

УКРАЇНЬСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

ІНСТИТУТ СВИНАРСТВА УААН

На правах рукопису

ІВАНИЦЕНКО Георгій Євгенович

ФІЗІОЛОГО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПРОДУКТИВНОЇ
ФУНКЦІЇ КИЧРІВ

03.00.13 - фізіологія людини та тварин

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Полтава, 1994



00801700 (G)

AB 29.347

Робота виконана у лабораторії фізіології та біохімії інституту свинарства Української академії аграрних наук та при кафедрі патологічної анатомії Полтавського державного медичного стоматологічного інституту.

Наукові керівники- доктор біологічних наук
КУРИЛО Ірїя Гаврилович;
доктор медичних наук професор
ГАСВК Анатолій Петрович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Мартиненко Ніна Антонівна;
кандидат біологічних наук
Шевцов Василь Петрович

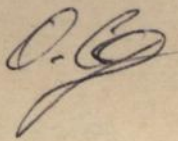
Провідна установа - Інститут тваринництва Української академії аграрних наук

Захист відбудеться "03" Березня 1994 р.
о 10 годині, на засіданні спеціалізованої Ради (шифр К.020.70.01)
при Інституті свинарства УААН

Адреса: 314006, м. Полтава, Шведська Могила.
З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту свинарства УААН

Автореферат розісланий "02" лютого 1994 р.

Учений секретар
спеціалізованої ради, кандидат
сільськогосподарських наук

 О.Г.Сердюк

1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

1.1. АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Одним з основних задач народного господарства України є розв'язання проблеми постачання населення продовольством. Це є неможливим без якісно нових підходів в селекції тварин і зокрема в свинарстві (Козловський В.Г., Рибалко В.П., Нетеса А.И., 1991; Нетеса А.И., 1991). Широке використання в ньому штучного осіменіння поставило перед науковці цілий ряд задач, що стосуються контролю якості, умов консервування і розбавлення сперми кнурів і розробку комплексних фізіолого-морфологічних методів оцінки її життєздатності.

Проведені рядом дослідників роботи дозволили встановити, що життєздатні спермії характеризуються рядом фізіологічних особливостей (Левин К.Л., 1986; Рузен-Ранге Э., 1980; Понд Ч.Дж., Хаупт К.А., 1983) та пов'язаних з ними люмінесцентно-мікроскопічних характеристик. Однак ці дані стосуються кінцевого етапу сперматогенезу – дефінітивної диференціації сперміїв, яка підлягає значним видовим, індивідуальним та віковим варіаціям.

Необхідною стадією спермотворення є фізіолого-біохімічне дозрівання сперміїв, а також адаптація до спермальної плазми і остаточне набуття сперміями запліднювчої здатності в статевих шляхах самки (капацитация) (Vamberg E., 1976). Сучасний науковий підхід неможливий без використання об'єктивних кількісних (фізіологічних та морфологічних) параметрів. Наявні в літературі дані (Swierstra E.E., 1968) торкаються лише окремих питань, головним чином на тканинно-клітинному рівні.

1.2. МЕТА І ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Головною метою даного дослідження була оцінка кнурів за якістю їх сперми, а також уточнення критеріїв групування кнурів за репродуктивною цінністю.

Відповідно до поставленої мети необхідно було розв'язати такі конкретні завдання:

- 1) Вивчення сперми кнурів шляхом люмінесцентної мікроскопії.
- 2) Вивчення функціонально-структурних параметрів сперми різних кнурів, в тому числі за показниками енергообміну і морфології зрілих сперміїв.
- 3) Дослідження функціонально-структурних особливостей утворення та дозрівання сперми у кнурів, вивчення динаміки фізіологоморфологічних параметрів клітинних елементів в ході сперматогенезу.

4) Розробка комплексних методів групування кнурів, за якості Ужньої сперми, з урахуванням їх індивідуально-групових характеристик на організменому, тканинному та клітинному рівнях.

1.3. НАУКОВА НОВИЗНА.

1) Обґрунтований новий підхід до відбору кнурів для їх племінного використання, зокрема на станціях штучного осіменіння, в основі якого лежить оцінка якості сперми за фізіолого-біофізичними властивостями сперміїв з наступним їх цитологічним дослідженням.

2) Уточнюється біологічна концепція сперматогенезу, в основі якого лежать процеси детермінації та диференціації. Детермінація є основним лімітуючим чинником розвитку (принцип генетичної неперервності). Диференціація пов'язана з вузькою спеціалізацією статевих клітин в повноцінні мікрогамети і характеризується значними груповими та індивідуальними коливаннями.

3) Вперше встановлені каріометричні та цитогенетичні особливості клітинних елементів сперматогенезу кнурів на етапах сперматогоніїв, сперматоцитів, сперматид, сперміїв та їх дозрівання.

4) За результатами комплексних електронно-мікроскопічних та гістологічних досліджень обґрунтоване виділення структурно-функціональної одиниці сперматогенезу - клона.

5) Диференціація сперміїв супроводжується змінами ряду фізіологічних параметрів, знання яких дозволяє судити про співвідношення окисно-відновних процесів та анаеробного гліколізу, що значною мірою обумовлює життєздатність сперміїв.

1.4. ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ.

1) Встановлена наявність трьох груп кнурів з різною якістю сперми та репродуктивною функцією, визначені лімінесцентно-мікроскопічні, біохімічні та морфологічні особливості тварин цих груп.

2) Показано, що розрідження по-різному впливає на сперму кнурів різних груп.

3) Розроблена математична модель комплексного фізіолого-морфологічного групування кнурів, яка дозволяє будь-яку нову тварину з достатнім ступенем вірогідності віднести до однієї з уточнених якісних груп (кластерів).

1.5. АПРОБАЦІЯ РОБОТИ:

- На Пленарному засіданні за темою "Фізіологія - розвиткові свинарства" Секції фізіології продуктивних тварин Об'єднаної нау-

кової ради Академії наук СРСР з комплексної проблеми "Фізіологія людини і тварин", 6-9 липня 1987 р., м.Полтава;

- На 3 Всесоюзному з міжнародною участю симпозиумі з імунології репродукції, 21-23 жовтня 1987 р., Київ;

- На засіданні Полтавського відділення Українського біохімічного товариства, 3 жовтня 1990 р.;

- На розширеному засіданні лабораторії фізіології та біохімії Інституту свинарства УАН та кафедри патологічної анатомії Полтавського медичного стоматологічного інституту, 5 січня 1993 р.

1.6. ПУБЛІКАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ.

Результати досліджень викладені в 7 наукових статтях та тезах.

1.7. ОБСЯГ І СТРУКТУРА РОБОТИ.

Дисертація викладена на 165 сторінках машинопису, складається з вступу, огляду літератури, результатів власних досліджень, обговорення, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури, містить 13 таблиць і 37 малюнків. Список літератури виключає 243 джерел, в тому числі 166 іноземних.

1.8. НА ЗАХИСТ ВИНОСЯТЬСЯ: фізіолого-морфологічні обґрунтування оцінки репродуктивних якостей кнурів; існування взаємозв'язку між утворенням, дозріванням та запліднювочою якістю сперміїв; математична модель комплексного фізіолого-морфологічного групування кнурів.

2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ.

Матеріалом для досліджень були 74 кнури великої білої, миргородської та полтавської м'ясної (ПМ-1) порід у віці 1,5-4 роки, що належали станції штучного осіменіння свиней Полтавського НДІС.

Сперму брали на штучну вагіну, після оцінки сперми за об'ємом, концентрацією сперміїв, кольором та запахом частину цільної сперми брали в пляшечки, решту розбавляли глікозо-хелато-цитратним розріджувачем, брали пробу розбавленої сперми в пляшечки і в спеціальному термос-ящику відправляли до лабораторії фізіології та біохімії для проведення аналізу. Між одержанням, оцінкою і розбавленням сперми до представлення її в лабораторію минало 45-60 хвилин. За цей час в цільній спермі спермії адаптувалися до спермальної плазми, а в розбавленій - до розріджувача та ступеня

розбавлення.

В лабораторії перевірку якості цільної та розбавленої сперми проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа МЛ-2 за методикою Курило В.Г., Новикової О.Н., Поливови Д.И. (1986), удосконаленою В.Г. Курило (1986).

Визначення активності лактатдегідрогенази проводили за методом В.Г. Курило, Л.И. Овчаренко (1983). Концентрація фруктози визначалась нами за методикою R. G. Kulka (1956).

Загальний білок визначали за методикою Лоурі (Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R., 1951). Білкові фракції спермальної плазми визначали шляхом електрофорезу.

Для взяття зразків тканин використовувались кнурі, що були списані на Полтавський м'ясокомбінат за різними обґрунтуваннями, в тому числі: зниження запліднючої здатності, важкі травми та ін.

Мікроскопічне вивчення матеріалу сім'яників кнурів та їхніх придатків проводилось на гістологічних препаратах. Цитологічний матеріал набирался у вигляді мазків-відбитків сім'яника, а також мазків зрілої нерозбавленої та розбавленої сперми, які забарвлювались за Паппенгеймом (Шиллер-Волкова Н.Н., Никитина Н.И., Агамова К.А., Брин М.Л., 1964).

Шматочки сім'яників кнурів, одержані після забов тварин на Полтавському м'ясокомбінаті, вивчались за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії на електронному мікроскопі ЕВМ-100Б, встановленому в Полтавському державному медичному стоматологічному інституті за прискорюючої напруги 75 кВ і в первинних збільшеннях на екрані мікроскопа 3000-30000 разів.

Морфометричне дослідження клітинних елементів проводилося на фотографіях або на малюнках, виконаних за допомогою малювального апарату РА-4 із загальним збільшенням $\times 2500$ за розробленою нами методикою (Гасик А.П., Іванищенко Е.Г., 1983) для морфометрії клітинних елементів легені, адаптованою для морфометрії тканин сім'яника (Курило В.Г., Гасик А.П., Іванищенко Г.Е., 1990). Вимірювались також загальні розміри сім'яників. На основі первинних показників нами обчислювались похідні морфометричні параметри: об'єм сім'яника, об'єм ядер, об'єм голівок, площа перерізу каналця, площа просвіту, відносна площа гермінативного шару, фактор форми ядер, округлість ядер, об'єм ахроматинової частини голівок.

Визначався також індекс сперматогенезу (Ухов В.И., Астраханцев А.Ф., 1983) за чотирибальною системою та сперматогоніальний індекс І2 (кількість сперматогоніїв на 10 мкм базальної мембрани каналця-

ця).

Застосовувались стандартні методи математичної статистики. Для характеристики зв'язків між параметрами використовували коефіцієнт парної лінійної кореляції Пірсона. За всіма параметрами обчислювались інформаційні показники їхніх частотних розподілів - гістограм (Розенберг Н.М., 1973; Kucias J., 1980). Для уточнення комплексного фізіолого-морфологічного групування кнурів до одержаних функціонально-структурних параметрів було застосовано факторний аналіз, а саме його різновид - метод аналізу головних компонент (Diday E. et coll., 1977).

Для складання математичної моделі групування кнурів нами була використана процедура багатфакторної лінійної регресії (Seber G.A.F.) в нашій модифікації (Гасик А.П., Іваниченко Г.Е., Маслов О.Б., 1990).

Всі обчислення були проведені за спеціально складеними нами програмами на ЕОМ СМ-1407 та ІВМ РС/АТ в обчислювальному центрі кафедри патологічної анатомії Полтавського державного медичного стоматологічного інституту.

Перевірка взаємозв'язку запліднювочої здатності сперміїв з фізіолого-морфологічними параметрами проводилась на свинюматках свиноферми колгоспу ім. Степового Ново-Санжарського району Полтавської області. Свіжорозбавлену сперму, проби якої досліджували в лабораторії, в спеціальних флаконах та термос-ящиках відправляли автотранспортом на пункт штучного осіменіння вищезгаданого господарства.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Характеристика кнурів за фізіолого-морфологічними параметрами сперми.

Якщо сперма використовується для штучного осіменіння свиней, то до дії генетичних та фізіологічних чинників додається і вплив, пов'язаний з її одержанням, розбавленням, зберіганням, транспортуванням і конкретним методом осіменіння.

За результатами лімінесцентно-мікроскопічної оцінки сперми кнури розподілились на три групи, за провідним параметром (концентрація життєздатних сперміїв) - в свіжоодержаній нерозбавленій спермі і після розбавлення її глікозо-хелато-цитратним середовищем

(Табл.1).

За концентрацією сперміїв в 1 мл і за об'ємом еякулятів істотних відмінностей між трьома групами кнурів не спостерігалось ($p > 0.05$). Очевидно, що розбавлення знижує частку життєздатних сперміїв у всіх трьох групах ($p \leq 0.05$), причому значніш за все - в першій, практично вирівнявши цей показник для перших двох груп ($p = 0.23$).

В результаті перевірки всіх кнурів на станції штучного осіменіння вони розподілились в такому співвідношенні: I група складає 37.5%, II група 47.2% и III група - 15.3%.

Ключовим ферментом гліколізу, який належить до інтрацеллярних ензимів, є лактатдегідрогеназа. Її активність (Табл.2) виявилась найнижчою в спермі кнурів I групи і найвищою - в спермі кнурів III групи.

Після розбавлення сперми глікозо-хелато-цитратним розріджувачем активність цього фермента в спермі кнурів I групи підвищилась на 23.14% ($p=0.02$), II групи - на 13.80%, а в III групі, навпаки, спостерігалось зниження активності лактатдегідрогенази на 16.61% ($p < 0.05$). Її каталітична активність в плазмі нерозбавленої і розбавленої сперми відповідає такій самій закономірності.

Концентрація фруктози (Табл.3.) в спермі кнурів II групи виявилась на 24,62% нижчою, а в III - в 3,19 рази меншою, ніж у кнурів I групи. В розбавленій спермі спостерігалась ідентична картина.

Взаємозв'язок активності лактатдегідрогенази та концентрації фруктози в спермі кнурів із запліднювчою здатністю сперміїв вивчалась також на матеріалі 340 свиноматок, яких осіменили спермою від кнурів різних груп. Сперма транспортувалась зі станції штучного осіменіння свиней. Спермою від 7 кнурів I групи осіменили 151 свиноматку, з яких 33 голови перегудали (78% запліднюваності).

Між активністю фермента і запліднювчою здатністю сперміїв встановлена наявність прямого кореляційного взаємозв'язку середнього ступеня вираженості ($r = +0.63$, $p \leq 0.05$; детермінація 39.4%).

В свою чергу, спермою кнурів II групи осіменили 173 свиноматки, з числа яких перегудало 65 голів (запліднюваність 62.4%). Коли сперму розбавили глікозо-хелато-цитратним середовищем, дія лактатдегідрогенази знизилась на 13.29%. Активність ферменту в спермі

Таблиця 1. Оцінка киурів за даними люмінесцентної мікроскопії їхньої сперми.

параметр	група I	група II	p I-II	група III	p I-III	p II-III
% життєздатних спермій в нерозбавленій спермі	83.7 +2.3	75.6 +0.8	0.001	65.3 +2.2	0.001	0.001
% життєздатних спермій в розбавленій спермі	71.3 +2.3	67.7 +1.8	0.23	56.5 +3.0	0.001	0.001
концентрація спермій млрд/мл	0.251 +0.018	0.218 +0.016	0.16	0.221 +0.018	0.23	0.92

Таблиця 2. Активність лактатдегідрогенази в спермі киурів різних груп.

параметр		I група	II група	III група
н р о з б а в л е н а	мкмоль/л	4.47-0.30	4.91-0.28	5.58-0.24
	мг/100мл	39.32-6.71	43.20-3.52	49.15-2.12
	мг/млрд-спермій	1.860-0.15	1.690-0.16	2.000-0.17
	мкг/мл спермій	14.88-1.08	13.52-2.72	16.00-1.40
р о з б а в л а н а	мкмоль/л	5.58-0.22	5.58-0.30	4.66-0.31
	мг/100мл	48.42-1.98	49.15-2.72	48.99-2.75
	мг/млрд-спермій	2.520-0.25	2.060-0.20	1.770-0.451
	мкг/мл спермій	30.16-1.63	16.48-2.23	14.16-2.66
п л а з н а	мкмоль/л нерозб.	4.21-0.28	2.45-0.37	5.27-0.25
	мкмоль/л розбавл.	3.89-0.56	2.02-0.31	4.81-0.31
	мг/100мл нерозб.	37.09-2.56	21.52-3.25	46.41-2.27
	мг/100мл розбавл.	34.24-4.98	17.62-2.78	42.32-2.76

Таблиця 3. Концентрація фруктози в спермі кнурів різних груп.

параметр		I група	II група	III група
н е р с п е р н а л		+	+	+
	моль/л	7.63-0.18	5.75-0.54	2.39-0.21
		+	+	+
	мг/100мл	137.35-14.14	103.54-9.89	43.08-3.83
р с п е р н а		+	+	+
	мг/кард.сперміїв	10.479-1.747	9.626-1.71	5.651-0.306
		+	+	+
	мг/мл сперміїв	76.28-7.45	77.00-7.69	45.20-4.50
р с п е р н а		+	+	+
	моль/л	8.88-0.67	7.58-0.44	6.57-0.67
		+	+	+
	мг/100мл	139.90-12.20	136.50-8.05	118.27-12.12
р с п е р н а		+	+	+
	мг/кард.сперміїв	10.43-2.04	11.54-2.96	5.36-0.86
		+	+	+
	мг/мл сперміїв	75.73-4.54	92.34-3.73	42.99-6.41

Табл.4. Динаміка концентрації загального білка у спермі кнура в період II зберігання (n = 8).

Збері- гання год.	Без розріджувача		З розчинником ГДЦ	
	кільк. живих спер- мій, %	г/100 мл	кільк. живих спер- мій, %	г/100 мл
		+		+
Свіжа	87	2.81±0.02	87	2.76±0.22
24	78	2.88±0.01	83	2.67±0.24
48	74	3.08±0.01	82	2.95±0.22
72	45	2.83±0.03	78	2.89±0.33
96	26	2.45±0.24	63	2.48±0.29

Табл.5. Динаміка концентрації загального білка і білкових фракцій у плазмі сперми кнурів (n = 7).

Назва матеріалу	Відношення до загального білка, %	Концентрація білкових фракцій, г%
Свіжі		
Загальний білок	100.00	2.81±0.02
Альбуміни	54.42	1.53
а-глобуліни	27.36	0.76
б-глобуліни	18.22	0.51
24 год. зберігання		
Загальний білок	100.00	2.88±0.01
Альбуміни	53.51	1.54
а-глобуліни	27.94	0.81
б-глобуліни	18.60	0.54
48 год. зберігання		
Загальний білок	100.00	3.08±0.01
Альбуміни	50.31	1.55
а-глобуліни	22.68	0.69
б-глобуліни	26.77	0.83
96 год. зберігання		
Загальний білок	100.00	2.45±0.24
Альбуміни	58.51	1.44
а-глобуліни	24.76	0.61
б-глобуліни	16.78	0.42

Таблиця 6. Логарифи об'єму голівок сперміїв кнурів різних груп (M±m) та інформаційна складність його частотних розподілів (C).

	I група	II група	III група
нерозбавл. сперма	+ 1.741-0.008	+ 1.698-0.006	+ 1.668-0.011
C(біт)	5.580	6.673	5.021
розбавлена сперма	+ 1.823-0.069	+ 1.788-0.006	+ 1.668-0.011
C(біт)	5.503	6.176	4.799

характеризується зворотним кореляційним взаємозв'язком низької вираженості ($r = -0.30$; детермінація 9.0%). Концентрація фруктози після розбавлення сперми підвищилась на 31.83%.

Білкові речовини сперми становлять до 60% сухої речовини плазми і безумовно відіграють важливу роль у життєдіяльності сперміїв. Особливе значення білкові речовини плазми мають для підтримання окислювального тиску в спермі.

У свіжоодрержаній спермі встановлено 2.82 ± 0.02 г% загального білка. При строковій зберіганні цільної сперми протягом 4 діб при температурі 16-18°C виявилось, що динаміка концентрації білка має фазний характер. Протягом перших двох діб його концентрація підвищувалась на 9.6% ($p < 0.01$), а за 3-4 добу знижувалась на 12.82% (Табл.4.). Зміна концентрації загального білка в спермі супроводжувалась відмиранням сперміїв з вірогідним корелятивним взаємозв'язком ($r = +0.82$, $p < 0.01$).

З метою детальнішого виявлення значення білків у спермальній плазмі ми досліджували їх за допомогою електрофорезу на агаровому гелі. Виявилось, що білки сперми кнурів діляться на три основні фракції, які мігрують у напрямі катода. Дві з них подібні до альфа- і бета-глобулінів і розташовані компактно у зоні гама-глобулінів сироватки крові, а третя фракція - до альбумінів.

Білкові фракції анодного напрямку міграції у наших дослідах в спермальній плазмі кнурів не проявлялися.

Дані, представлені в Табл.5, свідчать про те, що у процесі зберігання сперми протягом 4 діб при температурі 16-20°C концентрація загального білка протягом перших двох діб зберігання підвищувалась, а в кінці була меншою за вихідну на 19.29%. При цьому альбумінова фракція білка протягом перших двох діб зберігання зменшувалась, а протягом третьої і четвертої доби - збільшувалась і в кінці зберігання була вищою на 7.35%. Динаміка альфа- і бета-глобулінової фракції протягом першої доби зберігання була стабільною. На другу добу зберігання альфа-глобулінова фракція зменшилася, а бета- дещо збільшилася, і в кінці зберігання сперми альфа- і бета-глобулінові фракції були менші від вихідного об'єму.

Морфометричні вимірювання проведено всього біля 2000 сперміїв від 50 кнурів всіх трьох груп як в нерозбавленій, так і в розбавленій спермі.

З усіх морфометричних показників найінформативнішим виявився

об'єм голівки спермія (Табл.6, Мал.1). Найбільший логарифм об'єму ($\lg V$) характерний для сперміїв кнурів I групи, найменший - для III групи. $\lg V$ сперміїв кнурів II групи має проміжне значення. Всі відмінності між групами статистично вірогідні ($p \leq 0.001$) і зберігаються в розбавленій спермі, де об'єм голівок сперміїв кнурів I і II груп за абсолютним значенням збільшився приблизно на 26% порівняно з нерозбавленою спермою, головним чином за рахунок збільшення як абсолютних, так і відносних розмірів акросомного комплексу. В III групі $\lg V$ сперміїв після розбавлення практично не змінився.

Цікаво відзначити, що відносні розміри акросомного комплексу найменші в групі I (45% об'єму голівки), децю більші в II групі (48%) і найбільші в III групі (54%).

Кожна з трьох виділених груп має характерні значення параметрів, що визначалися, а отже може маркуватися ними. Найменш стійкою до розбавлення є сперма найцінніших щодо запліднюваності кнурів I групи. Розрідження глюкозо-хелато-цитратним розріджувачем приводить до збільшення розмірів голівки спермія (в I і II групах).

3.2. ФУНКЦІОНАЛЬНО-СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ У КНУРІВ.

Сперматогонії за світлооптичними і каріометричними ознаками поділяються на три типи, що відповідають загальноприйнятому поділові: тип А із світлим (А1) і темним (А2) варіантами і тип В (Табл.7).

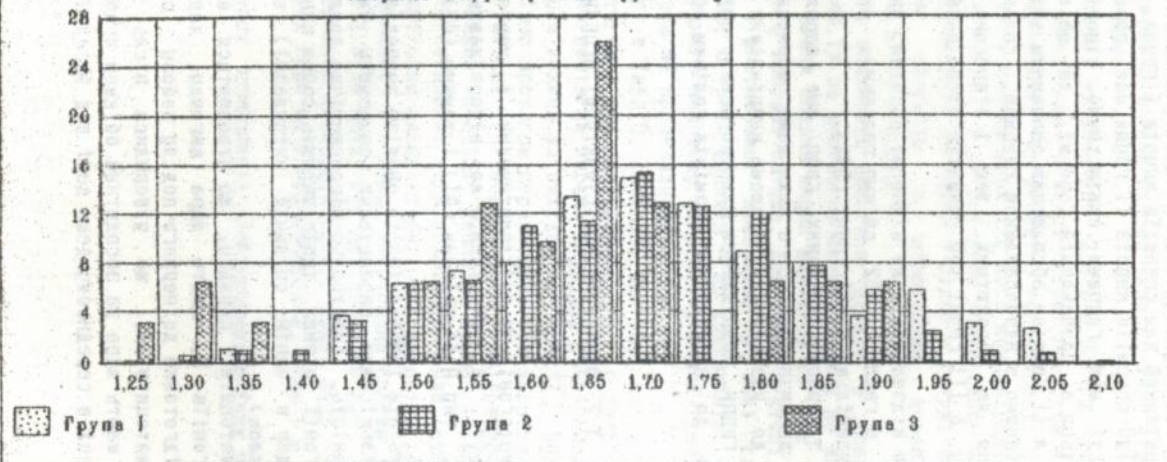
Результати інформаційного аналізу розподілів сперматогоніїв за всіма кількісними параметрами показують їхню досить велику детермінованість. Електронно-мікроскопічне дослідження виявило, що сперматогонії різних типів являють собою синцитій (скупчення багатьох ядер в одній спільній цитоплазмі) нащадків тієї самої клітин (клон).

Сперматоцити I порядку, що утворяться в результаті поділу сперматогоніїв В, мають ядра вигляду, характерного для різних стадій підготовки до першого поділу мейозу - редуційного.

Сперматоцити II, що утворилися після першого мейотичного поділу, мають ядра за абсолютним об'ємом приблизно вдвічі менші і розташовані в середньому децю далі від базальної мембрани.

Мал.1. Частотний розподіл

сперміїв кнурів різних груп за IgY голівки



Таблиця 7. Морфометричні показники клітинних елементів сперматогенного епітелію сім'яного каналу.

Назва клітини	Лог. площі пов. ядра	Лог. об'єму голівки	Лог. об'єму ядра	Фактор форми	Округлість	Відстань від б/м (мм)
Сперматогонію А1	1,828-0,003 ⁺	—	1,702-0,004 ⁺	1,337-0,009 ⁺	0,73-0,03 ⁺	6,83-0,89 ⁺
Сперматогонію А2	1,956-0,003 ⁺	—	1,900-0,004 ⁺	1,137-0,003 ⁺	0,79-0,02 ⁺	9,45-1,26 ⁺
Сперматогонію В	2,055-0,002 ⁺	⊙ —	2,050-0,002 ⁺	1,011-0,004 ⁺	0,85-0,03 ⁺	7,73-1,11 ⁺
Сперматоцити I	2,126-0,008 ⁺	—	2,151-0,012 ⁺	0,953-0,009 ⁺	0,77-0,01 ⁺	25,17-0,71 ⁺
Сперматоцити II	1,903-0,015 ⁺	—	1,812-0,023 ⁺	1,252-0,023 ⁺	0,73-0,01 ⁺	32,89-1,22 ⁺
Сперматиди	1,690-0,014 ⁺	—	1,469-0,021 ⁺	1,688-0,031 ⁺	0,60-0,02 ⁺	41,01-1,16 ⁺
Спермію (шні)	—	1,090-0,025 ⁺	—	2,449-0,054 ⁺	0,39-0,01 ⁺	41,66-0,90 ⁺
Спермію (придаток)	1,965-0,015 ⁺	1,646-0,011 ⁺	1,101-0,025 ⁺	2,093-0,029 ⁺	0,54-0,01 ⁺	—
Клітини Сертолї	2,124-0,051 ⁺	—	2,156-0,076 ⁺	0,942-0,054 ⁺	0,87-0,03 ⁺	11,20-2,87 ⁺

В результаті другого (екваційного) поділу мейозу з кожного сперматоцита II утворюються дві сперматиди. В їхніх ядрах відмічається великі агрегати гетерохроматину, кількість цитоплазми різко зменшена. Ядра сперматид знаходяться ще ближче до просвіту сім'яного каналця (відстань від базальної мембрани 41,01±1,16 мкм).

Сперматиди оточені цитоплазмов клітинк Сертолі, де вони, зазвичай складного метаморфозу, перетворюються на спермії (сперміогенез). Акросомна гранула, яка росте, диференціюється на дві частини: акросому (невеликий округлий утвір біля переднього полюсу ядра) і акросомний чохлик (мембраноподібна структура навколо акросоми і по поверхні ядра). Повністю сформований спермії втрачає контакт з клітиною Сертолі і надходить в просвіт каналця.

В придатку сім'яника проходить далі дозрівання і сортування поки що малорухливих сперміїв, більшість з яких ще характеризується наявністю "прапорця" цитоплазми біля основи хвоста.

Рухливі спермії з кінця придатка мають значно більший об'єм голівки, ніж вні, за практично того самого об'єму ядра. Таке значне збільшення об'єму голівки відбувається, таким чином, за рахунок збільшення акросомної частини. У більшості рухливих зрілих сперміїв прапорець цитоплазми біля основи хвоста відсутній.

Оскільки частка життєздатних сперміїв значно варіює від тварини до тварини, саме вона була основою для розробки комплексного фізіолого-морфологічного групування кнурів за їхніми репродуктивними якостями.

В міру наростання в обміні речовин спермія відхилень від норми жовто-червона люмінесценція посилюється, зокрема, через зміни властивостей поверхневих мембран, оскільки втрата ними здатності регулювати поверхневий електричний заряд веде до посилення адсорбції частинок барвника акридин-оранжевого.

3.3. КОМПЛЕКСНЕ ФУНКЦІОНАЛЬНО-СТРУКТУРНЕ ГРУПУВАННЯ КНУРІВ.

Групова та індивідуальна мінливість тварин за їх репродуктивних цінність є достатньо вираженою на різних функціонально-структурних рівнях, що приводить до необхідності уточнення і узагальнення наявного групування тварин і відшукування об'єктивних критеріїв оцінки кнурів за їхньою придатністю в племінній роботі.

3.3.1. Групування кнурів за фізіолого-морфологічними параметрами сім'яника та сім'яних каналців.

В цілому за використовуваними параметрами породи між собою відрізняються незначно між собою. Тому нами була проведена статистична обробка даних за трьома групами кнурів, виділеними за даними люмінесцентної мікроскопії (Табл.8).

Практично за всіма показниками I і III групи займають крайні положення, що підтверджується і гістологічною картиною. Відносно дрібніші сперматогонії кнурів I групи розташовуються густіше на базальній мембрані каналця. Чітко виділяються сперматогонії типу А-темні за характерною дрібногрудочковою структурою гетерохроматину. Представлені в значній кількості всі елементи сперматогенезу крім сперматоцитів II. Склад сперматогенного епітелію кнурів III групи однорідніший, сперматогонії менш поліморфні, в помітній кількості є клітинні елементи, що руйнуються, число яких сперміїв незначне. Матриця коефіцієнтів кореляції свідчить про слабо виражені і суперечливі зв'язки між параметрами.

Ми спробували, взявши групування за часткою життєздатних сперміїв за вихідний варіант, прийти до об'єктивнішого групування, застосувавши факторний аналіз, а саме, аналіз головних компонент.

Виявилось, що перша головна компонента зв'язана прямо пропорційним сильним кореляційним зв'язком з двома з вихідних параметрів, а саме - з індексом життєздатності сперміїв та розміром сім'яника ($lgUT$). Друга головна компонента зв'язана також прямо пропорційними сильними зв'язками з індексом сперматогенезу (I_1) і площею поперечного перерізу каналців (lgS). Третя ж головна компонента відбиває сперматогоніальний індекс (I_2) і, оскільки вона пояснює лише 19% (менше за $1/4$) розподілу, з подальшого розгляду виключена. Беручи до уваги факторну структуру розподілу, який спостерігається, ми вважали за можливе дати такі означення:

- перша головна компонента (ГК1) - функціональний індекс;
- друга головна компонента (ГК2) - структурний індекс.

Одержаний розподіл характеризується наявністю трьох чітких згущень. Потім, з використанням групування за даними люмінесцентної мікроскопії сперми як вихідного для кластерного аналізу були виділені три нові стійкі групи. Виділені нові групи (кластери) умовно позначені літерами А, В і С. Для кожного з них була проведена статистична обробка за вихідними сімома параметрами та двома головними компонентами (Табл.9).

Дані таблиці в цілому свідчать про виправданість віднесення

Таблиця 8. Фізіолого-морфологічні характеристики сім'яних клітин (групи, виділені за даними лімінесцентної мікроскопії).

Г р у п и	Індекс життєздатності сперміїв	Індекс сперматогенезу	Лог. площі перерізу канальця	Відносна площа гермінативного шару	Сперматогоніальний індекс	Лог. об'єму сім'яних
I	3.0 ± 0.0	3.84 ± 0.04	4.731 ± 0.032	0.737 ± 0.021	1.004 ± 0.040	2.662 ± 0.024
II	2.0 ± 0.0	3.79 ± 0.05	4.843 ± 0.026	0.738 ± 0.013	0.839 ± 0.062	2.619 ± 0.013
III	1.0 ± 0.0	3.73 ± 0.06	4.796 ± 0.016	0.735 ± 0.011	0.930 ± 0.040	2.577 ± 0.014
Різниця I-II (p)	0.42	0.42	0.01	0.03	0.03	0.11
Різниця III-I (p)	0.000	0.13	0.07	0.92	0.19	0.001
Різниця III II (p)	0.000	0.42	0.13	0.84	0.23	0.03

Таблиця 9. Фізіолого-морфологічні характеристики сім'яника кудрів різних кластерів (n - кількість кудрів у кластері).

Кластер	Індекс життєздатності сперміїв	Індекс сперматогенезу	Лог. площі періоду канальця	Відносна площа гермінативного шару	Сперматогоніальний індекс	Лог. об'єму сім'яника	ГК1	ГК2
A (n = 17)	$2,6-0,2$	$3,86-0,03$	$4,731-0,019$	$0,767-0,013$	$1,122-0,037$	$2,667-0,020$	$1,62-0,24$	$-0,03-0,16$
B (n = 21)	$1,6-0,1$	$3,84-0,03$	$4,680-0,010$	$0,745-0,011$	$0,784-0,011$	$2,594-0,015$	$-0,65-0,11$	$0,93-0,12$
C (n = 12)	$1,3-0,2$	$3,55-0,08$	$4,703-0,026$	$0,678-0,015$	$0,923-0,029$	$2,575-0,017$	$-0,82-0,18$	$-1,60-0,28$
Різниця I-II (p)	0.001	0.62	0.001	0.19	0.001	0.001	0.001	0.001
Різниця I-III (p)	0.001	0.001	0.37	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Різниця II-III (p)	0.19	0.001	0.001	0.001	0.001	0.42	0.92	0.001

кнурів кластера А до елітних, кластера С - до тих, що підлягають вибракуванню, а кластера В - до проміжних, а також про можливість ідентифікації кластерів за значеннями ГК.

Ми провели багатофакторну регресію ГК на нестандартизовані значення тільки тих параметрів, які пов'язані з ГК. В результаті ми прийшли до таких рівнянь:

$$ГК1 = 0.4635 * I0 * \lg U - 2.2110 \text{ (детермінація 63.5\%)}$$

$$ГК2 = 0.8362 * \lg S * I1 - 15.1620 \text{ (детермінація 76.9\%)}$$

Внаслідок підстановки в ці рівняння значень вказаних в них параметрів можна одержати значення ГК1 і ГК2 для даного кнура, що робить можливим його віднесення до одного з кластерів.

3.3.2. Групування кнурів за фізіолого-морфологічними параметрами зрілої сперми.

Спочатку нами була проведена статистична обробка за фізіологоморфологічними параметрами для трьох груп кнурів, виділених за даними люмінесцентної мікроскопії живої сперми (Табл.10).

Через незначні статистичні відмінності між групами, виділеними за даними люмінесцентної мікроскопії, ми знову використали процедури аналізу головних компонент та кластерного аналізу.

Виявилось, що перша головна компонента має сильний прямиий зв'язок з X нормосперміїв і сильний обернений - з X мікросперміїв, Z макросперміїв і Z аномалій форми. Базувчись на цьому факті, ми пропонуємо для ГК1, яка пояснює 35.7% розподілу вихідних параметрів, позначення "індекс нормальності сперміїв".

Друга головна компонента, що пояснює 25.3% розкиду даних, зв'язана сильними прямими зв'язками з індексом життєздатності сперміїв ($I0$) і з логарифмом об'єму голівки ($\lg U$) і, таким чином, є аналогом функціонального індекса, тобто ГК1, одержаної за морфофункціональними даними для каналців сім'яника (див. вище). Тому $Y1$ можна назвати функціональним індексом на клітинному рівні.

I , нарешті, третя головна компонента, яка має дисперсію в 14.7% загальної, зв'язана сильним кореляційним зв'язком тільки з акросомальним індексом, а отже, практично співпадає з ним. Тому все, сказане далі про акросомальний індекс, стосується і ГК3.

Тварини згрупувались у три чіткі кластери (А, В і С).

Табл.10. Фізіолого-морфологічні характеристики зрілих сперміїв кудрів (групи, виділені за даними ламінесцентної мікроскопії).

Група	Індекс життєздатності сперміїв	логарифм об'єму голівки	округлість голівки	спросомальний індекс	% нормосперміїв	% мікросперміїв	% макросперміїв	% сперміїв аномальної форми	% сперміїв з аномаліями хвоста
I	3.0 + -0.0	1.741 + -0.028	0.542 + -0.009	0.429 + -0.034	95.70 + -0.98	0.80 + -0.36	0.00 + -0.00	1.83 + -0.66	1.70 + -0.72
II	2.0 + -0.0	1.692 + -0.015	0.552 + -0.010	0.433 + -0.029	93.63 + -2.35	3.24 + -1.08	0.47 + -0.23	2.24 + -0.92	0.41 + -0.35
p (I-II)	0.00	0.10	0.49	0.92	0.44	0.04	0.05	0.69	0.13
III	1.0 + -0.0	1.659 + -0.026	0.553 + -0.024	0.489 + -0.017	97.77 + -0.63	0.00 + -0.00	0.00 + -0.00	1.80 + -0.66	0.43 + -0.43
p (III-I)	0.00	0.05	0.69	0.13	0.09	0.04	1.00	1.00	0.15
p (III-II)	0.00	0.29	1.00	0.11	0.11	0.01	0.84	0.69	1.00

Таб.11. Фізiолого-морфологiчні характеристики зрiлої сперми кiвчурiв рiзних кластерiв.

Кластер:	Індекс життєздатн.	логарифм об'єму голівки	округлість голівки	акросомальний Індекс	% нормоспермiїв	% мiкроспермiїв	% макроспермiїв	% спермiїв аномальної форми	% спермiїв з аномалiями хвоста	ГК1	ГК2
А	2.6	1.738	0.532	0.414	97.42	0.86	0.00	1.03	0.68	0.847	1.161
	+ -0.2	+ -0.029	+ -0.004	+ -0.029	+ -0.38	+ -0.31	+ -0.00	+ -0.38	+ -0.59	+ -0.149	+ -0.715
В	2.3	1.705	0.532	0.438	91.93	3.28	0.55	2.93	1.33	1.329	0.042
	+ -0.2	+ -0.013	+ -0.011	+ -0.036	+ -2.44	+ -1.30	+ -0.25	+ -1.04	+ -0.61	+ -0.929	+ -0.315
r(A-B):	0.44	0.33	0.05	0.62	0.04	0.08	0.04	0.09	0.44	0.04	0.18
С	1.3	1.652	0.559	0.486	97.13	0.68	0.00	1.88	0.33	0.935	1.515
	+ -0.3	+ -0.020	+ -0.018	+ -0.013	+ -0.78	+ -0.68	+ -0.00	+ -0.47	+ -0.33	+ -0.277	+ -0.481
r(C-A):	0.001	0.03	0.18	0.04	0.77	0.75	1.00	0.18	0.62	0.77	0.01
r(C-B):	0.006	0.05	0.92	0.21	0.06	0.09	0.62	0.38	0.15	0.04	0.02

імовірність існування яких підтверджена результатами кластерного аналізу (Табл.11)., причому як вихідним для процедури динамічних згущень ми користувалися групуванням за даними люмінесцентної мікроскопії.

Багатофакторна регресія ГК на нестандартизовані значення лише тих параметрів, які зв'язані з ГК зв'язками сильного ступеня вираженості, привела до таких рівнянь:

$$ГК1 = 0.131 * X_{норм.} - 0.214 * X_{мікро} - 0.923 * X_{макро} - 0.182 * X_{деформ} - 0.271 * X_{аном.хв.} - 11.267 \text{ (детермінація } 99.7\% \text{)}$$

(Примітка: для повноти відображення спектра аномалій до регресії було додано $X_{аном.хв.}$).

$$ГК2 = 0.9163 * I0 * IqU - 3.3467 \text{ (детермінація } 55.6\% \text{)}.$$

Відомо підстановки в дані рівняння відповідних вихідних параметрів можна одержати значення ГК1 та ГК2 для кожного кнуря, що робить можливим віднесення його до одного з кластерів. Таким чином, картина, одержана на живій спермі кнурів, істотно близька до одержаної на гістологічному матеріалі і значно доповнює її.

ВИСНОВКИ

1. За даними люмінесцентної мікроскопії кнуря підрозділяються на три групи: тварини I групи мають в нерозбавленій спермі 80-88% повноцінних сперміїв, після розрідження залишається 58-86%; тварини II групи, відповідно, в нерозбавленій 70-79%, після розрідження - 61-78%; III групи - 50-76 і після розрідження 34-68%.

2. Встановлено тісний взаємозв'язок між фізіологічними показниками сперми кнурів та її якості. Активність лактатдегідрогенази в I групі найнижча, а в III - найвища. Це вказує на підвищену проникність клітинних мембран і вихід фермента в плазму, що призводить до викривлення енергообміну та поганого виживання сперміїв. Концентрація фруктози також прямо пропорціонально пов'язана з якістю сперми: найвища в спермі кнурів I групи і найнижча в спермі кнурів III групи.

3. Виділені за даними люмінесцентної мікроскопії три групи кнурів підтверджуються характерними фізіолого-морфологічними параметрами. Сперма кнурів кожної групи має характерний лише для неї розмірний спектр голівок сперміїв. Тварини з цих груп мають різну репродуктивну цінність (найвища в I і найнижча в III групі) і їх сперма по-різному реагує на розрідження. В I та II групах розбавлення глікозо-хелато-цитратним середовищем призводить до збільшення голівки спермія через порушення нормального онкотичного тиску і проникнення рідини до акросомного комплексу, а також підвищення проникності клітинних мембран.

4.3 біологічної точки зору сперматогенез у кнурів являє собою результат складної взаємодії процесів детермінації та цитодиференціації на різних структурно-функціональних рівнях. Детермінація обумовлена принципом генетичної неперервності (яка забезпечується мітозами сперматогоніїв) та підтримання внутрішньовидової генетичної стабільності внаслідок мейозу сперматоцитів. Диференціація супроводжується утворенням вузькоспеціалізованих сперміїв (мікрогамет), що здатні до запліднення і підлягають під впливом зовнішніх та внутрішніх факторів видовій та індивідуальній мінливості.

5. Детермінація на тканинно-клітинному рівні проявляється на сперматогоніальній та сперматоцитарній стадії. За цитогенетичними і електронно-мікроскопічними показниками сперматогонії (A1, A2, B) складають єдиний клон клітин, що перебувають в різних фазах клітинного циклу і утворюють синцитій за допомогою міжклітинних контактів. Сперматоцити, розташовуючись на відростках клітин Сертолі, ізольовані від внутрішнього середовища організму гематотестискулярним бар'єром і за своїми характеристиками є відображенням мітозу та мейозу клітин сперматогенного епітелію та утворення (яке супроводжується кросинговерами між сестринськими хроматидами і редукцією числа хромосом) гаплоїдних хроматид з чоловічим та жіночим генотипом.

6. Цитодиференціація сперматид (сперміогенез) полягає в формуванні акросоми і рухового апарату (хвоста) сперміїв в епідидимісі і в вивідних шляхах. Установлено, що ультраструктура голівки сперміїв формується, проходячи ряд етапів, пов'язаних з гіперплазією апарату Гольджі, формуванням спочатку акросомальної гранули і потім ак-

росоми. Диференціація хвоста пов'язана з трансформацією центріолей в джгутик, спочатку оточений мітохондріями. Потім мембранні органи руйнуються лізосомами і формується гладенький ендоплазматичний ретикулум, навколо якого накопичується глікоген.

7. Цитодиференціація спермійів супроводжується змінами ряду фізіологічних параметрів (активність лактатдегідрогенази, концентрація фруктози, лімінесцентне забарвлення акридин-оранжем). Їх поєднання дозволяє судити про співвідношення окисно-відновних процесів, анаеробного гліколізу, про їх вплив на життєздатність спермійів.

8.3 Використанням математичного апарату факторного аналізу, а саме, аналізу головних компонент та багатофакторної регресії створена модель репродуктивної функції кнурів, яка значно міров уточнює їх групування з урахуванням даних, одержаних на різних функціонально-структурних рівнях. Для трьох уточнених груп (кластерів) одержані стандартні значення головних компонент, порівнявши з якими значення головних компонент, одержані з моделі, можна будь-яку нову тварину з достатнім ступенем вірогідності віднести до одного з кластерів: еліта, робочий, брак.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ:

1. Доцільно використовувати лімінесцентно-мікроскопічний метод оцінки кнурів за якості їх сперми. Для роботи на станціях штучного осіменіння можна рекомендувати кнурів, у спермі яких після розбавлення глікозо-хелато-цитратним розріджувачем залишається від 60 до 80% повноцінних спермійів.

2. За потреби більш точної і об'єктивної оцінки репродуктивної якості кнурів слід використовувати математичну модель. Для трьох уточнених груп (кластерів) одержані стандартні значення головних компонент, порівнявши з якими значення головних компонент, одержані з моделі, можна будь-яку нову тварину з достатнім ступенем вірогідності віднести до одного з кластерів: еліта, робочий, брак.

Основні положення дисертації викладено в таких роботах:

1) Курило В.Г., Іванищенко Г.Е. Взаимосвязь концентрации общего белка и белковых фракций в плазме спермы с качеством спермы хряка // Иммунология репродукции, тез. докл. 3 всесоюзного симпозиума с международным участием. - Киев, 1987. - С.49.

2) Курило В.Г., Овчаренко Л.І., Іванищенко Г.Е. Динаміка концентрації білка і білкових фракцій у свіжій та збережаній спермі кнуря // Вісник сільськогосподарської науки. - 1987. - № 3. - С.36-39.

3) Іванищенко Г.Е., Курило В.Г. Группировка хряков по морфофизиологическим показателям их репродуктивной ценности // Научно-технический прогресс, охрана окружающей среды, фундаментальные проблемы медицины и биологии, тез. докл. областной научно-практической конференции. - Полтава, 1988. - С.177-178.

4) Курило В.Г., Іванищенко Г.Е. Оценка хряков по физиолого-морфологическим параметрам спермы // Состояние и перспективы развития биотехнологии в животноводстве, тез. докл. республиканской научной конференции. - Харьков, 1988. - С.119-120.

5) Курило В.Г., Іванищенко Г.Е. Оценка качества спермы хряков // Свиноводство. - 1989. - № 5. - С.38.

6) Курило В.Г., Гасяк А.П., Іванищенко Г.Е. Использование морфометрического метода в изучении сперматогенного эпителия и спермиев хряков // Разведение, селекция и воспроизводство свиней. - Киев, 1990. - С.63-68.

7) Курило В.Г., Іванищенко Г.Е. Физиологические и биохимические аспекты искусственного осеменения и воспроизводства свиней // Повышение эффективности свиноводства. - Москва, Агропромиздат, 1991. - С.161.

Підписано до друку 24.01.93р. Формат 60x84 1/16. Папір друкарський.

Друк плоский. Умовн. друк. арк. 1. Замовлення №94. Тираж 101.

Безкоштовно. Дільниця оперативного друку статистичного управління

Полтавської області. м. Полтава, вул. Пушкіна, 103.

AB 29.347