

of genetic erosion in particular species, apart from assessment of population and ecological indicators, evaluation of species genetic resources using molecular markers is needed.

*Keywords:* genetic resources, *Iris pumila* L., population studies, PCR markers, threatened species.

## **ВАСИЛЬЕВ В.С.**

*Харьковская государственная зооветеринарная академия*

*Украина, 62341, Харьковская обл., Дергачевский р-н, п. Малая Даниловка, ул. Академическая 5,*

### **ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ МЕТОДАМИ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

Широкомасштабная селекция животных, с необходимыми хозяйственно полезными признаками, в современных условиях не возможна без вспомогательных репродуктивных технологий [1]. Важное значение в воспроизведение животных имеет объективная оценка качества спермы. Для этих целей наиболее перспективно применение методов интерференционной микроскопии. Интерференционный биологический микроскоп позволяет наблюдать живые, не ок-

рашенные клетки с хорошим контрастом и проводить количественные измерения концентрации вещества, определять различные дефекты строения клеток, сухую массу, количество ДНК, белка в них [2]. Низкое качество спермы, снижение подвижности спермиев, как правило, связано с дефектами шейки, средней части, хвоста спермиев и т.д. [3]. Изучение различных дефектов клеток в эякулятах позволяет объективно оценивать качество спермы.

#### **Материалы и методы**

Исследовали нативную и технологически обработанную (криоконсервация, лазерное облучение) сперму быков, хряков, баранов, других животных и птиц и, в сравнительном аспекте, сперму человека. Определяли традиционными методами объем, активность, концентрацию, цвет, биохимические и другие показатели, для спермы человека определяли число активно-подвижных, подвижных, местно-качающихся и неподвижных спермиев в каждом эякуляте [2, 4].

#### **Результаты**

Хорошие условия для наблюдения под микроскопом образцов нативной или технологически обработанной спермы, мазков спермы создает дифференциальный интерференционный контраст (ДИК) при увеличении в 200–400 раз в однородном интерференционном сером, желто-коричневом или голубом цветах. На рис. 1 представлено изображение образца нативной спермы хрякав ДИК на сером фоне. Небольшое раздвоение изображений в доли микрометра, создает стереоэффект, оттеняющий изображение каждой клетки и позволяющий с хорошей контрастностью изучать нормальные и патологические формы спермиев.

С помощью интерференционной микроскопии определяли частоту различных дефектов в строении спермиев, измеряли размеры, сухую массу головок спермиев, количество ДНК и белков в них [2]. Учитывались возраст, порода животных, влияние генотипических и фенотипических факторов на качество спермы. Воспроизводительные способности племенных быков оценивали по результатам оплодотворения коров после первого осеменения.

В случае большого раздвоения (рис. 2), изображения каждой клетки, в которых фазы колебаний световых волн сдвинуты относительно фона на одинаковые величины, окрашены в разные интерференционные цвета. Сдвиг фазы в изображении тем больше, чем больше толщина и концентрация вещества в клетке. Измеряя сдвиг фазы световых волн, прошедших через клетку, зная размер клетки можно рассчитать сухую массу клетки, распределение концентрации вещества в клетке, показатель преломления и другие количественные характеристики клеток [2].



Рис. 1. Изображение спермиев хряков дифференциальном интерференционном контрасте в сером фоне

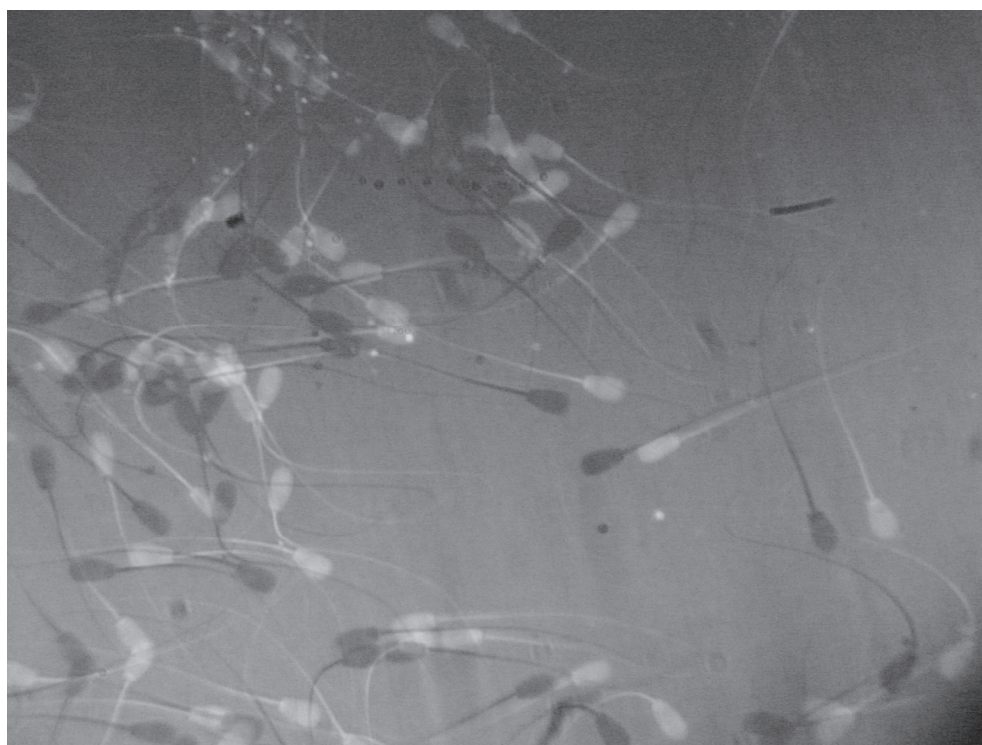


Рис. 2. Большое раздвоение изображений спермиев в пробе размороженной спермы быка в однородном сером интерференционном цвете

Значение изучения количественных показателей клеток спермы животных и человека методами интерференционной микроскопии для определения плодовитости и состояния репродуктивной системы животных было показано в предыдущих работах [2, 4]. Для определения плодовитости животных, в некоторых случаях,

достаточно, по-видимому, измерение количества сухого вещества в головках спермиев.

Сухая масса головок спермиев, измеренная методом интерференционного однородного поля с большим раздвоением [2], для 129 исследованных быков в среднем равнялась 8,67 пг с рассеянием (дисперсией) от 7,61 до 9,93 пг; для

26 хряков – 8,78 пг (7,1–9,3пг); для 12 баранов – 8,39 пг (7,4–8,9 пг); для 15 кобелей – 6,24 пг (5,3–7,2 пг); для 5 петухов – 2,59 пг (1,9–3,4пг); для 6 индюков – 3,7 пг (2,4–4,6 пг); для 87 мужчин – 7,26 пг (5,8–8,7 пг ) (табл. 1). Средние показатели количества ДНК и сухой массы

головок спермиев для каждого вида исследованных животных и мужчин, по нашему мнению, являются наиболее оптимальными величинами характеризующими высокую плодовитость самцов и оплодотворяющую способность спермы [5].

Таблица 1. Содержание сухого вещества в спермиях млекопитающих и птиц

Вид	Число пациентов	Сухая масса головок, пг	Рассеяние (дисперсия), пг	Коэффициент вариаций, $C_v$ , %
Человек	87	7,26	5,8-8,7	6,5
Быки	130	8,67	7,61-9,93	5,2
Хряки	26	8,78	7,1-9,3	6,0
Бараны	12	8,39	7,4-8,9	6,2
Кобели	15	6,24	5,3-7,2	9,8
Петухи	5	2,59	1,9-3,4	17,3
Индюки	6	3,7	2,4-4,6	12,2

Вариабельность сухой массы головок спермиев также может характеризовать качество спермы. Результаты экспериментов показали, что в исследованных эякулятах быков коэффициенты вариаций сухой массы головок спермиев были в пределах от 2,6 % до 18,3 % и характеризовали качество спермы, поскольку, чем больше дефектов структуры клеток, чем выше вариабельность количественных показателей, тем хуже сперма [6]. Аналогичные закономерности наблюдались и для спермы других животных и человека [7].

Коэффициент вариабельности сухой массы головок спермиев является интегральным показателем качества спермы и пропорционален частоте дефектов спермиев в эякуляте, поскольку различные дефекты увеличивают дисперсию размеров и сухой массы клеток. Для 101 исследованного быка найдено, что с увеличением коэффициента вариации сухой массы головок спермиев увеличивается брак спермы по активности и концентрации (рис. 3).

Коэффициент корреляции между вариабельностью сухой массы головок спермиев и процентом брака, по нашим данным, достаточно высокий и равен 0,742. Спермии из эякулятов высокого качества, как узкоспециализированные клетки, имеют невысокие коэффициенты вариаций сухой массы головок: от 2,6 до 6 %. Более высокая вариабельность, как правило, связана с большой частотой различных дефектов в строе-

нии спермиев, несоответствием режимов использования, содержания и кормления животных с физиологическими нормами, с аномальным сперматогенезом и другими причинами. Большая часть быков с высокой вариабельностью сухой массы спермиев была выбракована из-за низкого качества спермы.

Детальный анализ спермограмм показал, что с помощью ДИК и метода однородного интерференционного поля с большим раздвоением, под интерференционным микроскопом можно наблюдать неокрашенные мазки спермы или живые клетки и определять дефекты спермиев с оптическим разрешением порядка 0,3мкм. В интерференционном микроскопе различимы дефекты спермиев, классифицируемые по Э. Блему [8]: мажорные дефекты – дегенеративные, двойные формы, пуговичная акросома, подвижный отдельный хвост, диадема головки, грушеобразные головки, зауженное основание, аномальный контур, маленькие аномальные головки, отдельные патологические головки, штопорообразный митохондриальный чехлик, укороченная средняя часть, проксимальная капелька, псевдокапелька, Даг дефект; минорные – узкие головки, маленькие нормальные головки, гигантские и широкие короткие головки, отдельные нормальные головки, неосевое прикрепление, дистальная капелька, простой излом хвоста, кольцеобразный хвост.

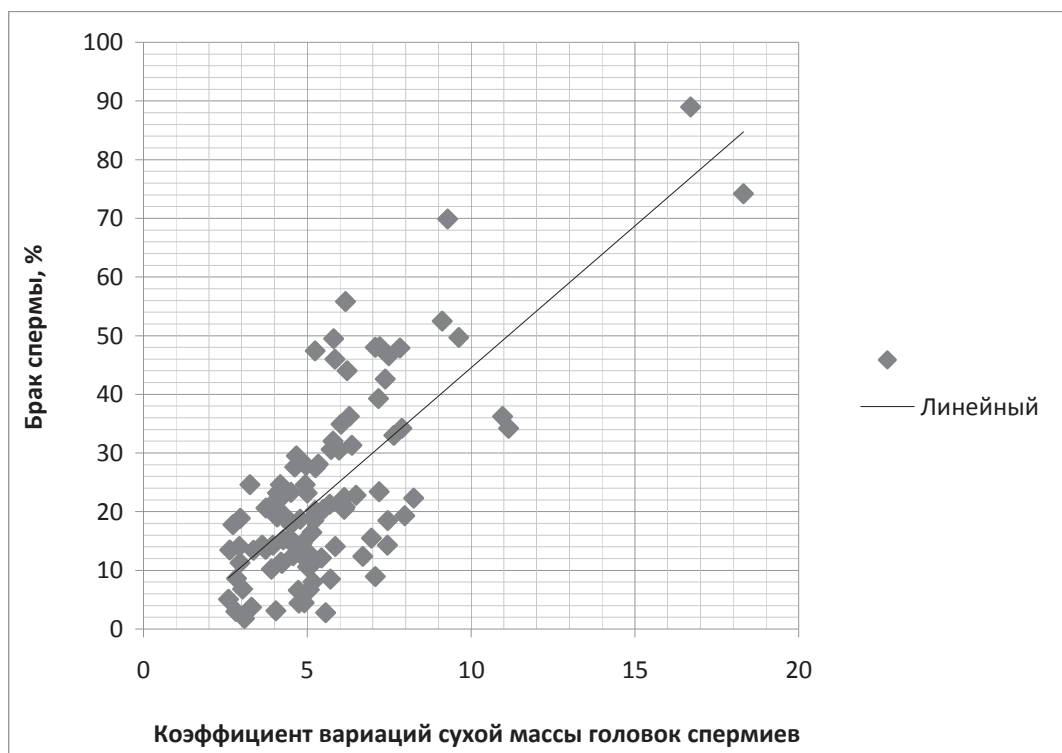


Рис. 3. Взаимосвязь брака спермы с вариациями сухой массы головок спермиев

В эякулятах могут присутствовать эпителиальные клетки, эритроциты, лейкоциты и другие. Кроме этого, в интерференционном контрасте дополнительно разрешаются дефекты: неравномерное распределение хроматинового материала в головках, мембран акросомы, шейки, средней части и другие.

При облучении проб спермы электромагнитными волнами, лазерными лучами разных длин волн, подвижность спермиев повышалась в

тех случаях, когда начальная активность спермы была пониженной по сравнению с нормой. Облучение спермы до замораживания не улучшало ни подвижности спермиев, ни их оплодотворяющей способности. Реабилитирующее действие лазерного и микроволнового излучений проявлялось при воздействии на размороженную сперму – эффект был более выражен для проб с низким качеством спермы [9]. Морфология спермиев после облучения не изменялась.

### Выводы

Количественный анализ спермограмм – учет частоты различных дефектов, распределения числа спермиев по фракциям подвижности, размеров, сухой массы, количества ДНК, отношения ДНК/белок в спермиях, наряду с традиционными показателями, позволяет с высокой достоверностью оценивать качество каждого эякулята и плодовитость самцов. Дифференци-

альный интерференционный контраст и метод однородного интерференционного поля с большим раздвоением позволяют, аналогично методам сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, с хорошим разрешением изучать ультраморфологию спермиев для оценки качества спермы.

### Литература

1. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. – К.: Аграрна наука, 1995. – 182 с.
2. Васильев В.С. Совершенствование методов интерференционной микроскопии для изучения спермы в зависимости от породы, возраста и плодовитости быков: Автореф. дисс. канд.биол.наук: 03.00.13 / НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР. – Харьков, 1978. – 24 с.
3. Bath A.D., Oke R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa // Iowa State University Press. – 1989. – 281 p.
4. Васильев В.С. Эффективность селекции подвижных спермиев из эякулята человека в зависимости от их морфометрических показателей до и после воздействия гипотермии и криоконсервации при разных состояниях сперматогенеза. / В.С. Васильев, Г.Г. Юрченко, М.Й. Крамар, Н.Н. Чуб, Л.И. Луцкая // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных: Сб. науч. Тр. 17 / ХНАУ; ХГЗВА. - Х., 2009.



– С. 131–139.

5. Васильев В.С. Спермограмма как показатель качества спермы // Підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин: Зб. наук. Праць / ХНАУ; ХЗВИ. – Х., 2001. – 126 с.
6. Васильев В.С., Раковский Я.П., Лисиченко Н.Л., Беликов А.А. Оценка количества «мусорной» ДНК в спермиях животных методами интерференционной микроскопии // Науковий вісник НУБП України. – К., 2011. – Вип. 160, Ч. 2. – С.281–285.
7. Васильев В.С., Хохлов А.М., Васильева О.В. Количество ДНК в спермиях быков и оплодотворяемость коров // Достижения і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук.пр. / НАН України. – К.: Логос, 2012. – С. 228–232.
8. Blom E. Sperm morphology with reference to bull infertility // First All-Indian Symp. Anim. Rehrod. Ludhiana?. – 1977. – P. 61–81.
9. Васильев В.С., Васильева Л.И., Лисиченко Н.Л., Крамар М.Й., Юрченко Г.Г. Интерференционная микроскопия облученной спермы // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных: Сб. науч. Тр. 15 / ХНАУ; ХГЗВА. – Х., 2005. – С. 157–160.

#### VASILEV V.

*Kharkov state zooveterinary academy*

*Ukraine, 62341, Kharkiv region, Dergachevsky district, v. Malaya Danylivka, Akademichna str., 5*

#### EVALUATION OF SPERM QUALITY INTERFERENCE MICROSCOPY TECHNIQUES

**Aims.** Objective evaluation of the quality of sperm is important in animal reproduction. **Methods.** Morphological and functional indices of animal and human spermatozoa with the help of microscopy interference have been studied. **Results.** Mean value of dry mass of head spermatozoa of bull's is 8,67 pg, of boars – 8,78 pg, of rams – 8,39 pg, of dogs – 6,24 pg, of cocks – 2,59 pg, of turkey-cocks – 3,7 pg, of men – 7,26 pg. The high variability of the size, dry mass of sperm, usually indicate an increased number of abnormal cell shape and low sperm quality. **Conclusion.** Interference microscopy techniques allow us to study ultramorphology sperm determine the amount of dry matter, DNA, and other indicators and reliable assessment of the quality of each ejaculate and the fertility of animals.

**Keywords:** spermatozoa, interference microscopy, fertility.

#### ВЕРЖУК В.Г.<sup>1</sup>, ПАВЛОВ А.В.<sup>1</sup>, ТИХОНОВА О.А.<sup>1</sup>, БОРЗЫХ Н.В.<sup>2</sup>, ДОРОХОВ Д.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44, e-mail: vverzhuk@mail.ru*

<sup>2</sup>*ГНУ ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина Россельхозакадемии, e-mail: cglm@rambler.ru*

#### ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ГЕНОПЛАЗМЫ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР ПОСЛЕ КРИОСОХРАНЕНИЯ В ПАРАХ ЖИДКОГО АЗОТА ПРИ –183–185°C

Наряду с классическими способами хранения генофонда плодовых культур путем посадки коллекционных образцов в саду, существует перспективный и сравнительно дешевый способ сохранения геноплазмы растений, это ее криоконсервация в жидком азоте или его парах при –183–185°C [1, 2, 3]. При таком способе консервации используют различные части растений – побеги (черенки), отделенные от побегов почки, пыльцу, меристемы и семена диких видов [4]. На примере различных образцов таких плодовых культур как черная смородина и яблоня нами проводились изучения их устойчивости и способности черенков выдерживать сверхнизкие температуры при длительном хранении в парах жидкого азота. Были также про-

ведены исследования по хранению почек черной смородины и черемухи, отделенных от древесины и обработанных перед замораживанием криопротекторами различной концентрации. Применяя криопротекторы с воздействием на растительную клетку и ее содержимое нами преследовалась цель получения живых растений из консервируемых почек в условиях *in vitro*. По работам других авторов известно, что криозащитные вещества не только уменьшают размеры кристаллов льда в растительных тканях и их количество, но и снижают токсические и другие вредные эффекты обезвоживания [5]. Кроме проверки жизнеспособности геноплазмы в виде черенков, почек и др. частей растений, проводилась оценка биохимического состава плодов яб-