

Урок № 7

Дисциплина/модуль: МДК 05.01 искусственное осеменение

Курс: 3, группа: 304;324

Преподаватель: Галина Л.А.

Тема: Физиология и биохимия спермы животных разных видов.

План урока:

1. Физиология и биохимия спермы.
2. Методы оценки качества спермы.

Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных В.П.Гончаров с. 252-259

Учебник находится: <https://vk.com/id20859881>

Физиология и биохимия спермы:

Состав спермы. Сперма состоит из двух частей различного происхождения: спермиев, образовавшихся в семеннике и созревших в придатке семенника и плазмы, являющейся смесью секретов придаточных половых желез. Спермии - главная часть спермы. В них заложена наследственная основа в виде молекулы ДНК. Однако и плазма играет важную роль, так как содержит различные химические вещества и соединения, обеспечивающие изотоничность, буферность, а также соответствующее осмотическое давление и рН.

Сперма содержит 85-97% воды и 3-15% сухих веществ. Сухой остаток на 9% состоит из белков и липидов. В сперме широко представлены биологически активные вещества: ферменты (кислая и щелочная фосфатаза, гиалу-ронизада, гликозидаза, амилаза, липаза, протеазы, оксидазы и др.), антиаглю-тинины, простаглапдины, гормоны (андрогены и эстрогены).

В сухом веществе спермы около 1% золы. Зольная часть содержит фосфор, кальций, магний, калий, натрий, хлор, цинк, железо, медь и ряд других элементов.

Строение спермиев. У быка спермии составляют от 12 до 20% объема эякулята. Спермий состоит из головки, шейки, тела и хвоста. Головка содержит наследственное вещество - дезоксирибонуклеиновую кислоту, передающую потомству свойства родителей. Шейка, тело и хвост - двигательные части спермия. Длина спермиев быка равна 65-72 микрометрам (микрометр равен 0,001 мм). Длина головки - 9, шейки - 1, тела - 10-13 и хвоста - 44-53 мкм (микрометров). У спермиев быка на головку приходится 51% общей массы, на шейку + тело - 16, на хвост - 33%. По объему сперматозоид быка в 20 тыс. раз меньше яйцеклетки коровы.

Химический состав спермы. Спермии содержат около 25% сухого вещества и 75% воды. Из сухого вещества 85% приходится на белки, 13,2% на ли-пиды и 1,8% - на минеральные вещества. В спермиях имеется также значительное количество фосфора (около 2,7%), а в головке содержание его доходит до 4%. Головки спермиев содержат много нуклеиновых кислот, а хвосты - липиды и разнообразные ферменты, активно участвующие в жизненных процессах спермия.

В спермиях находятся следующие минеральные вещества: натрий, магний, калий, кальций в виде солей фосфорной, хлористоводородной и серной кислот, а также в виде солей органических кислот.

Оболочка, одевающая спермий, имеет белковое происхождение и содержит большое количество цистина и является таким же белковым образованием, как и кератин кожи. Белок, содержащий серу, придает оболочке спермия прочность.

Виды движения спермиев. Способность двигаться - важное биологическое свойство спермиев, которое необходимо для достижения ими места оплодотворения и проникновения в глубь яйцеклетки. Центр движения находится в шейке и теле спермия. При отрывании хвоста от тела, спермий становится неподвижным, тогда как спермии без головки могут продолжать двигаться.

Имеется несколько видов движения спермиев: прямолинейно-поступательное (спермии активно перемещаются вперед по прямой линии), манежное (спермии вращаются вокруг своей головки или перемещаются по кругу с радиусом, равным примерно длине спермия), колебательное (спермии на одном месте изгибаются вправо и влево). Прямолинейно-поступательное движение спермиев является нормальным, а манежное и колебательное относится к аномальным.

Движение спермиев осуществляется при помощи хвоста. Он изгибается в одну сторону, а затем быстро выпрямляется. Такое движение хвоста быстро повторяется одно за другим. В результате отталкивания его от жидкости, в которой он находится, спермий продвигается вперед. В одну секунду хвост спермия быка при +37°C производит 9 ударов. Ложкообразная форма головки спермия при односторонних движениях хвоста обеспечивает вращение его вокруг своей продольной оси. Сочетание ударов хвоста с вращением вокруг оси приводит к прямолинейному поступательному движению спермия. Скорость движения спермиев быка около 5,6 мм/мин.

Нормальные спермии в медленно текущем потоке двигаются в одном направлении - против тока жидкости. Эта особенность называется реотаксисом. Благодаря реотаксису спермии в яйцевомыве двигаются навстречу с яйцеклеткой. В то же время неподвижные и мертвые спермии перемещаются вместе с током жидкости.

Все нормальные спермии имеют отрицательный электрический заряд. Наличие одноименного электрического заряда отталкивает спермиев друг от друга. Поэтому в густой сперме не происходит их столкновения или слипания. Под влиянием электрического заряда спермии располагаются параллельно друг другу, что создает определенный порядок в их движении.

При снижении электрического заряда взаимное отталкивание спермиев ослабевает, и они агглютинируют, т.е. слипаются головками или всеми частями. Агглютинация может быть от разных причин: при увеличении кислотности спермы, при наличии в нем ионов металлов (кальция, магния, алюминия), которые ослабляют или полностью снижают отрицательный электрический заряд спермиев. Склеивание может быть также при наличии агглютининов - особых веществ, появляющихся при иммунизации организма самки чужеродными белками. Сперма с агглютинированными спермиями - показатель низкого качества, так как такие спермии не способны продвигаться в половых путях самки для встречи с яйцеклеткой.

Влияние на спермиев внешних факторов. После получения (извлечения из организма самца) спермии подвергаются воздействию факторов окружающей среды.

Действие света. Прямые солнечные лучи возбуждают движение спермиев, но быстро убивают их (за 20-40 мин). Неблагоприятен и сильный электрический свет. Рассеянный свет не оказывает вредного воздействия. Следовательно, и в процессе получения, разбавления и использования, сперму надо оберегать от прямого воздействия солнечного света.

Действие температуры. Жизнеспособность спермиев вне организма зависит от температуры жидкости, в которой они находятся. Наиболее подвижны спермии при

температуре близкой к температуре тела животного (+37-39⁰С). При температуре 45⁰С спермии утрачивают свою оплодотворяющую способность вследствие инактивации ферментных систем, а при температуре 48⁰С они погибают.

При температуре ниже, чем температура тела животных, движение спермиев замедляется. При постепенном охлаждении спермы до температуры около 0⁰С движение спермиев прекращается и они переходят в состояние анабиоза (неподвижное состояние спермиев, при котором они сохраняют жизнеспособность). При подогревании спермы до температуры 37-39⁰С подвижность их восстанавливается. При низких температурах спермии сохраняют жизнеспособность длительное время. Поэтому большинство методов хранения спермы связано с его охлаждением.

Однако резкое охлаждение спермы вызывает температурный шок или холодовой удар - гибель спермиев или их повреждение с потерей оплодотворяющей способности. Температурный шок наиболее сильно проявляется при быстром понижении температуры спермы - ниже 18⁰С. Наиболее чувствительна к понижению температуры свежеполученная сперма. После выдержки спермы при комнатной температуре в течение 1-2 ч она становится менее чувствительна к быстрому понижению температуры. Чтобы избежать гибели спермиев от холодowego удара, необходимо все работы со спермой проводить при температуре не ниже 18⁰С.

Осмотическое давление. Спермии очень чувствительны к изменению осмотического давления, т.е. концентрации веществ в жидкости, в которой они находятся. Осмотическое давление в жидкости должно быть равным внутреннему осмотическому давлению спермиев. Если спермии поместить в гипотонический раствор или в обыкновенную воду, они быстро погибнут вследствие повышения внутреннего давления. Под влиянием гипотонического раствора хвостики спермиев набухают и закручиваются кольцом или полукольцом.

Если сперму смешать с гипертоническим раствором (например, 3%-й раствор хлористого натрия), спермии тоже погибнут, но уже от обезвоживания. Они сморщиваются, их хвостики приобретают зигзаговидную форму.

Исходя из этого, среда для разбавления спермы, а также рабочие растворы должны быть изотоничными сперме. К ним следует отнести 1%-й раствор хлористого натрия, 1%-й раствор двууглекислой соды, 2,9%-й раствор натрия цитрата, 6,4%-й раствор глюкозы.

Кислотность среды. Все клеточные процессы в сперме происходят нормально только при определенных концентрациях водородных ионов (рН) среды. Свежеполученная сперма быка имеет нейтральную, или близкую к нейтральной (рН 6,7-7,0).

Накопление водородных ионов тормозит процессы жизнедеятельности спермиев. При рН 6,3-6,4 наступает кислотный анабиоз. Дальнейшее увеличение кислотности вызывает гибель спермиев.

Сдвиг рН в щелочную сторону вначале активизирует спермии, но при рН 7,8-8,0 наступает их гибель.

Цельная сперма быка способна противостоять изменениям рН среды благодаря наличию в ее составе солей слабых кислот-карбонатов, фосфатов, цитратов. Это свойство называется буферностью. Буферность играет большую роль в обеспечении жизнедеятельности спермиев, предохраняя их от повреждений, связанных с резким изменением среды.

Действие солей. Большое влияние на жизнедеятельность спермиев оказывают растворы солей электролитов, т.е. растворы, проводящие электрический ток.

В приатке семенника солей содержится в 10 раз меньше, чем в свеже-полученной сперме, поэтому спермии там могут храниться длительное время (до 2-х месяцев). При эякуляции концентрация солей в плазме повышается, а они действуют возбуждающе на спермиев, что сокращает срок их жизни.

Электролиты состоят из катионов и анионов. Одно- и двухвалентные катионы существенно не изменяют выживаемость спермиев.

Анионы оказывают более сильное влияние, чем катионы, причем действие анионов зависит от валентности. Анионы хлоридов разрыхляют оболочку спермиев и разрушают липопротеидный покров, что ведет к гибели спермиев. Так, по данным М.В. Поповой, в сперме жеребца содержится 476 мг % хлоридов, а в семени баранов их всего 47 мг %. Этим можно объяснить низкую переживаемость спермиев жеребца вне организма (менее одних суток), тогда как спермии быка и барана могут жить вне организма 3-7 и более суток. Анионы фосфатов, сульфатов, цитратов, наоборот уплотняют оболочку спермиев и стабилизируют электрический потенциал. В связи с этим соли фосфорной, серной, лимонной кислот используются в составе сред для разбавления спермы.

Влияние сахаров. В противоположность солевым растворам на жизнеспособность спермиев благоприятно действуют растворы различных сахаров, особенно фруктозы. Добавление сахарных растворов (фруктозы, глюкозы, сахарозы, лактозы и др.) в определенных концентрациях устраняют возбуждающее действие хлористых солей на спермиев, что увеличивает срок их жизни.

Влияние химических веществ и медикаментов. Большинство химических соединений токсичны для спермиев. Этим следует объяснить неудачи искусственного осеменения животных, когда его проводят в ветеринарных лечебницах, амбулаториях, или когда используют те же инструменты, которые применяют во время лечебной работы.

Установлено, что спермиев быстро убивают сулема в дозе 0,000003 г, марганцевокислый калий в дозе 0,00004 г, лизол, креолин, уксусная кислота в дозе 0,0003 г на 1 г спермы (А.П.Студенцов и др., 1986). Щелочи и кислоты, эфир, нашатырный спирт, скипидар, являются сильными ядами для спермиев. Окислы свинца, меди, железа, серебра также очень ядовиты для спермиев. Поэтому в практике искусственного осеменения пользуются стеклянными, пластмассовыми, хромированными, никелированными инструментами.

Следует также учитывать неблагоприятное действие на спермиев табачного дыма, паров одеколона, духов, чеснока, лука.

Наиболее приемлем для дезинфекции инструментов чистый спирт-ректификат, так как он легко удаляется (быстро испаряется) и хорошо растворяется в воде.

Из антимикробных средств малотоксичны нитрофураны (фурацилин, фуразолидон). Некоторые сульфаниламиды (стрептоцид) и большинство антибиотиков в низких концентрациях безвредны и их используют в составе разбавителей для спермы.

Влияние микробной и грибковой загрязненности. Сперма является хорошей питательной средой для сохранения и размножения многих патогенных и непатогенных микроорганизмов. Количественный и качественный состав микроорганизмов в сперме сильно колеблется в зависимости от здоровья, гигиенического состояния производителя, стерильности искусственной вагины, манежа, лаборатории, срока хранения спермы и многих других факторов. Особенно много микроорганизмов отмечается в воздухе помещения, где содержатся производители. По данным П. Маринова, у быков, выращен-

ных в плохих гигиенических условиях, в 1 мл спермы содержится от 85 до 230 млн. микроорганизмов.

Для осеменения допускают сперму с содержанием в 1 мл не более 5 тыс. микробных тел при отсутствии патогенной микрофлоры и синегнойной палочки.

Источники энергии для движения спермиев. Движения спермиев требуют значительных затрат энергии. Основными ее источниками являются углеводы (глюкоза, фруктоза, сорбит), липиды, свободные аминокислоты. Энергию спермии получают в результате трех сложных биохимических процессов: дыхания, гликолиза и распада аденозинтрифосфата (АТФ).

Дыхание - это получение энергии для движения и других жизненных процессов путем расщепления в присутствии кислорода различных питательных веществ, таких как углеводы, жиры, белки. Наиболее легко при дыхании в спермиях окисляются простые сахара (фруктоза и глюкоза). При наличии фруктозы отмечается меньший расход липидов, а белки почти не расходуются. Около 90% всей энергии спермии получают за счет дыхания.

Гликолиз (или фруктолиз)- это получение энергии путем расщепления сахароз в бескислородной среде. Несмотря на то, что при гликолизе спермии получают в 19 раз меньше энергии, чем при дыхании этот биохимический процесс имеет для спермиев важное значение, так как в половых путях самки кислорода нет.

Энергия, полученная в результате дыхания и гликолиза, аккумулируется в митохондриях спиральных нитей спермия в виде особого органического соединения - аденозинтрифосфата (АТФ). В хвосте спермия имеется специальный сократительный белок - спермозин и движутся спермии за счет энергии, которую отдает спермозину аденозинтрифосфат (АТФ).

+Знать каким путем спермии получают энергию очень важно, так как установлено, что основная причина гибели спермиев вне организма - это расходование энергии и накопление продуктов метаболизма или распада.

Методы оценки качества спермы.

В практике искусственного осеменения наибольшее применение получила оценка спермы по органолептическим признакам, концентрации, подвижности и переживаемости.

Для определения качества спермы на чистое предметное стекло стерильной палочкой или пипеткой наносят каплю спермы, накрывают покровным стеклом и микроскопируют при увеличении 140-300 раз. Исследования проводят при температуре 38-40°C, для чего применяют специальные термостаты или обогревательные столики (водяные, электрические).

Сперма может быть густой (средней густоты) - Г, редкой - Р, и без спермиев - А - азоспермия.

Сперма густая - все поле зрения микроскопа густо заполнено спермиями. Соответствует приблизительно концентрации более 1 млрд. спермиев.

Сперма средняя - между спермиями имеются промежутки примерно равные длине спермия. Концентрация такой спермы от 600 млн. до 1 млрд. спермиев.

Сперма редкая - в поле зрения микроскопа промежутки между спермиями превышают их длину. В 1 мл такой спермы содержится менее 600 млн. спермиев.

Для более точного определения концентрации спермиев применяют счетные камеры (Томма, Горяева и др.), фотоэлектрические колориметры или электрогемометры в соответствии с имеющимися наставлениями к этим приборам.

Активность (подвижность) спермы определяют по десятибалльной шкале. Чем она подвижнее, тем лучше качество спермы. Высшую оценку -10 баллов ставят, когда более 95% спермиев имеют прямолинейно-поступательное движение, 9 баллов соответственно - 90%, 8 баллов - 80% и т.д.

Если в поле зрения микроскопа видны спермии с маневренным движением (при попадании в сперму воды), то такую сперму обозначают буквой М, с колебательным - К, а неподвижность их - Н. Окончательно оценивают качество спермы с учетом густоты и активности, например: Г - 9 сперма густая, содержит 90% спермиев с прямолинейно-поступательным движением.

Микроскопическое исследование эякулята показывает, что среди нормальных спермиев всегда встречаются патологические формы в виде изолированных головок и хвостиков, гигантских и карликовых спермиев, спермиев с двумя головками, с двумя хвостиками, с головками неправильной формы, с закрученными и ненормально искривленными хвостиками.

Присутствие в сперме большого количества спермиев с ненормальной формой называется тератоспермией. В качестве конкретных причин образования уродливых форм спермиев отмечают:

1. Поражение семенника и придатка (гигантские и карликовые спермия).
2. Длительные промежутки между коитусами (обуславливающие старение и распад спермиев в придатке), отдельные головки, изолированные хвостики.
3. Половое истощение производителя вследствие большой половой нагрузки или недостаточного кормления (спермии с протоплазматической каплей в области шейки, тела и хвоста, т.е. незрелые спермии).

Быки, дающие сперму с содержанием более 18% уродливых спермиев, должны рассматриваться как бесплодные.

Определение выживаемости (живучести) спермиев вне организма. Известно, что чем дольше сохраняется жизнь спермиев, тем выше их оплодотворяющая способность. В.К. Милованов (1962) предложил определять абсолютный показатель живучести спермы. Делается это так. Образец спермы, после разбавления эякулята, оставляют в холодильнике при $2-5^{\circ}\text{C}$ и ежедневно определяют активность спермиев при температуре $38-40^{\circ}\text{C}$ до полной их гибели. Суммировав все произведения времени (в часах), в течение которого наблюдалась та или иная активность, на активность спермиев (в баллах), получают абсолютный показатель живучести. Для спермы быка он должен быть не ниже 1400.

Максимальная продолжительность жизни спермиев (в часах) должна быть для спермиев быка - не менее 200.

Для определения выживаемости спермиев после оттаивания применяют экспресс-метод. Сперму после оттаивания ставят на инкубацию в водяную баню при температуре 38°C. Фиксируют время оттаивания и одновременно определяют исходную подвижность спермиев. Через 5 часов оценку повторяют. Пригодной для осеменения считают сперму быка, исходная подвижность которой не менее 4 баллов и выживаемость 5 ч.

+Согласно действующим в настоящее время ГОСТам, свежеполученная сперма быка считается пригодной для разбавления, если она соответствует следующим требованиям:

Объем эякулята не менее 3,0 мл;

Цвет - молочно-белый или кремовый;

Консистенция сливкообразная;

Запах - нормальная сперма быка запаха не имеет;

Концентрация спермиев - не менее 0,4 млрд/мл;

Подвижность - не менее 8,0 баллов;

Выживаемость спермиев при 2-5°C после разбавления ГЦЖ средой:

Относительная - не ниже 249 ч;

Абсолютная - не ниже 1400 ч.

Количество спермиев с аномальной морфологией - не более 18%;

Количество патогенных микробов в 1 мл - не более 5000.

**Домашнее задание: Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных
В.П.Гончаров стр.252-259**