

*of selection of piglings on the early lines of ontogenesis and organization of bring up of repair sapling in brief to six – eight heads nests on ration with the promoted providing by protein and mineral matters.*

*A new sign which provides high efficiency selection is exposed is index of higher living mass in the nest of piglings at birth.*

**Selection, early stages of ontogenesis, productivity, reproductive and fattenings qualities**

**УДК 636.4.082.454.3:591.463.1**

**Н. А. МАРТИНЕНКО, В. Ф. КОВАЛЕНКО,  
О. А. БІНДЮГ, С. Г. ЗІНОВ'ЄВ, А. В. БАЗАЛЕВИЧ**

*Інститут свинарства ім. О. В. Квасницького НААН*

## **ОРИГІНАЛЬНА МЕТОДИКА ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ШТУЧНОГО ОСІМЕНІННЯ СВИНОМАТОК ЗАМОРОЖЕНО- ВІДТАЛОЮ СПЕРМОЮ**



*Досліджено заморожуваність та функціональну активність спермійв кнурів плідників in vitro та in vivo у взаємозв'язку з їхньою запліднюючою здатністю. Встановлено вплив різних режимів еквілібрації на заморожуваність статевих клітин кнура. Розроблено новий метод прогнозування результатів штучного осіменіння свиноматок заморожено-відталою спермою.*

**Сперма, кріоконсервація, штучне осіменіння, функціональна активність спермійв**

У розвитку галузі свинарства найбільше значення має інтенсивність відтворення поголів'я, яке вирішується, як правило, з широким застосуванням штучного осіменіння тварин,

© Н. А. Мартиненко, В. Ф. Коваленко,  
О. А. Біндюг, С. Г. Зінов'єв, А. В. Базалевич, 2011  
Розведення і генетика тварин. 2011. № 45

зокрема із використанням кріоконсервованої сперми. Це дозволяє в короткі строки покращити генотип тварин, замінити дорогий імпорт племінних кнурів завозом їхньої замороженої сперми, виключити втрати, пов'язані з адаптацією тварин до інших умов годівлі та утримання, запобігти ризику завозу патогенної мікрофлори. У країнах Євросоюзу сперма кнурів місцевих порід з обмеженою чисельністю поголів'я зберігається у Європейському Кріобанку свинарства [7].

Отже, вдосконалення методологічної основи зберігання, відновлення та покращання наявного генофонду свиней *ex situ* у нашій країні має надзвичайно велике значення у селекційно-племянній роботі [2]. Не зважаючи на наявність ефективних державних програм збереження генофонду диких і свійських тварин, постає необхідність створення національного кріоцентра (кріобанку) для безстрокового збереження цього генофонду *ex situ*, тобто поза організмом. Це, в свою чергу, вимагає наявності ефективних технологій кріоконсервації гамет. Проте традиційні методи кріоконсервації сперми кнура, розроблені ще у 70-х роках минулого сторіччя [11] та пізніше модифіковані [1, 10], не забезпечують стабільних і позитивних результатів осіменіння.

Головним лімітуючим фактором широкого застосування у свинарстві кріоконсервованої сперми кнура є досить низька її запліднююча здатність. Отже, є необхідність вдосконалення наявних і розробки нових методів кріоконсервації сперми кнура.

Так Р. F. Watson [12], проаналізувавши причини низької результативності застосування у свинарстві кріоконсервованої сперми, дійшов висновку, що критичною ланкою цього процесу є саме відтавання, протягом якого істотно зростає порція спермій із ушкодженою мембраною. За даними інших науковців, успіх кріоконсервації сперми визначається подоланням сперміями порогу чутливості їх до холодового шоку, що підтверджено результатами одержання опоросів [8, 9].

За аналізом джерел літератури і власних досліджень, ми дійшли висновку про необхідність визначення придатності

сперміїв для осіменіння свиноматок після деконсервації замороженої сперми не тільки за показником їхньої виживаності після розморожування, а й збереженням ними функціональної активності, зокрема відсотком гамет із прямолінійно-поступальним рухом в умовах *in vitro* та організмі свиноматки. Оскільки для запліднення ооцитів спермії мають зберігати функціональну активність за умов температури тіла свині, у наших дослідженнях використовували терморезистентний тест (ТР-тест), який характеризує динаміку життєздатності сперміїв у процесі їхньої інкубації при +38 °С упродовж 3 год. Однак, цей метод не може, в значній мірі, слугувати критерієм для визначення показника заплідненості свиноматок. Тому метою наших досліджень було розробити метод, який дав би змогу прогнозувати заплідненість свиноматок з урахуванням функціональної активності сперміїв, виявлених в експульсованій рідині матки.

**Матеріал і методика досліджень.** Для проведення досліджень були відібрані 3 кнури-плідники великої білої породи – аналоги за віком, живою масою та рівнем спермопродукції. Годівлю їх проводили двічі на добу комбікормом СК-55-25 за кормовими нормами Інституту свинарства НААН.

Сперму від кнурів одержували мануальним методом із застосуванням чучела свині. Якість спермопродукції у них досліджували згідно з «Інструкцією із штучного осіменіння свиней» [3] за такими показниками: об'єм еякуляту (см<sup>3</sup>); відсоток поступально-рухливих сперміїв та їхня концентрація (млрд/см<sup>3</sup>) з допомогою мікроскопа, камери Горяєва та КФК-2; загальна кількість сперміїв в еякуляті (млрд). У досліді застосовували метод розділених еякулятів.

Зразки сперми розбавляли глюкозо-хелато-цитратно-сульфатно-жовтковим (ГХЦСЖ) середовищем у співвідношенні 1 : 1 і впродовж години витримували при кімнатній температурі для охолодження їх від +38 до +18 °С (0,333 °С/хв). З метою визначення оптимальної тривалості еквілібрації кожен пул із 15 зразків, аналогічних за кількістю поступально-рухливих

спермій і їхньою концентрацією, витримували у холодильнику 2 год для зниження температури від +18 °С до +5 °С (0,108 °С/хв.) і при цій температурі зберігали впродовж 1, 2, 3 та 5 год.

В кінці визначеного терміну еквілібрації сперму заморожували. Кріоконсервацію та відтаювання сперми кнурів здійснювали за полтавською технологією [1], використовуючи суцільний еякулят без відокремлення спермальної плазми. Вплив тривалості еквілібрації на кріостійкість спермій досліджували за показником їхньої функціональної активності.

Сперму заморожували на фторопластовій пластині, яка була вмонтована у спеціальний пристрій, що забезпечував робочі маніпуляції з рідким азотом. Заморожені гранули витримували в рідкому азоті не менше однієї доби. Сперму розморожували глюкозо-хелато-цитратно-сульфатним (ГХЦС) середовищем у співвідношенні 1 : 2. Відразу після розморожування пробірки з відталою спермою розміщали у водяній бані для погодинного визначення відсотку поступально-рухливих спермій (функціональної активності) при +38 °С протягом 5-ти год.

Осіменіння свиноматок здійснювали заморожено-відталою спермою у дозі 2 млрд функціонально активних спермій з допомогою приладу УКП-1 двократно через 24 і 36 год від початку охоти за умови триразового її виявлення за добу. За результатами опоросів реєстрували багатоплідність свиноматок.

З метою визначення впливу тривалості еквілібрації на виживаність спермій у репродуктивному тракті свиноматки (*in vivo*) в експерименті після штучного осіменіння погодинно реєстрували кількість їх, що зберігали поступальний рух у експульсованому разом зі спермою матковому секреті. Це фактично відображало термін виживаності спермій у репродуктивному тракті свиноматки після її осіменіння.

Цифровий матеріал отриманих результатів був статистично оброблений згідно з програмою Microsoft Excel 2003 за допомогою комп'ютера AMD Atlon у середовищі Windows XP Professional. У процесі обчислення отриманих даних були визначені стандартні статистичні показники [6]: середнє ариф-

метичне  $M$ , похибка  $m$ , вірогідність різниці між середніми даними  $p$ . Ступінь зв'язків між досліджуваними показниками визначали шляхом кореляційного аналізу [4].

**Результати досліджень.** У досліді порівнювали ступінь виживаності і функціональної активності відталих спермій за умов інкубації їх *in vitro* при  $+38\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 5 год і середовища з репродуктивного тракту свиноматки *in vivo*.

Кількість функціонально активних спермій у експульсованій рідині суттєво зменшувалась порівняно з показниками, одержаними при температурі зберігання  $+38\text{ }^{\circ}\text{C}$  *in vitro*. Інтенсивне зниження активності спермій *in vivo* відбувається вже після одогодинної їх еквілібрації до заморожування (табл. 1). Так, якщо за умов одогодинної еквілібрації через годину активність спермій у експульсованій рідині складала 42,10% ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з такою, визначеною за ТР-тестом, то при 5-годинній еквілібрації – 57,14% ( $p \leq 0,01$ ). Відсоток поступально-рухливих спермій у експульсованій рідині за інших термінів еквілібрації також неухильно зменшувався протягом 5 год і через 3 год їх нараховувалось лише 3,1–6,3%. Через 4 год після осіменіння у матковій рідині більшості свиноматок було виявлено лише поодинокі спермії з коливальним рухом.

За умов еквілібрації сперми *in vitro* упродовж 2–5 год вірогідної різниці між функціональною активністю спермій у першу годину та послідовні терміни інкубації, не виявлено.

Для поглиблення аналізу одержаних попередніх результатів та врахування індивідуальних особливостей тварин проведено дослід з використанням 9-ти свиноматок і 4-х кнурів. Кріоконсервованою спермою кожного з них було осіменено певну кількість свиноматок (табл. 2).

**1. Вплив тривалості еквілібрації на функціональну активність сперміїв *in vitro* і *in vivo*, (n = 24)**

		Поступально-рухливих сперміїв у зразках, %										
		сперми – ТР-тест (через... год), <i>in vitro</i>					експульсованої рідини (через... год після осіменіння), <i>in vivo</i>					
		після втавання					порівняно з <i>in vitro</i> , %, через год					
		1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3
1	43	38,4 ± 1,2	31,3 ± 1,0	23,1 ± 2,0	19,3 ± 0,01	9,3 ± 0,01	16,2 ± 0,9	9,3 ± 1,0	3,1 ± 0,2	42,10 ***	29,03**	13,48 **
2	41	40,3 ± 2,1	35,3 ± 2,15	26,2 ± 1,0	21,4 ± 3,2	17,1 ± 2,5	21,3 ± 2,1	13,2 ± 1,8	5,3 ± 0,6	52,85 ***	36,83 ****	20,38 ***
3	47	43,2 ± 1,2	36,2 ± 2,5	28,3 ± 1,2	23,2 ± 2,4	21,2 ± 0,1	23,2 ± 1,2	17,2 ± 1,2	4,2 ± 1,3	53,49 ***	47,22 ***	14,28 ***
5	47	42,1 ± 1,2	38,5 ± 1,2	27,2 ± 1,2	24,1 ± 0,9	20,3 ± 1,8	24,6 ± 1,0	19,1 ± 0,1	0,6 ± 1,0	57,14 **	50,00***	22,22 ***

\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001.

Встановлено, що сперма кнура № 1775, використана для осіменіння двох свиноматок (№ № 7444 і 980) в обох випадках була тотожної активності за ТР-тестом – 30 % поступально-рухливих спермійв. Функціональна активність спермійв у рідині експульсованій через 1 год після штучного осіменіння також була однаковою і складала 20 %. У свиноматки № 7444 у матковій рідині, зібраній наприкінці другої години, кількість поступально-активних спермійв практично не змінилась, а через 3 год становила 10 %; у кінцевому результаті від неї отримано 10 поросят. Однак, у свиноматки № 980 через 2 год кількість поступально-рухливих спермійв у матці знизилась вдвічі, після 3 год перебування – становила лише 5 %, що, очевидно, і призвело до її переугулу (див. табл. 2). Подібна закономірність підтверджена і з використанням сперми інших кнурів, що відбилося на результатах опоросів свиноматок. Пряма кореляція між функціональною активністю спермійв у експульсованій рідині з показником опоросів становить 0,69 ( $p < 0,05$ ).

**2. Вплив динаміки функціональної активності спермійв *in vitro* і *in vivo* на багатоплідність свиноматок**

Індивідуальний №		Кількість поступально-рухливих спермійв у зразках сперми, %					Багатоплідність, гол		
свиноматки	кнур	після відтавання ( <i>in vitro</i> )		після осіменіння свиноматок ( <i>in vivo</i> ), год					
		відразу	через 3 год ТР-тесту	1	2	3		4	5
6482	1741	40	30	30	25	10	5	–	8
460	1741	45	25	25	15	5	–	–	–
366	2411	45	35	25	25	10	2	–	6
7336	2411	40	35	25	20	10	5	–	10
7444	1775	40	30	20	20	10	5	–	10
980	1775	45	30	20	10	5	–	–	–
7006	1917	40	30	25	25	15	10	–	9
898	1917	45	20	20	15	2	–	–	–
7900	1917	35	15	15	10	–	–	–	–

Проведення узагальнюючої оцінки функціональної активності спермійв *in vitro* і *in vivo* та порівняння її з заплідненістю

свиноматок за результатами опоросів показало наступне. Функціональна активність спермійів відразу після розморожування сперми не повністю відображає їхню кріостійкість та запліднюючу здатність. Проте, оцінка за 3-годинним ТР-тестом дозволяє певною мірою передбачити результат штучного осіменіння. Однак, використовуючи оцінку кріостійкості спермійів *in vivo*, можна очікувати позитивні результати лише коли їхня функціональна активність у заморожено-відталій спермі становить не нижче 30 % за ТР-тестом. Отже, кріостійкість спермійів залежить від генотипу кнура, а їхня виживаність *in vivo* та запліднююча здатність – від ступеня сумісності чоловічих гамет з матковим середовищем.

На підставі одержаних даних нами було розроблено метод прогнозування результатів штучного осіменіння свиноматок кріоконсервованою спермою кнурів-плідників [5].

**Висновки.** 1. За показником функціональної активності спермійів у процесі їхньої кріоконсервації оптимальна тривалість фази еквілібрації сперми становить 2–3 год.

2. Кількість поступально-рухливих спермійів у експульсованій матковій рідині не менше 30 % відразу після осіменіння і 10 % – через 3 год відображає вірогідність оптимального запліднення у свиноматок.

3. З метою прогнозування результатів запліднюючої здатності відталих спермійів доцільно проводити оцінку функціональної активності гамет у рідині, експульсованій маткою свині після осіменіння.

1. А. с. № 1307636 СССР, МКИ<sup>4</sup> А 61 Д 7/02. Способ замороживання сперми хряков / В. Ф. Коваленко, Л. В. Бурлаченко (СССР). – № 3813176/30 – 15; заявл. 25.07.84 ; ДСП.

2. *Методологічні* аспекти зберігання генофонду сільськогосподарських тварин / М. В. Зубець [та ін.] – К. : Аграрна наука, 2007. – 120 с.

3. *Інструкція* із штучного осіменіння свиней / Ю. Ф. Мельник [та ін.]; відпов. за вип. Ю. Ф. Мельник. – К. : Аграрна наука, 2003. – 56 с.

4. *Лакин, Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк. – 1980. – 293 с.

5. *Пат. 39101 Україна, МПК А 01 К67/02.* Спосіб прогнозування ефективності осіменіння свиноматок заморожено-відталою спермою



/ О. В. Квасницкий, О. Г. Близнюченко, Н. А. Мартиненко, В. Ф. Коваленко, Базалевич А. В.; заявник і патентовласник ІС УААН. — 2008 08641; заявл. 01.07.2008; опубл. 10.02.2009, Бюл. № 13.

6. *Плохинский, Н. А.* Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. — М.: Колос, 1969. — 215 с.

7. *Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry* / L. Bailey, Christian Lessard, Joannie Jacques [at al] // *Theriogenology*. — 2008. — Volume 70, Issue 8. — Pages 1251–1259.

8. *Goolsby, H. A.* Preliminary Trial: Motility Comparisons of a Unique Freezing Technology (UFT) to Liquid Nitrogen Mist Methodology for Cryopreservation of Porcine Spermatozoa / H. A. Goolsby, J. R. Blanton, P. Z. Cotter // *Reprod. Dom. Anim.* - 2004. — Vol. 39, Issue 5. — P.328–332.

9. *Maldjian, A.* Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen / A. Maldjian, F. Pizzi, T. Gliozzi at al // *Theriogenology*.—2005. — Vol. 63, Issue 2. — P. 411–421.

10. *Pettit, M.* Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane structure during cryopreservation. / M. Pettit, M. Buhr // *Androl.* — 1998; Vol.19 P. 736–746.

11. *Pursel, V. G.* Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. / V. G. Pursel, L. A. Johnson // *J. Anim. Sci.* — 1975; Vol. 40. — P. 99 – 102.

12. *Watson, P. F.* The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. / P. F. Watson // *Anim Reprod Sci.* — 2000. — P. 60–61, 481–492.

**ОРИГИНАЛЬНАЯ МЕТОДИКА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ СВИНОМАТОК ЗАМОРОЖЕНО-ОТТАЯННОЙ СПЕРМОЙ.** Мартыненко Н. А., Коваленко В. Ф., Биндюг А. А., Зиновьев С. Г., Базалевич А. В.

*Исследованы замораживаемость и функциональная активность спермиев хряков in vitro и in vivo во взаимосвязи с оплодотворяющей их способностью. Установлено влияние разных режимов эквilibрации на замораживаемость половых клеток хряка. Разработан новый метод прогнозирования результатов искусственного осеменения свиноматок заморожено-оттаянной спермой.*

**Сперма, криоконсервация, искусственное осеменение, функциональная активность спермиев**

**THE ORIGINAL METHODS OF A PROGNOSTICATION OF RESULTS SOWS' ARTIFICIAL INSEMINATION BY FROZEN-THAWED SPERM.** Martynenko N. A., Kovalenko V. F., Bindyug O. A., Zinoviev S. G., Bazalevych A. V.

*It was researched a freezability and a functional sperm activity of boars in vitro and in vivo with the correlation their ability to the fertilization. The influence of different regimes of equilibration on the freezability of boar sex cells was determined. The new method of a prognostication of results of sows' artificial insemination by frozen—thawed sperm was designed.*

**Sperm, cryopreservation, artificial insemination, functional sperm activity**

**УДК: 636.2.033.637.04/.07**

**Н. І. МАРЧЕНКО\***

*Інститут розведення і генетики тварин НААН*

## **КОНЦЕНТРАЦІЯ ІОНІВ ВОДНЮ (PH), ЇЇ РОЛЬ У ПРОЦЕСАХ МЕТАБОЛІЗМУ ТА ВПЛИВ НА ЯКІСТЬ ПРОДУКТІВ ПЕРЕРОБКИ І М'ЯСА БИЧКІВ ПОРІД СИМЕНТАЛ І ЛІМУЗИН**



*Наведено інформацію про роль концентрації іонів водню рН у процесах метаболізму та вплив на якість продуктів переробки і м'яса яловичини. Експериментально визначено і вивчено концентрацію іонів водню рН у найдовшому м'язі спини бичків 18-місячного віку порід симентал і лімузин.*

**Концентрація, іони водню, метаболізм, якість м'яса, порода, симентал, лімузин**

Термін «активна кислотність» визначає рівень концентрації іонів водню, які характеризують ступінь інтенсивності біохімічних процесів при дозріванні м'яса [1]. У водних розчинах

---

\* Науковий керівник — кандидат сільськогосподарських наук І. В. Гузев.