросы

1. В какие сроки должна быть проведена оценка полученной спермы? При какой температуре хранят ее до разбавления?

2. От чего зависят внешние свойства спермы – цвет и консистенция? Каковы характерные цвет и консистенция спермы хорошего качества у различных производителей животных и птиц?

3. Чем может быть загрязнена сперма? Что делают со спермой, загрязненной или с измененными цветом, консистенцией?

4. Можно ли ограничиться оценкой внешних свойств спермы?

5. Как влияет понижение температуры на подвижность сперматозоидов в свежеполученной сперме? При какой температуре следует определять их подвижность?

6. Влияют ли толщина мазка и процент подвижных сперматозоидов на результаты оценки спермы при микроскопическом исследовании? Как оценивают подвижность сперматозоидов в различных странах?

7. С какой целью определяют концентрацию сперматозоидов в сперме?

8. Какой метод наиболее часто используется для определения концентрации сперматозоидов? Какие факторы влияют на этот показатель?

9. Какие наиболее типичные отклонения встречаются в морфологии сперматозоидов? Как их классифицируют?

10. Какие факторы могут вызвать появление в сперме повышенного числа ненормальных сперматозоидов?

11. Какие аномалии сперматозоидов обусловлены генетически и какие связаны с факторами внешней среды? Какие аномалии наиболее сильно влияют на плодовитость производителя?

12. Какие тесты можно использовать для оценки интенсивности метаболических процессов в сперме? Их сущность?

13. Существует ли корреляционная связь между концентрацией сперматозоидов в сперме и индексом фруктолиза, величиной рН, скоростью обесцвечивания метиленовой сини?

14. Как изменяется рН свежеполученной спермы при хранении при комнатной температуре?

15. Каковы стандартные показатели качества спермы быков, баранов, хряков, жеребцов, кроликов и индюков?

16. Какие показатели качества спермы подвержены наибольшему изменению?

17. Возможно ли улучшение качества спермы после ее получения?

18. Какие методы оценки качества спермы позволяют наиболее объективно и точно прогнозировать ее оплодотворяющую способность?

19. Результаты какой оценки спермы: до замораживания (охлаждения) или после оттаивания более важны при искусственном осеменении?

20. Как определить состояние акросом у подвижных сперматозоидов? Сохраняют ли сперматозоиды способность к оплодотворению при повреждении акросомы?

21. Какие факторы влияют на результаты оценки качества спермы?

22. Почему необходимо постоянно регистрировать показатели качества эякулятов у одного и того же производителя?

Тема 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НА СПЕРМАТОЗОИДОВ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Цель занятия: изучить действие физических и химических факторов на подвижность и выживаемость сперматозоидов.

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные – бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего

вида животных); термостат для микроскопа; микроскопы с осветителями, микроскоп МБИ-11 (БИОЛАМ - М) с телевизионной камерой; обогревательные столики, металлическая пластина; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; марлевые салфетки, полотенца; растворы натрия хлорида: физиологический, 0,5%-ный и 3%-ный; 1%-ный раствор молочной кислоты; лед, поваренная соль; ртутный термометр; прибор для измерения рН, раствор универсального индикатора (или бумажные индикаторные полоски).

Методические указания. Занятия проводят в ветеринарной клинике и лаборатории кафедры или в учебном пункте. Сначала преподаватель объясняет студентам действие на сперматозоидов некоторых факторов, знакомит их с методами контроля физических и химических свойств сред для разбавления спермы. Затем студенты готовят искусственную вагину для получения спермы (от быка или самца другого вида животных), получают сперму; одновременно приготавливают и среду для разбавления спермы. Разделившись на группы (по 2 человека за столом) изучают действие температуры, растворов с различным осмотическим давлением, молочной кислоты на подвижность и выживаемость сперматозоидов. В конце занятия преподаватель демонстрирует студентам определение осмотического давления среды для разбавления спермы методом криоскопии и рН среды потенциометрическим методом.

Изучение действия высокой и низкой температуры. В выделенной сперме, имеющей температуру 38,5°C, сперматозоиды проявляют высокую метаболическую активность и подвижность. При повышении температуры до 41–43°C подвижность их возрастает, а скорость гликолиза в сперме быка достигает максимума при 43–46°C. При температуре около 50°C происходит денатурация белка и другие необратимые изменения, которые приводят к гибели клеток. Продолжительность жизни сперматозоидов при температуре выше 20°C ограничена несколькими часами. Это связано с быстрым расходом энергии ряда химических соединений и неспособностью восстанавливать или поглощать их из внешней среды.

При понижении температуры интенсивность движения сперматозоидов уменьшается, а при температуре 7°C они приостанавливают свои движения. Интенсивность метаболических процессов снижается, но полностью они не прекращаются и протекают еще на достаточно высоком уровне (состояние анабиоза). Продолжительность сохранения оплодотворяющей способности сперматозоидов при таких температурах (0–5°C) увеличивается до нескольких дней.

После подогревания охлажденной спермы подвижность сперматозоидов восстанавливается. Однако это наблюдается в том случае, если

охлаждалась сперма медленно. В других случаях охлаждение может вызвать у сперматозоидов необратимые изменения и их гибель. Это происходит вследствие "холодового удара" (температурного шока) в результате резкого охлаждения. Температурный шок наблюдается при температурах выше 0°C, но возможен и при отрицательных температурах, когда сохраняется жидкая фаза и имеются условия для протекающих осмотических процессов.

Наиболее чувствительны к быстрому снижению температуры сперматозоиды хряка. В неразбавленной сперме быка температурный шок у сперматозоидов возможен при температуре ниже 24°C. В разбавленной желточно-цитратной или молочной средой сперме действие температурного шока может проявиться при резком снижении температуры ниже 16°C. В связи с этим в практике должны обращать внимание на скорость охлаждения разбавленной спермы до момента замораживания.

Для изучения действия различных температур на сперматозоидов из полученной спермы готовят три мазка; предметные стекла предварительно подогревают до температуры спермы. *Один мазок* помещают поочередно на два подготовленные обогревательные столики с температурой 38°C и 43–45°C и определяют под микроскопом подвижность сперматозоидов; затем мазок снимают с обогревательного столика и оставляют при комнатной температуре на 5–7 мин. *Второй мазок* помещают на лед и охлаждают несколько минут. После охлаждения вначале определяют под микроскопом состояние сперматозоидов при комнатной температуре, а затем кладут на обогревательный столик и определяют их подвижность при температуре 38°C.

Также поступают и с уже исследованным первым мазком: просматривают его при комнатной температуре, а потом – после подогревания до 38°C.

При комнатной температуре в первом мазке сперматозоиды будут проявлять заметную подвижность, а после подогревания исходная подвижность восстановится. Во втором мазке при комнатной температуре только отдельные сперматозоиды проявят слабые движения, а после подогревания немногие из них восстановят подвижность; большинство же клеток будут неподвижными – они погибнут вследствие температурного шока.

В третьем мазке определяют подвижность сперматозоидов сначала при температуре 38°C, а затем мазок помещают на подогревую до 55°C пластину и оставляют на ней несколько минут. После этого опять определяют подвижность сперматозоидов. Все клетки погибнут и не проявят подвижность.

Изучение действия растворов (сред) с различным осмотическим давлением. Осмотическое давление спермы определяется количеством

растворенных в плазме веществ: минеральных и органических. Выражается осмотическое давление в атмосферах; колеблется в пределах 6,7–8,7 атм. Определяется этот показатель на основании величины депрессии, т.е. точки замерзания, которая для спермы животных равна примерно минус 0,6°C, и исходя из правила, что раствор, содержащий в 1 л грамм-молекулу не электролита, дает депрессию минус 1,86°C и имеет осмотическое давление 22,4 атм. Для получения равных по осмотическому давлению сперме растворов (изотонических) необходимо брать 1/3 грамм-молекулы не электролита на 1 л дистиллированной воды. Если берется электролит, то количество вещества уменьшается во столько раз, на сколько ионов диссоциирует его молекула. Например, для приготовления изотонического раствора натрия хлорида необходимо взять не одну треть, а одну шестую грамм-молекулы, т.е. 58,5:6.

Если поместить сперматозоидов в *гипотонический* раствор или дистиллированную воду, то они быстро погибнут вследствие повышения внутреннего давления. Под влиянием гипотонического раствора хвостики сперматозоидов набухают и закручиваются. В *гипертоническом* растворе сперматозоиды погибают от обезвоживания. Они сморщиваются, а хвостики их приобретают зигзаговидную форму. Особенно губительно для сперматозоидов быстрое изменение осмотического давления. В *изотоническом* растворе (физиологический раствор, среда Дюльбекко и др.) сперматозоиды будут проявлять высокую подвижность в течение достаточно продолжительного периода времени.

Для изучения действия на сперматозоидов растворов с различной концентрацией солей из полученной спермы (или оттаянной) готовят три мазка. Для этого на подогретое предметное стекло наносят дозатором пипеточным или глазной пипеткой три капельки спермы и рядом с каждой из них капельку одного из трех растворов натрия хлорида: изотонического, 0,5%-ного и 3%-ного. Каждую пару капелек (сперму и раствор) осторожно накрывают покровным стеклом так, чтобы они соединились под покровным стеклом, но граница между ними четко просматривалась. Все три мазка исследуют под микроскопом и наблюдают за состоянием сперматозоидов на границе раствора и спермы, а также в растворе и в сперме.

Изучение действия рН среды. Если сперму быка или барана хранить при комнатной температуре, то в результате гликолиза накапливается молочная кислота, буферные свойства спермы ослабевают, а затем показатель рН начинает снижаться. Подвижность сперматозоидов замедляется, а затем приостанавливается полностью вследствие наступления состояния анабиоза. Тормозится подвижность сперматозоидов и в гипертонических солевых растворах. При повышении рН и

температуры среды, или при добавлении воды в гипертонический раствор сперматозоиды восстанавливают свою подвижность.

Для перевода клеток в активное состояние температура должна быть тем выше, чем ниже рН. Так, в слабощелочной среде (рН 7,6) сперматозоиды двигаются при температуре 15–20°C, а при рН 6,0 движение их проявляется только при 35–40°C. При рН 4,5 одного повышения температуры уже недостаточно, чтобы вывести сперматозоидов из анабиоза, требуется одновременное повышение температуры и подщелачивание среды. Длительное воздействие на сперматозоидов среды с более низким значением рН приводит к их гибели. Слабые органические кислоты проявляют губительное действие и при рН выше 5,0. Так, при температуре 4°C молочная кислота может необратимо иммобилизовать сперматозоидов уже при рН 6,0.

Сразу же после получения из неразбавленной спермы готовят несколько мазков. На одном предметном стекле помещают две капельки спермы. Рядом с одной капелькой помещают капельку 1%-ного раствора молочной кислоты и обе капельки накрывают покровным стеклышком. На другую капельку спермы наносят такую же капельку кислоты и обе капли смешивают стеклянной палочкой. При помощи универсального индикатора определяют рН смеси: оранжевая или желто-оранжевая окраска капли свидетельствует о том, что рН ниже 6,0. После этого просматривают под микроскопом мазок на границе раствора кислоты и спермы и наблюдают за гибелью сперматозоидов после попадания их в раствор кислоты.

На другое предметное стекло также наносят две капли спермы. Рядом с одной помещают капельку подкисленного физиологического раствора (к 10 мл 1%-ного раствора натрия хлорида приливают 2 мл 1%-ного раствора молочной кислоты) и обе капли накрывают покровным стеклом. На другую капельку спермы наносят каплю подкисленного физиологического раствора и обе капельки смешивают. При помощи индикатора определяют рН смеси – показатель рН около 6,0. Мазок исследуют под микроскопом сначала при температуре 20–25°C, а затем – на обогревательном столике при 38°C. При комнатной температуре сперматозоиды будут неподвижны, но после подогревания некоторые из них могут возобновлять движения.

На третье предметное стекло также наносят две капли спермы. Рядом с ними помещают по капельке подкисленного физиологического раствора и по 1–2 капельки натрия цитрата. Первые три (четыре) капельки смешивают, накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом, а другие три (четыре) капельки после смешивания используют для определения рН смеси. После добавления натрия цитрата рН смеси приобретает щелочную реакцию (желто-зеленая или зеленая окраска). Подвижность сперматозоидов в такой смеси может быть достаточно активной.

Изучение действия антисептических растворов. Пункты (лаборатории) по искусственному осеменению нередко расположены вблизи ветеринарных аптек, где могут храниться различные дезинфицирующие вещества. На сперматозоидов они действуют губительно. Это относится и к моющим средствам: даже следы мыла на руках или на посуде проявляют на половые клетки губительное действие.

В процессе занятия целесообразно изучить действие на сперматозоидов ряда дезинфицирующих средств. Из неразбавленной или разбавленной спермы готовят несколько мазков. На одно предметное стекло наносят 2–3 капельки спермы. Рядом с каждой капелькой ее помещают по одной капельке какого-либо раствора: марганцовокислого калия 1:2000, лизола 1%-ного, спирта 70%-ного, йода 5%-ного, мыльной воды (и т.д.) и каждую пару капелек накрывают покровным стеклышком. Все три мазка исследуют под микроскопом и наблюдают за состоянием сперматозоидов на границе раствора и спермы, а также в растворе и в сперме.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Тема 4. Получение спермы от производителей	3
4.1. Получение спермы от производителей в искусственную вагину	4
4.2. Использование других методов для получения спермы от производителей	14
4.3. Получение спермы у самцов птиц	17
Тема 5. Оценка качества спермы	20
5.1. Обязательные методы оценки качества спермы	21
5.2. Дополнительные методы оценки качества спермы	31
Тема 6. Изучение влияния на сперматозоидов физических и химических факторов	44

Учебно-методическое издание

Григорий Федорович Медведев
Николай Иванович Гавриченко
Игорь Анатольевич Долин

БИОТЕХНИКА РАЗМНОЖЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Часть 2. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ САМЦОВ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ

Методические указания к лабораторным занятиям

Редактор Т.П. Рябцева
Техн. редактор Н. К. Шапунова
Корректор А.М. Павлова

ЛИ №348 от 09.06.2004. Подписано в печать 08.08.2008
Формат 60 x 84 ¹/₁₆. Бумага для множительных аппаратов.

Печать ризографическая. Гарнитура «Таймс».

Усл. печ.л. 3,02. Уч.-изд. л. 2,84.

Тираж 100 экз. Заказ 273/08. Цена 3940 руб.

Редакционно-издательский отдел БГСХА
213407, г. Горки Могилевской обл., ул. Студенческая, 2
Отпечатано в отделе издания учебно-методической литературы, ризографии
и художественно-оформительской деятельности БГСХА
г. Горки, ул. Мичурина, 5