

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE TEST DATA AFTER 'OVOKORT'
PREPARATION ADMINISTRATION BY RESTORATION OF REPRODUCTIVE
CAPACITY OF THE COWS WITH HYPO-SECRETION OF THE OVARY

O.V.Shtapenko, the Institute of animal biology UAAS

This article highlights the experimental research results on 'Ovokort' preparation administration impact on estrus stimulation & fertilization of the cows with hypo-secretion of the ovary. 'Ovokort' preparation belongs to the hormonal & vitamin group with prolonged action. Ovary reaction was investigated by the various animal treatment techniques. 'Ovokort' preparation proved to be efficient by injection in the tail fold. This method procures hormonal & vitamin ingredients economy, 2-fold abates the preparation cost compared with muscle injection, stimulate sexual behavior & increases non-return rate of the cows.

Key words: hypo-secretion, ovaries, cows, hormones, reproductive capacity

УДК 636.4:578.083

**ЕПІДИДИМАЛЬНІ СПЕРМАТОЗОЇДИ КНУРІВ ТА
ЕФЕКТИВНІСТЬ ЕМБРІОГЕНЕЗУ СВИНЕЙ *IN VITRO***

О.В. Щербак*

Інститут розведення і генетики УААН

*Представлені результати досліджень зі встановлення впливу на запліднювальну здатність *in vitro* присутності цитоплазматичної краплини в епідидимальних сперматозоїдах кнурів. Наявність дистальної краплини не впливає на їх запліднювальну здатність і забезпечує стабільне одержання *in vitro* ембріонів свиней на доімплантаційних стадіях розвитку.*

Ключові слова: свині, епідидимальні сперматозоїди, цитоплазматична краплина, кріоконсервування сперми, запліднення *in vitro*, ембріональний розвиток.

Встановлено, що кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів ссавців (із придатка сім'яника) відкриває нові перспективи збереження і раціонального використання генетичних ресурсів тварин [1]. Перші спроби використання епідидимальних сперматозоїдів ссавців для одержання потомства були проведені видатним вченим біологом, засновником зоотехнічного методу штучного осіменіння І.І. Івановим ще в 1910 році.

Із розвитком вітчизняних методик з одержання доімплантаційних ембріонів великої рогатої худоби (Кузнецова І.Б. і ін., 1998; Ковтун С.І. і ін., 1999) та свиней (Ковтун С.І., 2004) встановлені переваги застосування епідидимальних сперматозоїдів для осіменіння яйцеклітин поза організмом і їх ефективне кріоконсервування [3–5]. Виявлене результативне використання кріоконсервованих гамет кнурів та бугаїв після штучного осіменіння самиць [1]. На основі гібридизації різних видів тварин із використанням епідидимальних сперматозоїдів було отримане потомство Л.К. Ернстом та ін. (1986), І.Н.

* Науковий керівник – канд. біол. н. С.І. Ковтун

Шайдуліним (1988), А.І. Абіловим та ін. (1994), В.А. Багіровим (2005). Наразі вдаль кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів здійснено у сніжного барана і зубра [8].

Встановлено, що сперматозоїди сільськогосподарських тварин набувають запліднювальної здатності в середній частині епідидимісу і досягають оптимального її рівня у хвостовій частині придатка [7, 9]. У процесі просування сперматозоїди зазнають морфологічних та фізіологічних змін акросоми, втрачаються цитоплазматичні краплини, які розміщені на хвостиках гамет і є залишками сперматидної цитоплазми [2]. Дослідженнями встановлено, що краплини секрету, які у великій кількості виділяються внутрішнім епітелієм головки епідидиміса, легко прилипають до шийки сперматозоїдів, утворюючи проксимальну краплину [6]. Під час просування сперматозоїда по каналу придатка краплина зникає, розтягуючись по поверхні сполучної частини сперматозоїда. Потім вона збирається біля центросомного кільця з утворенням дистальної краплини. Встановлено, що пересуванню краплини із проксимальної до дистальної частини сперматозоїда сприяє секреторна рідина, яка міститься в просвіті хвостової частини придатка сім'яника.

Наявність цитоплазматичної краплини в еякульованих сперматозоїдах сільськогосподарських тварин вважають аномалією, а наявність проксимальних цитоплазматичних краплин вказує на прискорене пересування сперматозоїдів через епідидиміс [6]. Наявність проксимальної цитоплазматичної краплини в еякульованих гаметах бугаїв пов'язана з дефектами головки та середньої частини сперматозоїдів, проте ці краплини не впливають на підвищення безплідності самців. У деяких дорослих бугаїв понад 50 % еякульованих сперматозоїдів можуть містити проксимальні цитоплазматичні краплини. Відомо, що наявність більше 80 % сперматозоїдів зі проксимальними цитоплазматичними краплинами в еякуляті бугая не впливало суттєво на зниження рівня тільності [7]. Наявність дистальних цитоплазматичних краплин в еякульованих гаметах собак не знижує ефективності комерційного використання самців (Аллен В.Є., 2002).

При виконанні досліджень з вивчення ефективності кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів кнурів нами виявлено, що майже всі гамети містять цитоплазматичні краплини (рис.). Тому метою досліджень було встановити вплив на запліднювальну здатність *in vitro* присутності цитоплазматичної краплини в епідидимальних сперматозоїдах кнурів.

Матеріали та методи досліджень. Сім'яники кнурів отримували від кастрованих тварин приватного сектора. У дослідженнях використані гамети від 2 кнурів великої білої породи. В лабораторних умовах здійснювали відділення хвостової частини епідидимісів. Епідидимальні сперматозоїди отримували шляхом розрізань звитих каналців і відбирали суспензію, що виділялась. Використовували для заморожування у формі відкритих гранул розріджувач „Біоконсан” із додаванням 10 % жовтка курячого яйця та 10 % гліцерину.

Незрілі ооцит-кумулясні комплекси свиней отримували з яєчників тварин і культивували поза організмом 46 годин. Видалення розріджувача та відбір рухливих епідидимальних сперматозоїдів кнура проводили в модифікованому середовищі TALP без іонів Ca^{2+} . Епідидимальні сперматозоїди спільно інкубували поза організмом з яйцеклітинами в середовищі TALP-IVF із додаванням суміші PHE (пеніциламін, гіпотаурин та епінефрин) і розчину гепарину. Зиготи культивували *in vitro* у середовищі NCSU-23 протягом 5 – 6 днів.

Результати досліджень. Для виконання досліджень ми підібрали двох кнурів із подібними фізіологічними показниками епідидимальних сперматозоїдів

до заморожування (6 балів і 5 балів, відповідно) та після розморожування (3 бали). Встановлено, що запліднювальна здатність гамет обох кнурів *in vitro* є високою, яка забезпечила формування 58,5 % зигот (табл.). Не виявлено вірогідної різниці за рівнем дроблення ембріонів свиней поза організмом та їх розвитком *in vitro* до доімплантаційних стадій при аналізі ефективності використання епідидимальних сперматозоїдів двох кнурів.

Ефективність одержання ембріонів свиней *in vitro*

Епідидимальні сперматозоїди кнурів, №	Кількість осіменених яйцеклітин, п	Кількість (%)		
		зигот	2-4-клітинних зародків	ранніх морул – бластоцист
1	152	93 ^a (61,2)	64 ^b (42,1)	32 ^c (21,1)
2	48	24 ^a (50,0)	20 ^b (41,7)	6 ^c (12,5)



Рис. Зажиттєве фото епідидимальних сперматозоїдів кнурів. Усі гамети містять цитоплазматичні краплі.

Слід зазначити, що хоча майже всі епідидимальні сперматозоїди кнурів містять цитоплазматичну краплину, рівень *in vitro* розвитку зародків є вірогідно вищий ($P < 0,01$), порівняно (17,3%) з використанням в деяких дослідженнях еякульованих сперматозоїдів кнурів (Гузеватий О.Є., Гончарук О.П., 2000). Аналізуючи дослідження С. Лонга і ін. [10] з одержання ембріонів свиней поза організмом, коли вивчалась ефективність запліднення *in vitro* яйцеклітин із використанням еякульованих сперматозоїдів 6 кнурів, рівень ембріонального розвитку (42,3 %; 59,9 %; 42,0 %; 43,7 %; 35,1 %; 29,7 %, відповідно) був подібний до результатів наших експериментів.

Висновок. Отже, наявність цитоплазматичної краплини у епідидимальних сперматозоїдах кнурів не впливає на ефективність отримання ембріонів свиней поза організмом. Такі сперматозоїди можна використовувати для удосконалення сучасних біотехнологічних розробок, збереження генофонду видатних особин та отримання потомства.

Бібліографічний список

1. Буркат В.П. Розведення тварин і збереження їхнього генофонду // Вісник аграрної науки. – 2006. – № 3 – 4. – С. 100 – 105.
2. Данилова Л.В., Габер Е.С. Транспорт и созревание сперматозоидов в половых путях самца и самки. Эпидидимальные сперматозоиды // Сперматогенез и его регуляция - Москва: Наука. – 1983. – С.66 – 73.

3. Ковтун С.І. Одержання зародків свиней *in vitro*: стан та перспективи використання //Вісник аграрної науки. – 2004. – № 5. – С. 52 – 54.
4. Ковтун С.І., Мелешко Н.Я., Щербак О.В. Методика отримання, короткотривалого зберігання і кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів бугаїв та кнурів //Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві – К., 2005. – С. 200 – 204.
5. Кузнецова И.Б., Кузнецов В.Е., Ковтун С.И., Мелешко Н.Я. Получение зародышей крупного рогатого скота методом оплодотворения *in vitro* //Вісник аграрної науки. – 1999. – № 10. – С. 52– 55.
6. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. - Москва: Сельхозиздат, 1962. – 696 с.
7. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. - Кишинев: Штиинца, 1991. – 197 с.
8. Эрнст Л.К., Багиров В.А., Насибов Ш.Н. Криоконсервации семени и его роль в сохранении биоразнообразия животных //Материалы междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных». – Дубровицы – Быково, 2007. – С. 35 – 40.
9. Holtz W., Swidt D. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig //J. Reprod. Fertyl., 1976. -Vol. 46. -P. 227-229.
10. Long C.R., Dobrinsky J.R., Johnson L.A. *In vitro* production of pig embryos: comparison of culture media and boars //Theriogenology. – 1999. – 51. – P.1375-1390.

ЭПИДИДИМАЛЬНЫЕ СПЕРМАТОЗОИДЫ ХРЯКОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭМБРИОГЕНЕЗА СВИНЕЙ *IN VITRO*

О.В. Щербак, Институт разведения и генетик животных УААН

Представленные результаты исследований по установлению влияния на оплодотворяющую способность in vitro присутствия цитоплазматической капли в эпидидимальных сперматозоидах хряков. Наличие дистальной капли не влияет на их оплодотворяющую способность и обеспечивает стабильное получение in vitro эмбрионов свиней на доимплантационных стадиях развития.

Ключевые слова: свиньи, эпидидимальные сперматозоиды, цитоплазматическая капля, кріоконсервирование спермы, оплодотворение in vitro, эмбриональное развитие.

EPIDIDYMAL BOAR SPERM & IN VITRO PIG EMBRYO-GENESIS EFFICIENCY

O. Shcherbak , the Institute of breeding & genetics, UAAS

This article highlights the experimental research results on cytoplasm drop impact on fertilizing capacity in vitro. Cytoplasm drop is located in the epidemic boar sperm. Distal drop affects neutrally fertilizing capacity & procures stable in vitro pig embryo collection during developmental stages prior transplantation.

Key words: pigs, epidemic sperm, cytoplasm drop, freezing preservation of semen, in vitro fertilization, embryo development.