

УДК591.463.11

*Е. Ю. Гуминская***ВЛИЯНИЕ ЭНДОКРИННОГО СТАТУСА
НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ПОЛОВЫХ ПУТЯХ КОРОВ И ТЕЛОК**

Приведены результаты влияния гормонального статуса на выживаемость сперматозоидов в половых путях коров и телок. Установлено, что для начала охоты характерно более высокое содержание кортизола ($111,8 \pm 17,7$ нмоль/мл), в конце охоты – $81,9 \pm 10,9$ нмоль/мл. Преждевременно размещенные в теле матки сперматозоиды оказывались в неадекватной их функциональному состоянию среде (содержание кортизола $92,5 \pm 25,5$ нмоль/мл, извлекли $14,0 \pm 3,0$ тыс. сперматозоидов), в которую они должны были поступить позднее, когда уже и сама среда обладала другими свойствами (содержание кортизола составило $80,4 \pm 1,3$ нмоль/мл, количество извлеченных сперматозоидов – $23,4 \pm 3,9$ тыс.). Осеменение в конце охоты с последующим извлечением через 18 и 24 часа способствовало сохранению сперматозоидами подвижности у 37,5% и 20,0% животных соответственно.

Введение

Традиционная процедура искусственного осеменения крупного рогатого скота подразумевает помещение спермы в шейку или тело матки коровы. Слизистая шейки матки после коитуса является важнейшим резервуаром сперматозоидов у жвачных, по крайней мере, в течение первых 24 ч. Следующий важный участок накопления сперматозоидов в течение 48 ч и более находится в складках нижнего перешейка или участка соединения матки с яйцеводами, где сперматозоиды могут быть защищены от фагоцитоза [1].

На уровне истмуса сперма задерживается и формирует резервуар. Резервуар ограничен концом истмуса, где достаточное количество спермы для оплодотворения удерживается в течение эструса, а часть спермы выделяется из резервуара во время овуляции [2].

Резервуар выполняет различные функции. Он может служить для того, чтобы уменьшить риск полиспермии [3], и в то же время гарантирует, что будет достаточно спермы в яйцеводе, когда произойдет овуляция, так как продукты овуляции могут стимулировать выделение сперматозоидов из слизистой нижних участков яйцеводов. Мало известно о механизме, который создает и регулирует резервуар спермы в яйцеводе. Прикрепление сперматозоидов к эпителию и задержание их в слизи может быть главным фактором, который регулирует механизм создания резервуара [4]. Были предположения, что место скопления сперматозоидов регулируется гормональным состоянием самки. Исследователями не установлено влияние гормонального состояния коровы или области яйцевода (истмус против ампулы) на прикрепление сперматозоидов к определенному участку [2].

Исследованиями по изучению распределения, выживаемости, капацитации сперматозоидов в половых путях самок, а также *in vitro* занимались многие ученые [5]–[8].

При слишком раннем осеменении сперматозоиды преждевременно стареют, что приводит к снижению оплодотворяющей способности спермы и увеличивает эмбриональную смертность. Также отмечается, что оплодотворяемость коров при осеменении спермой с небольшим количеством подвижных половых клеток зависит не только от объема и концентрации сперматозоидов во вводимой сперме, но и от глубины введения. При осеменении коров дозами 0,5 мл с содержанием 2–2,5 млн. подвижных сперматозоидов после оттаивания оплодотворяемость в группе коров, осемененных в заднюю часть шейки матки, составила 67,9%, а в переднюю часть – 63,1% [8].

Цель исследования – изучить влияние эндокринного статуса на выживаемость сперматозоидов в половых путях коров и телок.

Материал и методика исследования. Эксперименты по изучению числа накапливаемых в верхушках рогов матки сперматозоидов и выживаемости их после осеменения в различные периоды охоты проведены в СПК «Овсянка» Горьковского района. В этих экспериментах использовано 59 животных черно-пестрой породы (27 коров и 32 телки). Осеменяли их спермой, разбавленной ЛЖГ средой, с содержанием в одной дозе после оттаивания 15 млн. подвижных сперматозоидов. Осеменение проводили в начале охоты или в конце ее. При этом использовали

животных с естественной или индуцированной введением эстрофана на 10–11-й дни полового цикла охотой. Извлекали сперматозоиды из верхушки одного из рогов матки (ипсилатерального яичнику с созревающим фолликулом) спустя 18 и 24 ч после осеменения.

Процедуру извлечения сперматозоидов выполняли при помощи инструмента для извлечения зародышей. Во всех случаях для промывания матки использовали фосфатно-солевой буфер (среду Дюльбекко) в объеме 10 мл. После промывания измеряли объем полученной жидкости и определяли в ней путем подсчета в счетной камере концентрацию сперматозоидов в 1 мл. Затем делали перерасчет числа клеток на 10 мл среды. Общепринятым методом определяли под микроскопом наличие подвижных клеток.

Половую охоту выявляли путем регулярного наблюдения за животными. Учитывали характер их поведенческих реакций, изменения в состоянии половых органов, а в начале эксперимента – результаты осмотра преддверия влагалища и ректального исследования матки и яичников.

Принимали во внимание, что для начала охоты более характерно беспокойство животного, усиление двигательной активности, попытки контакта с другими животными, садка на них или позволение другим животным садки на себя (проявление рефлекса неподвижности). Из половой щели можно было заметить выделение прозрачной, с голубоватым оттенком, жидкой слизи, эластичность которой по мере нарастания признаков охоты возрастала. Нередко отмечалось наличие слизи на вульве, корне хвоста, седалищных буграх. Хорошо выражена отечность и гиперемия наружных половых органов.

По истечении 12–18 ч двигательная активность снижалась, животное успокаивалось, неохотно допускало на себя садку другого животного, уменьшалась частота прыжков на других животных. Из половой щели в момент исследования можно было видеть выделение густой, мутноватой слизи.

После определения состояния охоты животное осеменяли ректо-цервикальным способом. Сперму вводили в тело матки. Извлекали сперматозоиды из верхушки рога матки в различные сроки после осеменения.

В эксперименте, проведенном в СПК «Овсянка», использована сперма, разбавленная ЛЖГ средой так, чтобы в одной дозе находилось 37–38 млн. сперматозоидов, и после оттаивания (при активности 4 балла) было около 15 млн. подвижных клеток.

Результаты исследования и их обсуждение

Вся доза спермы вводилась в тело матки и, очевидно, распределялась в двух ее рогах. Если распределение было относительно равномерным, то в каждый рог должно было попасть около 19 млн. сперматозоидов. Извлечение проводилось только из верхушки того рога матки, на стороне которого в яичнике созрел фолликул. Данные, полученные при проведении экспериментов, обобщены и представлены в таблице 1. Из 60 процедур промывания матки коров и телок через 18 или 24 ч после осеменения только в 6 случаях не были обнаружены сперматозоиды в извлеченной жидкости – у трех коров и трех телок.

Таблица 1 – Накопление и выживаемость сперматозоидов в матке коров и телок

Животные и сроки осеменения в течение охоты	Число извлеченных сперматозоидов, тыс.	Выживаемость сперматозоидов, %
Извлечение сперматозоидов через 18 ч		
Коровы	24,0 ± 3,1	30,0
Тёлки	11,0 ± 3,0	0,0
Извлечение сперматозоидов через 24 ч		
Коровы	10,0 ± 4,0	14,2
Тёлки	12,0 ± 5,0	0,0
Извлечение сперматозоидов через 18 ч		
В начале охоты	14,0 ± 3,0	0,0
В конце охоты	23,4 ± 3,9	37,5
Извлечение сперматозоидов через 24 ч		
В начале охоты	30,2 ± 2,0	0,0
В конце охоты	19,0 ± 3,0	20,0

У коров минимальное количество извлеченных половых клеток через 18 ч составило 1,5 тыс. и максимальное – 50 тыс. (в среднем по группе $24,0 \pm 3,1$ тыс.), а через 24 ч – соответственно 50,0 и 35,0 тыс. ($10,0 \pm 4,0$ тыс.). У телок через 18 ч извлекали от 10,0 до 70,0 тыс. (в среднем $11,0 \pm 3,0$ тыс.), а через 24 ч – от 5,0 до 25,0 тыс. сперматозоидов ($12,0 \pm 5,0$ тыс.). Следовательно, как у коров, так и у телок количество сперматозоидов в верхушках рогов матки с течением времени уменьшалось. Вполне вероятно, что это уменьшение связано с продолжением процесса перераспределения сперматозоидов по мере приближения овуляции, после чего они иницируются вышедшей из фолликула яйцеклеткой и перемещаются к месту оплодотворения, т. е. в яйцевод.

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

После осеменения в конце охоты подвижные сперматозоиды обнаруживались через 24 ч у 20,0% животных, а через 18 ч – у 37,5% животных.

И хотя в пределах 15–18 ч, в течение которых животное находится в состоянии половой охоты, нет слишком резких изменений в содержании и соотношении половых и гонадотропных гормонов, за исключением пика ЛГ, но характерная последовательность изменений их происходит. Это подтверждается результатами изучения содержания эстрогенов и кортизола в сыворотке крови.

Для начала охоты характерно более высокое содержание кортизола. Особенно заметная разница в содержании кортизола у телок (таблицы 2 и 4). В группе животных, у которых извлечение проводилось через 24 ч, различие в содержании гормона было характерно и для коров. Однако вследствие больших индивидуальных колебаний различия по содержанию гормона в начале и конце охоты незначительные.

Таблица 2 – Содержание кортизола и эстрадиола в крови подопытных животных с учетом времени осеменения в течение охоты

Подопытные животные	Начало охоты		Конец охоты	
	Кортизол, нмоль/мл	Эстрадиол, нмоль/мл	Кортизол, нмоль/мл	Эстрадиол, нмоль/мл
В среднем (n = 88)	$111,8 \pm 17,7$	$0,15 \pm 0,04$	$81,9 \pm 10,9$	$0,20 \pm 0,04$
в т. ч. телки (n = 22)	$142,0 \pm 42,5$	$0,08 \pm 0,03$	$85,3 \pm 11,9$	$0,30 \pm 0,1$
коровы (n = 66)	$98,6 \pm 16,5$	$0,19 \pm 0,06$	$81,1 \pm 13,2$	$0,17 \pm 0,2$

Примечание – n – количество.

Очевидно, более высокий уровень кортизола в начале охоты связан с тем, что в это время ярко проявляется половое возбуждение. И наряду с пиком содержания эстрадиола в середине охоты секретируются и выделяются большие количества кортикостероидов. В конце охоты содержание эстрадиола остается у телок еще высоким, тогда как у коров к этому времени начинается снижение этого гормона. Но различия по содержанию эстрадиола также незначительны.

Когда данные содержания гормонов были проанализированы по двум группам с учетом срока извлечения сперматозоидов после осеменения (таблица 3), то оказалось, что уровень кортизола у животных, у которых извлечение проводилось через 24 ч, был более высоким, чем у животных, у которых процедура извлечения проводилась через 18 ч. Однако и в данном случае различия незначительны. И все же можно предположить, что повышенный уровень кортизола негативно влиял на состояние животных, что отразилось и на выживаемости сперматозоидов в матке.

Таблица 3 – Содержание кортизола и эстрадиола в крови подопытных животных в период извлечения сперматозоидов после осеменения

Подопытные животные	Через 18 ч		Через 24 ч	
	Кортизол, нмоль/мл	Эстрадиол, нмоль/мл	Кортизол, нмоль/мл	Эстрадиол, нмоль/мл
В среднем (n = 88)	83,4 ± 9,4	0,17 ± 0,02	112,3 ± 34,6	0,20 ± 0,04
в т. ч. тёлки (n = 22)	96,3 ± 19,6	0,13 ± 0,04	218,8 ± 0,0	0,19 ± 0,0
коровы (n = 66)	75,3 ± 8,4	0,18 ± 0,03	105,24 ± 36,2	0,21 ± 0,05

При анализе содержания гормонов с учетом времени осеменения в течение охоты и последующего извлечения сперматозоидов через 18 ч получены аналогичные данные (таблица 4). Уровень кортизола был более высоким, когда осеменяли животных в начале охоты (131,6 ± 16,7 нмоль/мл), в конце охоты он составил 94,9 ± 9,4 нмоль/мл. Различия близко к существенному. К моменту извлечения сперматозоидов содержание гормона снизилось и у коров, и у телок. Следует заметить, что у многих из них в матке сперматозоиды сохраняли подвижность.

Таблица 4 – Содержание кортизола и эстрадиола (нмоль/мл) в крови подопытных животных в период осеменения и извлечения сперматозоидов после осеменения

Период охоты	Подопытные животные	n	Во время осеменения		Во время извлечения	
			кортизол	эстрадиол	кортизол	эстрадиол
			$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$
При извлечении сперматозоидов через 18 ч						
Начало	Коровы	7	114,9 ± 28,1	0,16 ± 0,03	66,9 ± 12,1	0,13 ± 0,04
	Тёлки	6	148,4 ± 56,7	0,09 ± 0,04	118,1 ± 49,6	0,09 ± 0,04
	В среднем	13	131,6 ± 16,7	0,12 ± 0,34	92,5 ± 25,5	0,11 ± 0,01
Конец	Коровы	12	104,6 ± 20,1	0,18 ± 0,03	79,1 ± 11,6	0,19 ± 0,03
	Тёлки	5	85,3 ± 12,7	0,27 ± 0,19	81,6 ± 13,5	0,15 ± 0,08
	В среднем	17	94,9 ± 9,4	0,22 ± 0,05	80,4 ± 1,3	0,17 ± 0,02
При извлечении сперматозоидов через 24 ч						
Начало	Коровы	7	82,3 ± 19,7	0,22 ± 0,14	158,6 ± 76,5	0,19 ± 0,10
	Тёлки	1	115,7 ± 0,0	0,03 ± 0,00	218,8 ± 0,0	0,19 ± 0,00
	В среднем	8	98,9 ± 16,7	0,12 ± 0,90	188,7 ± 30,1	0,19 ± 0,01
Конец	Коровы	9	49,8 ± 10,6	0,18 ± 0,04	58,5 ± 14,5	0,22 ± 0,05
В среднем в опыте			100,1 11,8	0,16 0,03	111,7 22,1	0,17 0,02

У животных, у которых извлечение сперматозоидов проведено через 24 ч, содержание кортизола также было более высоким при осеменении в начале охоты. Но различие состоит в том, что в момент извлечения уровень гормона у них оказался гораздо выше.

Это характерно и для телок, и для коров (таблица 4). Более того, в данном случае увеличение гормона достоверно ($P < 0,05$). У животных, которых осеменели в конце охоты, уровень гормона изменился незначительно.

Анализ данных гормонального исследования указывает на влияние уровня кортизола на общее состояние животных и их внутренней среды. Это состояние, возможно близкое к стрессовому при высоком уровне гормона могло отразиться на свойствах секрета матки и выживаемости сперматозоидов.

Выводы

Для начала охоты характерно более высокое содержание кортизола ($111,8 \pm 17,7$ нмоль/мл), в конце охоты – $81,9 \pm 10,9$ нмоль/мл. Очевидно, более высокий уровень кортизола в начале охоты связан с тем, что в это время ярко проявляется половое возбуждение.

При осеменении в начале охоты и последующем извлечении через 18 часов содержание кортизола в крови подопытных животных составило $92,5 \pm 25,5$ нмоль/мл, при этом вымыли $14,0 \pm 3,0$ тыс. сперматозоидов. При извлечении через 24 часа содержание кортизола в крови резко увеличилось до $188,7 \pm 30,1$ нмоль/мл, количество вымытых сперматозоидов составило $30,2 \pm 2,0$ тыс. Ни в одном случае не были обнаружены подвижные сперматозоиды.

При осеменении в конце охоты и последующем извлечении через 18 часов содержание кортизола составило $80,4 \pm 1,3$ нмоль/мл, количество извлеченных сперматозоидов – $23,4 \pm 3,9$ тыс. При извлечении через 24 часа содержание кортизола в среднем уменьшилось до $58,5 \pm 14,5$ нмоль/мл, но и количество извлеченных сперматозоидов уменьшилось до $19,0 \pm 3,0$ тыс. После осеменения в конце охоты подвижные сперматозоиды обнаруживались через 24 ч у 20,0% животных, а через 18 ч – у 37,5% животных. Наиболее вероятно, что преждевременно размещенные в теле матки сперматозоиды оказывались в неадекватной их функциональному состоянию среде, в которую должны были поступить позднее, когда уже и сама среда могла обладать другими свойствами. И можно с уверенностью утверждать, что это связано прежде всего с изменением гормонального статуса животного.

Литература

1. Rowson, L. E. The movement of radioopaque material in the bovine uterine tract / L. E. Rowson // Brit. Vet. Sci. – 1995. – № 111. – P. 334–342.
2. Hunter, R. H. F. Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct / R. H. F. Hunter, I. Wilmut // Reprod Nutr. Dev. – 1984. – № 24. – P. 597–608.
3. Gerena, R. L. Electrophoretic characterization of proteins in oviductal fluid of cows during the estrus cycle / R. L. Gerena, G. J. Killian // Exp. Zool. – 1990. – № 256. – P. 113–120.
4. Rejean Lefebvre. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle / Lefebvre Rejean [et al.] // Boil. Reprod. – 1995. – Vol. 53. – № 5. – P. 1066–1074.
5. Бабушкина, И. А. Оплодотворяющая способность спермы быков in vitro : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 03.00.15 / И. А. Бабушкина ; ВНИИГРСХЖ. – Санкт-Петербург, 1995. – 18 с.
6. Песоцкий, В. В. К вопросу о месте введения спермы в половой тракт при осеменении суперовулировавших коров и телок / В. В. Песоцкий, В. В. Исаченко // Разведение и искусственное осеменение крупного рогатого скота. – 1988. – № 20. – С. 56–57.
7. Ромуло, В. Продвижение и переживаемость оттаянных спермиев в половых путях коров / В. Ромуло, И. В. Смирнов, Г. С. Шарапо // Животноводство. – 1978. – № 7. – С. 70–72.
8. Moller, K. Site of insemination and subsequent non-return rates in cows / K. Moller // N. Z. J. agr. Res. – 1972. – Vol. 2. – № 15. – P. 252–254.

Summary

The results of the influence of hormonal status on the survival of spermatozoa in the genital tract of cows and have been conducted. It was established that for the beginning of hunting characterized by higher levels of cortisol $111,8 \pm 17,7$ nmol/ml at the end of hunting $81,9 \pm 10,9$ nmol/ml. Spermatozoa placed in uterus beforehand, appeared in milieu, inadequate to their functional condition (cortisol content $92,5 \pm 25,5$ nmol/ml, extracted $14,0 \pm 3,0$ thousand of spermatozoa), where they should go later when the milieu itself possessed another qualities (content of cortisol made $80,4 \pm 1,3$ nmol/ml, quantity of extracted spermatozoa – $23,4 \pm 3,9$ thousand).

Поступила в редакцию 27.06.11.