

сервис». Поданы также основные методологические принципы практического обучения специалистов искусственного осеменения свиней с применением приоритетных традиционных достижений ученых Института свиноводства и АПП НААН и инновационных методик репродуктивной биотехнологии животных.

*Ключевые слова:* курсы-тренинги, модель, модульный принцип, учебный процесс, инновационные методики, научное сопровождение.

**S.A.Sidashova, L.G.Peretiatko, A.F.Saglo.** Traditional and innovation methods for specialists with the reproduction of pigs.

*In the article it has been considered the organization model of courses for training and retraining of specialists with reproduction of pigs which was worked out and tested by biotechnology specialists from the Embryo transplantation laboratory "Poltava plemservis" in the conditions of pig breeding enterprises with different form of the property. It is given also main methodological principles of practical training of specialists of the artificial insemination of pigs with using of prioritet traditional achievements of scientists of Institute of Pig Breeding and AIP of NAAS and innovation methods of reproductive biotechnology of animals.*

*Key words:* courses-trainings, model, module principle, study process, innovation methods, reproductive biotechnology, scientific accompaniment

УДК 636.4.612

**Лобченко С. Ф.**, молодший науковий співробітник  
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

## **ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ЕСТРАЛЬНОГО СЛИЗУ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРА ДО ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO***

*Рецензент – кандидат біологічних наук О.Ф. Сагло*

*Досліджували можливість використання естрального слизу корови, зібраного під час штучного осіменіння, для підготовки сперми кнура до запліднення поза організмом. З'ясовано, що при безпосередньому контакті сперми та естрального слизу сперматозоїди не проникають у слиз, залишаючись у спермальній плазмі. Так само не відбувається проникнення сперматозоїдів у слиз після відмивання їх від плазми чи після модифікування слизу шляхом заморожування-розморожування. Такий результат спостерігається як при кімнатній температурі, так і за 38 °С. Зроблено висновок, що естральний слиз корів, відібраний під час охоти є не проникним для сперматозоїдів кнура й не може бути використаний для їх підготовки до запліднення поза організмом.*

*Ключові слова:* запліднення, естральний слиз, капацитація, кнур, поза організмом, сперматозоїд

**Постановка проблеми.** Одним із перспективних напрямків розвитку штучного осіменіння на сучасному етапі є запліднення яйцеклітин поза організмом, що в перспективі може забезпечити величезну економію сперми, а також спричинити масштабну зміну в технології відтворення свиней. Однак, така процедура вимагає особливого способу підготовки зразків сперми, який би забезпечував запліднюючу здатність сперматозоїдів (капацитацію). З цією метою було розроблено та випробувано значну кіль-

кість методик, де використовувалися різні прийоми та засоби, а також спеціальні компоненти середовищ для інкубації сперматозоїдів. Особливу увагу звертали на чинники природного походження, що *in situ* безпосередньо контактують із сперматозоїдами та, ймовірно, можуть спричинювати в них відповідні фізіологічні зміни, зокрема капацитацію. Одним із них є цервікальний слиз, що виробляється у шийці матки ссавців та відіграє значну роль у процесі запліднення [8].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** За хімічним складом цервікальний слиз на 90 % складається із води, причому це залежить від фази естрального циклу, має пористу структуру, а в'язкість залежить від рівня гормонів. На момент овуляції розмір пор збільшується, а в'язкість зменшується. Окрім того, у складі цервікального слизу виявлено електроліти (іони Кальцію, Натрію, Калію), мікроелементи (Цинк, Залізо, Мідь, Магній, Селен та ін.). Із органічних сполук наявна глюкоза, глікопротеїди, амінокислоти, різноманітні ензими, гліцерин та ін. [12]. Спосіб капацитації сперматозоїдів за допомогою цервікального слизу розроблявся як альтернатива відмиванню шляхом центрифугування у штучних середовищах [3, 6, 9]. Ідея полягала в тому, щоб сперматозоїди самостійно переміщувалися зі спермального зразка в цервікальний слиз, звільняючись від факторів, що блокують запліднюючу здатність [5, 7, 11]. Капацитованість таких сперматозоїдів у подальшому тестувалася шляхом дослідження їх здатності пенетрувати блискучу чи позбавлену її яйцеклітини і яйцеклітин [2, 10].

Дослідження з цервікальним слизом також показали, що він впливає на рухливість сперматозоїдів людини поза організмом: збільшує відсоток таких, що рухаються прямолінійно-поступально та зменшує відсоток спермів із гіперактивним рухом [1].

**Мета досліджень і методика їх проведення.** Метою цього дослідження було визначення можливості застосування естрального слизу корови (оскільки кількість слизу у цих тварин досить значна і його збирання не становить особливих труднощів у порівнянні зі свинею) в підготовці сперми кнура до запліднення поза організмом.

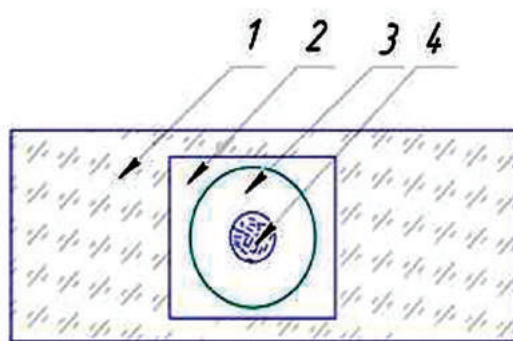
Естральний слиз корів відбирали в період підготовки їх до штучного осіменіння. Окремі порції незабрудненого естрального слизу поміщали у бакпечатки та доставляли у лабораторію для експериментів. Всього було відібрано шість зразків від трьох корів. По одному зразку естрального слизу від кожної корови заморожували в рідкому азоті, де вони зберігалися до початку дослідження. Процедура заморожування-розморожування естрального слизу корови мала на меті руйнування первинної нативної структури для зменшення його в'язкості [4].

Досліджували здатність сперматозоїдів кнура зі зразків цільного еякуляту та відмитих шляхом центрифугування проникати в естральний слиз корови. З цією метою використовували дві експериментальні системи: предметні скельця з лункою та відрізки скляних трубок. Коли дослідження проводили з використанням предметного скельця, в його лунку поміщали зразок нативного естрального слизу (або такого, що зберігався у рідкому азоті та був розморожений перед використанням), в центр якої вводили краплину цільної чи відповідно обробленої (відмитої) сперми. Зверху лунка закривалася покривним скельцем, змащеним по краях вазеліновою олією.

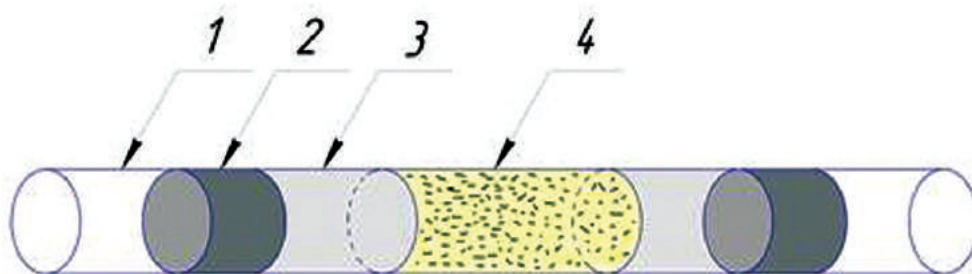
У випадку використання відрізка скляної трубки, зразок сперми (об'ємом близько одного мл) вводили шприцом у середню частину просвіту трубки. З кожного боку від цієї крапліни додавали такий же об'єм естрального слизу, а потім невелику кількість вазелінової олії для уникнення випаровування вологи. Заповнені зразками трубки поміщали в чашки Петрі з кришкою. Підготовлені до експерименту зразки в предметних скельцях із лункою та у відрізках трубок ставили на інкубування у термостат, де підтримувалася температура на рівні 38 °С. Через кожну годину зразки досліджували на предмет проникнення сперматозоїдів у естральний слиз. Експерименти тривали допоки рухливість сперматозоїдів падала нижче 20 %.

**Результати та їх обговорення.** У дослідженнях було перевірено три зразки естрального слизу та два варіанти їх підготовки для кожного зразка від трьох донорів та два зразки еякулятів кнурів різних порід (велика біла, миргородська), що були до-

сліджені в нативному стані та відмиті одноразово середовищем 199. Експерименти проводили в предметних скельцях з лункою (Рис. 1), що дозволяло проводити спостереження під мікроскопом із об'єктивами великої оптичної сили та у відрізках скляних трубок (Рис. 2). Всього проведено 172 досліди.



*Рис. 1. Предметне скло з лункою підготовлене для дослідження.  
1 – предметне скло з лункою, 2 – покривне скельце, 3 – зразок естрального слизу,  
4 – зразок сперми.*



*Рис. 2. Скляна трубка підготовлена для дослідження.  
1 – скляна трубка, 2 – зразок сперми, 3 – зразок естрального слизу,  
4 – вазелінова олія.*

У експериментах не виявлено проникнення сперматозоїдів у слиз. Сперматозоїди впродовж від двох до трьох годин активно рухалися у спермальній плазмі чи в середовищі 199, але не пенетрували слиз з яким безпосередньо контактувала краплина зі спермою. Окремі статеві клітини, які інколи були помічені в слизові, були малоактивними. Це можна пояснити більш високою в'язкістю естрального слизу в порівнянні з спермальною плазмою чи середовищем 199, що вимагає значно більших енергетичних затрат для підтримання руху.

У зв'язку з відсутністю суттєвого проникнення сперматозоїдів у естральний слиз корови при безпосередньому контакті двох рідин, були проведені додаткові дослідження для з'ясування руху сперматозоїдів у слизові. Для цього краплину естрального слизу змішували зі спермою й спостерігали за рухом сперматозоїдів. Виявилось, що ці дві рідини погано піддаються змішуванню, а сперматозоїди, які виявилися у слизові, суттєво сповільнюють свій рух.

**Висновки.** За результатами проведених досліджень зроблено висновок, що естральний слиз корови не придатний для використання у підготовці сперматозоїдів кнура до запліднення поза організмом. Ці результати відрізняються від даних деяких авторів, які повідомляли про активний рух сперматозоїдів у естральному слизові. Однак, такі повідомлення не набули подальшого розвитку. Очевидно, що естральний слиз не містить якихось особливих компонентів які б сприяли життєвості сперматозоїдів.

## БІБЛІОГРАФІЯ

1. Eriksen, G.V. Cervical mucins affect the motility of human spermatozoa in vitro. // Eriksen, G.V., Carlstedt, I., Uldbjerg, N., Ernst, E. / Fertil. Steril. – 1997. – 68. – P. 791 – 798.
2. Ikuma, K. Role of sperm passage through cervical mucus: fertilizing capacity tested by in vitro fertilization with zona-free hamster eggs. // Ikuma, K., Suno, S., Hasegawa, A., Koyama, K., Isojima, S. / Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. – 1989. – 41. – P. 167–172.
3. Katz, D.F. A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus. // Katz, D.F., Overstreet, J.W., Hanson, F.W. / Fertil. Steril. – 1980. – 33. – P. 179 – 186.
4. Lee, W.I. Sperm penetration into cervical mucus in vitro. III. Effect of freezing on estrous bovine cervical mucus. // Lee, W.I., Gaddum-Rosse, P. Blandau, R.J. / Fertil. Steril. – 1981. – 36. – P. 209.
5. Morrow, A. Evaluation of bovine cervical mucus penetration as a test of human spermatozoal function for an in vitro fertilization programme. // Morrow, A., Drudy, L., Gordon, A. and Harrison, R.F. / Andrologia. – 1992. – 24. – P. 323–326.
6. Perry, G., Glezerman, M., Insler, V., Selective filtration of abnormal spermatozoa by the cervical mucus *in vitro*. In: The uterine cervix in reproduction. Ed. Vinsler, G., Bettendorf, Stuttgart Georg Thieme Verlag, 1977. – P. 118.
7. Oehninger, S., Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. // Oehninger, S., Franken, D.R., Sayed, E., Barroso, G. Kolm, P. / Human Reproduction Update. – 2000. – 6. – P. 160–168.
8. Ola B., Accuracy of sperm–cervical mucus penetration tests in evaluating sperm motility in semen: a systematic quantitative review. // Ola B., Afnan M., Papaioannoul S., Sharif K., Björndahl L. / Human Reproduction. – 2003. – 18. – P. 1037-1046.
9. Overstreet J.W. Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: a study of fertile donors and infertile patients. // Overstreet, J.W., Yanagimachi, R., Katz, D.F., Hayashi, K., Hanson, F.W. / Fertil. Steril. – 1980. – 33. – P. 534 - 542.
10. Takemoto, F.S. Vaughn, W.K. and Hale, R.W. Comparison of the penetration ability of human spermatozoa into bovine cervical mucus and zona-free hamster eggs. // , F.S., Rogers, B.J., Wiltbank, M.C., Soderdahl, D.W. / J. Androl. - 1985. – 6. – P. 162–170.
11. Ulstein M. In vitro sperm penetration of cervical mucus and male fertility. // Ulstein M. / Andrologie. – 1973. – 5. – P. 189–191.
12. Wagner G. Electrolytes in vaginal fluid during the menstrual cycle or coitally active and inactive women. // Wagner G., Levin R. J. / Journal of Reproduction and Fertility. – 1980. – 60. – P. 17 – 27.

**Лобченко С. Ф.** Оценка возможности использования эстральной слизи для подготовки сперматозоидов хряка к оплодотворению *in vitro*.

*Исследовали возможность использования эстральной слизи коров, который собирали во время искусственного осеменения для подготовки спермы хряка к оплодотворению вне организма. Установлено, что при непосредственном контакте спермы и эстральной слизи сперматозоиды не проникают в слизь оставаясь в спермальной плазме. Также не происходит проникновения сперматозоидов в слизь после отмывания их от плазмы или после модифицирования слизи путем замораживания-размораживания. Такой результат наблюдается как при комнатной температуре, так и при 38 °C. Сделано вывод, что эстральная слизь коров, собранная во время охоты есть не проницаемой для сперматозоидов хряка и не может быть использованной для их подготовки к оплодотворению вне организма.*

*Ключевые слова:* вне организма, капацитация, оплодотворение, эстральная слизь, сперматозоид, хряк

**S. F. Lobchenko. Evaluation of estral mucus application in the preparation of boar spermatozoa for in vitro fertilization.**

*It has been studied the possibility to an application of cow estral mucus, which was got during the artificial insemination for preparation of boar sperm to in vitro fertilization . It was found out that spermatozoa don't penetrate into mucus being in sperm plasma at the direct contact of sperm and estral mucus. Spermatozoa also don't penetrate into mucus after washing them from plasma or after the modifying of mucus by freezing and thawing. Such result is observed as at indoor temperature and as at 38°C. It has been drawn conclusion, that estral mucus of cows, which was got during estrus, is not penetrating for boar spermatozoa and can not be applied for their preparation to in vitro fertilization.*

*Key words: boar, capacitation, estral mucus, fertilization, in vitro, spermatozoa*