



ному осіменінні як з застосуванням Сурфагона, так і з застосуванням препаратів гонадотропін-релізінгового ряду, які традиційно використовують для індукції овуляції у кролівництві – Фертагіла і Рецептала. Одержані в умовах різних господарств експериментальні дані показують, що запліднюваність кролиць при штучному осіменінні з Сурфагоном достовірно не відрізняється від результатів осіменіння з Фертагілом і Рецепталом.

Ключові слова: кролики, штучне осіменіння, індукція овуляції, гормональні препарати гонадотропін-релізінгового ряду, сурфагон, запліднюваність

THE RESULTS OF SURFAGON USE IN THE PRACTICE OF RABBIT ARTIFICIAL INSEMINATION

V.I. Lisin, A.B. Sushko, Institute of Animal Science UAAS

The article presents the results of rabbits artificial insemination using Surfagon for ovulation induction. Surfagon is a synthetic nonapeptid, agonist of gonadotropin-releasing hormone, usage of which in such cases was studied insufficiently. The results of rabbits artificial inseminations either with Surfagon and other gonadotropin-releasing hormone analogs, such as Fertagyl and Receptal used traditionally for ovulation induction, are presented in this study work. The experimental data obtained in different conditions of rabbits farms demonstrated that there are no significant differences between the results received by artificial inseminations of rabbits using Surfagon, Fertagyl or Receptal as ovulation inductors.

Keywords: rabbits, artificial insemination, ovulation induction, gonadotropin-releasing hormone analogs and agonists, Surfagon, fertilization

УДК 591.391

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ СИРОВАТКИ НА МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ МИШЕЙ *IN VITRO*

Лобачова І.В.², к. с.-г. н.

Інститут тваринництва степових районів
ім. М.Ф. Іванова «Асканія-Нова» - ННСГЦВ

Вивчено вплив додавання до середовища SOF сироватки окремо або сумісно з піруватом або лактатом на мейотичне дозрівання *in vitro* ооцитів рандомно схрещених (C57BL×CBA) мишей. Додавання сироватки сприяло мейотичному дозріванню до стадії метафаза 2 80,84±3,83 % ооцитів з кумулюсом, але 61,64±10,20 % оголених ооцитів при цьому залишилися на стадії дипломени. Додаткове введення лактату посилює ініціацію мейозу в оголених ооцитах, але майже не вплинуло на розвиток ооцитів в кумулюсі. Сумісне введення у середовище сироватки і пірувату сприяло мейотичному дозріванню 66,63±18,00 % ооцитів з кумулюсом і 47,94±6,03 % оголених, що майже не різнилося від варіанту за додавання лише пірувату. За всіх варіантів доповнення середовищ сироваткою посилює розростання та експансію кумулюсних клітин, але за сумісного з лактатом додавання зменшувало відокремлення кумулюсу від ооцитів. Введення сироватки до складу середовищ підвищувало частку ооцитів з дегенерованими хро-

² Науковий консультант – Безуглий М.Д., академік НААН, професор, доктор с.-г. наук



мосомами, що свідчить про необхідність додаткового визначення доцільності її використання в системі отримання ембріонів *in vitro*.

Ключові слова: **ооцит, культивування *in vitro*, мейотичне дозрівання, сироватка, лактат, піруват.**

Завершення мейотичного дозрівання ооцитів - обов'язкова умова отримання ембріонів поза організмом. На сьогодні під ним у ссавців розуміють два взаємопов'язані процеси: ядерне і цитоплазматичне дозрівання [9]. Ядерне дозрівання ооцита включає закінчення мейотичної перебудови хромосом і досягнення ними стадії метафаза 2.

Як показано, хромосоми, вилученого з фолікула ооцита, здатні самостійно поновити і закінчити мейоз *in vitro* [8]. Необхідною умовою при цьому є наявність у середовищі енергетичних речовин, зокрема, пірувату або оксалацетату при культивуванні оголених ооцитів, а також, крім зазначених, глюкози чи лактату при дозріванні ооцит-кумулясних комплексів [5]. Але завершення мейотичної перебудови не є абсолютною ознакою здатності ооцита до подальшого розвитку. Для набуття такої спроможності до середовища культивування необхідно додати гормони, ростові фактори, суміш амінокислот, альбумін, вітаміни, речовини антиоксидантної та іншої дії. Часто, як джерело частини цих речовин, використовують сироватку крові. Але дані щодо впливу сироватки суперечливі. Так, у дослідях Serta R.T. et al. [14] додавання фетальної сироватки до середовища мейотичного дозрівання не вплинуло ні на кількість мейотично дозрілих ооцитів мишей, ні на їх здатність до запліднення. Доповнення середовища сироваткою не змінювало показники запліднення і наступного розвитку ооцитів корів, а за безгормонального варіанту взагалі діяло негативно [13]. У роботі Choi T.S. [6] додавання фетальної сироватки, навпаки, збільшувало кількість пенетрованих сперміями ооцитів мишей і зменшило стійкість зони пелюциду до ензимів, ймовірною причиною чого могло бути попередження затвердіння зони пелюциду [7]. А ось у дослідях Ali A. і Sirard M.A. [4] і Hochi H. [11] додавання сироватки зменшило частку морул і бластоцист корів. Тож питання щодо доцільності доповнення середовищ сироваткою залишається відкритим.

Метою наших досліджень було вивчення особливості впливу сироватки на мейотичне дозрівання ооцитів мишей.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом досліджень були ооцити (ооцит-кумулясні комплекси та оголені ооцити) рандомно схрещених (C57BL×CBA) 4-8-тижневих мишей, які піддавали процедурі мейотичного дозрівання. Тварин забивали зміщенням шийних хребців. Для кожної процедури забивали не менш трьох тварин. Усі ізольовані яєчники розміщували в одній краплі середовища з гепарином і подрібнювали лезом, ооцити відшукували під мікроскопом. Знайдені ооцит-кумулясні комплекси двічі промивали у свіжих краплях промивного середовища, оцінювали за морфологією, поділяли на групи, тричі промивали у краплях культурального середовища і переносили на мейотичне дозрівання. Для кожної процедури усі вилучені ооцити розподіляли порівну між дослідними варіантами. Культивування проводили серіями, кожна з яких включала по три відмежовані за часом процедури. Робочий об'єм культуральної краплі становив 0,1 мл. До кожної краплі вносили від 10 до 14 ооцитів. Для виявлення особливості впливу кумулюсу культивування ооцитів проводили роздільно двома групами: до першої входили ооцити I та II категорій, до другої – ооцити IV категорії. Після сортування чашки з клітинами переносили до ексикатора і витримували при температурі 38 °C, 100 %-ної вологості та 5 %-ного вмісту вуглекислого газу у по-



вітрі. Тривалість процедури мейотичного дозрівання становила 16-17 годин, після якої ооцити оцінювали за станом хромосом та морфологією кумулюсних клітин.

Як основу середовища мейотичного дозрівання використовували середовище SOF з солями за Tervit H.R. et al. [15], яке доповнювали сумішшю основних (MEM, «Sigma», M7145, 1 % за об'ємом) та базових (BME, «Sigma», B6766, 1 % за об'ємом) амінокислот, антибіотиками (пеніцилін, стрептоміцин), глутаміном (1 мг/мл, «Рeахім»), сироватковим альбуміном бугая (3 мг/мл, «Sigma», A9647). Речовинами, вміст яких варіювали, були: сироватка крові вівці (0 або 5 % за об'ємом), піруват натрію (0,0 або 0,3 мг/мл, «Sigma», P4562), лактат натрію (0,0 або 1,56 мг/мл, «Sigma», L4263).

Передкультуральний аналіз включав морфологічну оцінку кумулюсного шару та цитоплазми відповідно до класифікації, яку розробили [1]. До першої категорії (I) відносили ооцити, оточені більш ніж 3-ма шарами кумулюсних клітин з чітким контуром несучого горбика, до другої (II) – ооцити з 2-3-шарами кумулюсу, але без наявності оголених ділянок зони пелюциду. Четверту категорію (IV/IVKK) склали ооцити з відсутніми кумулюсними клітинами (IV) або з їх незначною кількістю (IVKK). Умовою використання усіх ооцитів була наявність у цитоплазмі зародкового міхурця, а також відсутність ознак дегенерації, зокрема нерівномірності забарвлення цитоплазми ооцита та збільшення у кілька разів міжклітинних відстань у кумулюсі.

Посткультуральний аналіз включав морфологічну оцінку кумулюсного шару та стану хромосом. Стан хромосом культивованих ооцитів оцінювали за Tarkowsky A. (1955). Морфологічну оцінку кумулюсу проводили відповідно до розробленої нами класифікації [3]. Параметрами, які визначали, були: ступінь розростання кумулюсу по дну чашки, його експансію (розрідження) та легкість відокремлення кумулюсних клітин від ооцита при обережному піпетуванні.

Розростання кумулюсу («РозКК») оцінювали в умовних одиницях (у.о.) за шкалою від 0 (відсутність прикріплення кумулюсних клітин до дна чашки) до 3 (розростання клітин з утворенням щільного моношару). При цьому враховували лише характер розростання фолікулярних клітин біля ооцит-кумулясних комплексів, не беручи до уваги стан ізольованих скупчень.

Експансію (розрідження) кумулюсу («ЕксКК») оцінювали візуально в у.о. за шкалою від 0 (повна відсутність ознак розрідження) до 3 (добре виражені ознаки розрідження зі збільшенням зовнішнього діаметру кумулюсу у 1,5-2 рази).

Легкість відокремлення кумулюсу («ВідКК») оцінювали в у.о. суб'єктивно за результатами відокремлення клітин від ооцитів при піпетуванні останніх за шкалою від 0 (клітини не відокремлювалися зовсім) до 3 (клітини відходили після 3-5 піпетувань повністю).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою математичного апарату програми «Excel» пакету «Microsoft Office 2010», встановлення вірогідності відмінності (p) показників вираховуванням коефіцієнту Стьюдента (t_d) за М.О. Плохінським (1961).

Результати досліджень. У таблиці 1 наведено результати розподілу ооцитів за стадіями їх хромосом після процедури мейотичного дозрівання. Як видно, за відсутності у середовищі енергетичних речовин та сироватки (варіанти 1 і 2) хромосоми певної частки ооцитів з кумулюсом (I і II категорії) здатні розвинути до стадії метафаза 2 (M2). Оскільки серед оголених ооцитів (IV/IVKK категорія) за таким варіантом хромосоми майже усіх клітин залишилися на стадії диплотени, можна припустити два можливих шляхи енергетичного забезпечення перебудови хромосом ооцитів з кумулюсом: перший – за рахунок використання



як субстрату інших компонентів середовища, наприклад, амінокислот, другий – за рахунок використання речовин, накопичених цитоплазмою кумулюсними клітинами до моменту вилучення ооцитів із фолікулів.

За доповнення середовища сироваткою в групі ооцитів з кумулюсом майже усі ооцити ініціювали мейоз (варіант 3), а серед оголених більшість залишилася на стадії диплотени (варіант 6). Тож компоненти сироватки не змогли у повній мірі підтримати ініціацію мейозу в ооцитах за відсутності достатньої кількості кумулюсних клітин. За заміни сироватки лактатом частка ооцитів, хромосоми яких досягли стадії M2, невірогідно зменшилася: для варіанту 4 проти варіанту 3 $t_d=1,44$ ($p>0,05$), для варіанту 7 проти 6 - $t_d=1,00$ ($p>0,05$). Цікаво, що за додавання лише лактату в групі оголених ооцитів хромосоми більшої частини клітин зупинилися на стадії діакінез-метафаза 1. Останнє свідчить про те, що лактат здатний підтримати розвиток ооцитів лише до цієї стадії. Можна припустити, що розвиток тієї частки оголених ооцитів, хромосоми яких досягли стадії M2, відбувся за рахунок метаболічної активності залишкових кумулюсних клітин.

Сумісне додавання сироватки і лактату (варіанти 5 і 8) зумовило простий сумарний ефект – збільшило частку клітин з ініційованим мейозом в групі оголених ооцитів, що було обумовлено лактатом, і частку клітин, хромосоми яких досягли стадії M2, в групі з кумулюсом, що обумовлювалося сироваткою. Взаємного підсилення дії цих компонентів за сумісного додавання не виявлено.

До розуміння особливості впливу лактату слід зауважити, що наведені результати отримано за об'єму робочої краплі 0,1 мл. Нами показано, що за таких умов зростає роль компонентів, що синтезуються самими ооцитами [2]. Зокрема, збільшення краплі до 0,5 мл за варіанту середовища аналогічного варіанту 4 і аналогічній щільності клітин при культивуванні ооцитів з кумулюсом зменшує частку клітин, хромосоми яких досягли стадії M2, і збільшує частку тих, хромосоми яких зупиняються на стадії метафаза 1. В групі оголених ооцитів збільшення об'єму гальмує ініціацію мейозу майже у 70 % ооцитів, але не впливає на кількість клітин, хромосоми яких досягли стадії M2. Отже, можна припустити, що стимулюючий вплив лактату проявляється посиленням синтезу саме аутокринних факторів. У той же час компоненти сироватки не здатні підтримати утворення цих факторів, про що свідчить збільшення кількості клітин на стадії диплотени за варіантом 6.

Тож, сироватка за одинокого додавання здатна підтримати розвиток лише невеликої частки оголених ооцитів. Зважаючи, що для ооцитів основним енергетичним субстратом є піруват [5], можна припустити, що його вміст у сироватці був недостатній. Але за наявності кумулюсу сироватка здатна задовольнити енергетичні потреби ооцитів за рахунок використання інших компонентів середовища.

Додавання пірувату сумісно з сироваткою обумовило завершення мейотичне дозрівання хромосом у майже 2/3 ооцитів з кумулюсом (варіант 10) і у половини оголених (варіант 12). Усунення сироватки зі складу середовища при доповненні останнього піруватом майже не змінило показники розвитку ооцитів обох груп (варіанти 9 і 11). Оскільки використана концентрація пірувату майже у 10 разів перевищує його концентрацію у рідині фолікулів мишей [10], можна припустити, що за таких умов утилізація пірувату стає основним шляхом підтримки розвитку ооцитів, зокрема, перетворення хромосом, пригнічуючи інші. Тож, за наявністю у середовищі збільшеної кількості пірувату, стимулюючий вплив сироватки не проявився. Слід зауважити, що у цілому кількість ооцитів, які досягли стадії метафаза 2, за додавання пірувату в групі ооцитів з кумулюсом (варіант 9) була нижча за аналогічні показники варіантів за додавання лише сироватки



(варіант 3). Але, оскільки дані отримані двома відмежованими у часі дослідями, статистичне порівняння результатів, на нашу думку, не є правомірним.

Таким чином, вплив сироватки визначався типом доданих до середовища енергетичних речовин. Значною негативною стороною додавання сироватки стало збільшення частки клітин з дегенерацією хромосом. Так, найбільша частка клітин з дегенерованими хромосомами у досліді 2 відмічена у сироваткових варіантах 5 і 6, найменша – у безсироваткових 4 і 7. У досліді 3 найменша частка ооцитів з дегенерованими хромосомами була за безсироваткових варіантів 9 і 11. У контрольному варіанті 1 серед ооцитів з кумулюсом кількість клітин з дегенерацією розподілялася майже порівну між діакінезною і метафаза 2 стадіями, у варіанті 2 80 % хромосом дегенерували на стадії фібрилярної диплотени. За додавання лише сироватки (варіанти 3 і 6) серед ооцитів з кумулюсом 80 % хромосом дегенерували на стадії метафаза 2, при цьому основним типом дегенерації був клампінг. Серед оголених ооцитів за таким типом середовища 31 % клітин дегенерували на стадії метафаза 2, 69 % - на стадії дифузна диплотена. За додавання лише лактату (варіанти 4 і 7) основна частка ооцитів дегенерувала на стадії діакінезу-метафази 1, а за додаткового введення сироватки (варіанти 5 і 8) – на стадії метафаза 2. Основним типом дегенерації був клампінг. За додавання лише пірувату (варіанти 9 і 11) серед оголених ооцитів дегенеровані хромосоми були на стадії метафаза 2, при цьому дегенерація проявилась видовженням хромосом.

За сумісного додавання пірувату і сироватки (варіанти 10 і 12) більшість ооцитів з дегенерацією мали хромосоми на стадії метафаза 2 - 56 % в групі ооцитів з кумулюсом і 50 % серед оголених. Основним типом дегенерації при цьому був клампінг і втрата компактності хромосом. За візуальною оцінкою хромосом ми припустили, що основною причиною їх дегенерації за додавання сироватки було порушення внутрішньоклітинного рН ооцитів.

Нами встановлено, що крім стану хромосом, достатньо інформативним критерієм для оцінки якості процедури мейотичного дозрівання є морфологія кумулюсу за такими параметрами як: розростання кумулюсу по дну чашки, ступінь його експансії (розширення) і легкість відокремлення. У таблиці 2 наведено значення цих параметрів при застосованих варіантах середовищ. Одиноке додавання сироватки посилює розростання кумулюсу по дну чашки (варіант 1 проти варіанту 3, $t_d=13,23$, $p<0,05$), що цілком очікувано. Додаткове внесення лактату ніяк не вплинуло на розростання, а додавання пірувату лише незначно посилює його. Доповнення середовища тільки піруватом, або тільки лактатом, не сприяло утворенню клітинного моношару.

Додавання сироватки збільшувало експансію кумулюсу проти контрольного варіанту (3 проти 1, $t_d=4,49$, $p<0,05$). Ні піруват, ні лактат не збільшували дію сироватки. Разом з тим, стимульоване сироваткою поширення кумулюсу не було задовільним, оскільки біля ооцита залишалися 1-2 шари клітин, що щільно прилягали одна до одної та до зони пелюциду і важко відділялися навіть у безкальцієвому середовищі.

Легкість відокремлення була найбільша у варіанті за сумісного додавання сироватки і пірувату (варіант 10). Невірогідне зменшення цього параметру спостережено за одинокого додавання лактату або пірувату. За сумісного додавання сироватки і лактату легкість відокремлення була найгіршою (5 проти 4, $t_d=3,35$, $p<0,05$).

Вплив сироватки на мейотичне дозрівання ооцитів за вмісту різних типів енергетичних речовин

№№	Категорія ооцитів	Наявність енергетичних речовин*	Наявність сироватки	N/n**	Частка ооцитів з хромосомами на стадії, %				Частка ооцитів з дегенерованими хромосомами, %
					диплотена	діакінез-метафаза1	анафаза	телофаза- метафаза2	
<i>Дослід 1</i>									
1	I, II	—	—	3/45	31,60±13,38 ^a	41,67±5,56 ^a	3,13±3,61 ^a	23,61±7,94 ^a	23,61±7,94 ^a
2	IV, IV КК	—	—	3/54	90,24±7,39 ^b	9,74±7,39 ^b	0,0 ^a	0,0 ^b	11,67±8,12 ^a
<i>Дослід 2</i>									
3	I, II	—	+	3/33	3,03±3,71 ^{c,j}	13,10±8,87 ^c	3,03±3,71 ^c	80,84±3,83 ^c	22,62±15,22 ^{c,d}
4	I, II	лактат	—	3/32	6,67±8,16 ^{c,g,j}	43,97±20,25 ^{c,d}	2,56±3,14 ^c	49,79±21,17 ^{c,g}	21,03±14,20 ^{c,d}
5	I, II	лактат	+	3/40	3,70±4,54 ^{c,g,j}	21,11±6,71 ^c	0,0 ^c	75,19±8,47 ^c	39,89±24,53 ^{c,d}
6	IV, IV КК	-	+	3/32	61,64±10,20 ^d	15,87±11,82 ^c	0,0 ^c	22,49±4,21 ^{d,g}	57,81±19,04 ^c
7	IV, IV КК	лактат	—	3/43	26,75±7,38 ^{d,g}	60,57±16,20 ^{c,d}	0,0 ^c	12,68±8,84 ^{d,g}	8,55±6,13 ^d
8	IV, IV КК	лактат	+	3/40	25,33±15,46 ^{d,g,j}	51,80±4,13 ^d	0,0 ^c	22,87±14,02 ^{d,g}	40,20±19,53 ^{c,d}
<i>Дослід 3</i>									
9	I, II	піруват	—	3/35	10,44±7,90 ^e	24,86±5,47 ^c	0,0 ^e	64,70±12,49 ^c	0,0 ^e
10	I, II	піруват	+	3/41	10,90±9,05 ^e	20,39±8,41 ^e	2,08±2,55 ^e	66,63±18,00 ^c	24,57±6,35 ^f
11	IV, IV КК	піруват	—	3/66	24,76±11,79 ^e	20,48±12,22 ^e	0,0 ^e	54,76±10,51 ^c	3,57±6,37 ^{e,f}
12	IV, IV КК	піруват	+	3/67	23,49±7,07 ^e	26,35±1,69 ^e	2,22±2,72 ^e	47,94±6,03 ^e	16,51±7,86 ^f

Примітка. - * - Піруват додавали у концентрації 0,3 мг/мл, лактат – 1,56 мг/мл, сироватку – 5 % за об'ємом, ** - N – кількість повторів, n – кількість ооцитів. Тут і далі показники в одній колонці з різними субскриптами (a,b, c:d, e:f) в межах окремих дослідів різняться між собою з рівнем вірогідності $p < 0,05$, вірогідність різниці між показниками різних дослідів наведено у тексті.

Таблиця 2

Зміна морфологічних параметрів кумулюсу після культивування ооцитів у середовищах різного складу

№№*	Наявність енергетичних речовин*	Наявність сироватки	N	РозКК	ЕксКК	ВідКК
1	—	—	3	0,25±0,17	0,25±0,17	1,33±0,49
3	—	+	3	2,50±0,00 ^c	2,00±0,35 ^c	1,83±0,20 ^c
4	лактат	—	3	0,00 ^d	0,50±0,00 ^c	2,17±0,20 ^c
5	лактат	+	3	2,50±0,35 ^c	2,00±0,50 ^c	1,50±0,00 ^c
9	піруват	—	3	0,00 ^c	0,50±0,00 ^c	2,17±0,20 ^c
10	піруват	+	3	3,00±0,00 ^f	2,00±0,71 ^e	2,33±0,20 ^c

Примітка. *- Номер варіанту тут відповідає номеру варіанту у таблиці 1.





Вивчення кореляційних зв'язків між морфологічними параметрами кумулюсу та розвитком ооцитів показало, що найбільш позитивно з кількістю ооцитів, що дозріли до стадії метафаза 2, корелює ступінь експансії кумулюсу [3]. Але, такий показник як кількість отриманих зародків найбільш позитивно корелює з легкістю відокремлення і негативно з розростанням кумулюсу. За результатами теперішніх дослідів можна припустити, що сироватка за сумісного з піруватом додавання, не впливаючи на показник мейотичного дозрівання, покращує здатність культивованих ооцитів до подальшого розвитку, а за додавання з лактатом, навпроти, покращує мейотичне дозрівання, але зменшує здатність до наступного поділу. Проте, це ствердження потребує перевірки.

Отже, сироватка за додавання до середовища мейотичного дозрівання посилює ініціацію мейозу і збільшує кількість ооцитів, хромосоми яких сягають стадії метафаза 2, при цьому наявність кумулюсу посилює вплив сироватки. За відсутності кумулюсу сироватка не здатна підтримати ініціацію мейозу у більшості ооцитів. Разом з тим, введення сироватки до складу середовища не завжди є бажаним прийомом, оскільки підвищує частку клітин з дегенерованими хромосомами і отже питання щодо доцільності її додавання потребує уточнення. Враховуючи наші результати, можна припустити, що причиною зменшення кількості ембріонів у дослідах Ali A. і Sigard M.A. [4] за додавання фетальної сироватки було збільшення дегенерації хромосом ооцитів, внаслідок чого можливий позитивний вплив сироватки нівелювався. На здатність сироватки викликати дегенерацію хромосом свідчать досліди Johansson B. і Mertens F. [12], в яких додавання сироватки до середовища збільшувало частку клітин з порушеннями хромосом при культивуванні лімфоцитів людини *in vitro*. При цьому тератогенна дія сироватки не залежала від видової специфічності (людська або ВРХ).

Висновки:

1. Додавання сироватки до середовища мейотичного дозрівання у концентрації 5 % посилює ініціацію мейозу і збільшує кількість ооцитів мишей, хромосоми яких сягають стадії метафаза 2.
2. Наявність кумулюсних клітин навколо ооцитів посилює вплив сироватки.
3. Додавання сироватки збільшує частку ооцитів з дегенерованими хромосомами.
4. Додавання сироватки сприяє утворенню моношару кумулюсних клітин, але зменшує легкість їх відокремлення від ооцитів.

Перспектива подальших досліджень. Оскільки остаточний висновок щодо якості процедури мейотичного дозрівання можна зробити за кількістю та якістю отриманих ембріонів, подальші дослідження буде спрямовано на визначення ролі сироватки у формуванні в ооцитах здатності до запліднення та наступного розвитку.

Бібліографічний список

1. Лобачова І. В. Вплив гонадотропінів, естральної сироватки і якості ооцитів овець, корів і свиней на їх дозрівання і запліднення *in vitro*. – Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук: 06.00.20 / І.В. Лобачова. - ІТ УААН, Харків, 1997. - 25 с.
2. Лобачова І.В. Мейотичне дозрівання ооцитів поза організмом: вплив об'єму культурального середовища. / І.В. Лобачова, О.Є. Гузеватий // Передгірне та гірське землеробство і тваринництво. - 2011. – Вип. 53 (I). – С. 142-151.



3. Лобачова І.В. Морфологія ооцит-кумулюсних комплексів як показник умов мейотичного дозрівання. / І.В. Лобачова // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування. – 2012. – № 5(34). – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2012_5/12liv.pdf. - Дата доступу: 01.11.2012.

4. Ali A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. / A. Ali, M.A. Sirard // Biol. Reprod. – 2002. – Vol. 66, Issue 4. – P. 901-905.

5. Biggers J.D. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. / J.D. Biggers, D.G. Whittingham, R.P. Donahue // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1967. – V. 58. – P. 560-567.

6. Choi T.S. Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*. / T.S. Choi, M. Mori, K. Kohmoto, Y. Shoda // J. Repr. Fert. – 1987. – Vol. 79. – P. 565-568.

7. Downs S.M. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro* by preventing hardening of the zona pellucida. / M.S. Downs, A.C. Schroeder, J.J. Eppig // Gamete Research. – 1986. - Vol. 15, Issue 2. – P. 115-122.

8. Edwards R.D. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. / R.D. Edwards // Nature. – 1965. – Vol. 208. – P. 349-351.

9. Eppig J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. / J.J. Eppig // Reprod. Fertil. Dev. – 1996. – Vol. 8, No 4. – P. 485-489.

10. Harris S.E. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. / S.E. Harris, N. Gopichandran, H.M. Picton, H.J. Leese, N.M. Orsi // Theriogenology. – 2005. – V. 64, № 4. – P. 992-1006.

11. Hochi H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. / H. Hochi // Theriogenology. – 2003. – Vol. 59, No. 2. – P. 675-685.

12. Johansson B. Influence of serum concentration on chromosome breakage frequency. / B. Johansson, F. Mertens // Hereditas. – 1986. – Vol. 104. – P. 111-112.

13. Saeki K. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. / K. Saeki, M. Hochi, M.L. Leibfried-Rutledge, N.L. First // Biol. Repr. – 1991. – Vol. 44. – P. 256-260.

14. Serta R.T. The developmental potential of mouse oocytes matured in serum-free culture conditions. / R.T. Serta, J. Michalopoulos, M.M. Seibel, A.A. Kiessling // Hum. Reprod. – 1995. - Vol. 10, Issue 7. – P. 1810-1815.

15. Tervit H.R. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. / H.R. Tervit, D.G. Whittingham, L.E.A. Rowson // J. Reprod. Fert. – 1972. – Vol. 30. – P. 493-497.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СЫВОРОТКИ НА МЕЙОТИЧЕСКОЕ СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ МЫШЕЙ *IN VITRO*

Лобачева И.В., Институт животноводства степных районов имени М.Ф. Иванова «Аскания-Нова» - ННСГЦО, Украина

Изучено влияние добавления до среды SOF сыворотки в отдельности или совместно с пируватом или лактатом на мейотическое созревание ооцитов мышей *in vitro*. Добавление сыворотки способствовало созреванию до стадии метафаза 2 80,84±3,83 % ооцитов с кумулюсом, но 61,64±10,20 % оголенных ооцитов остались на стадии диплолены. Дополнительное внесение лактата усилило инициацию мейоза в оголенных ооцитах, но почти не повлияло на развитие ооцитов в кумулюсе. Совместное введение в среду сыворотки и пирувата способствовало мейотическому



созреванию $66,63 \pm 18,00$ % ооцитов с кумулюсом и $47,94 \pm 6,03$ % оголенных, что почти не отличалось от варианта с добавлением только пирувата. При всех вариантах дополнение среды сывороткой усиливало разрастание и экспансию кумулюса, но при совместном с лактатом добавлении ухудшало легкость отделения кумулюса от ооцитов. Введение сыворотки в состав среды увеличивало долю ооцитов с дегенерированными хромосомами, что свидетельствует о необходимости дополнительного изучения целесообразности ее использования в системе получения эмбрионов *in vitro*.

Ключевые слова: ооцит, культивирование *in vitro*, мейотическое созревание, сыворотка, лактат, пируват.

FEATURES OF SERUM INFLUENCE ON MOUSE OOCYTE MEIOTIC MATURATION IN VITRO

I.V. Lobachova, Institute of Animal Breeding in Steppe Regions named by M.Ph. Ivanov «Ascania-Nova», Ukraine

The effects of serum addition to SOF medium particularly or with Pyruvic acid or lactate on mouse oocyte meiotic maturation in vitro, were studied. Addition of serum promoted maturation to metaphase 2 80.84 ± 3.83 % oocytes with cumulus but 61.64 ± 10.20 % denuded oocytes remained on diplotene stage. Supplemental addition of lactate increased the meiosis initiation in denuded oocytes but almost didn't effect on development of oocytes in cumulus. Addition to medium both serum and pyruvate promoted to meiotic maturation of 66.63 ± 18.00 % oocytes with cumulus and 47.94 ± 6.03 % denuded oocytes, that almost didn't differ from variant with only pyruvate addition. For all variants serum addition to medium increased the growth and expansion of cumulus but in supplemental addition of lactate degraded the ease of cumulus separation. Serum addition increased the quantity of oocytes with degenerated chromosomes, that indicates on requirement for additional study of expediency of serum use in system of embryos production in vitro.

Keywords: oocyte, culture in vitro, meiotic maturation, serum, lactate, pyruvate.

УДК 612.616:544.726:591.46

ІОНИ СОЛЕЙ ЛУЖНИХ МЕТАЛІВ ТКАНИН СИСТЕМИ ORGANA GENITALIA MASCULINA

Максим'юк В. М., к.б.н., Левицька Л. Г., к.с.-г.н.,
Інститут сільського господарства Карпатського регіону
Сушко О. Б., к.с.-г.н., Савельєва М.С., н.с.
Інститут тваринництва НААН
Максим'юк Г. В., к.б.н.

Львівський національний медичний університет імені Д. Галицького

У паренхімних, епітеліальних, м'язових, опорнотрофічних тканинах статевих органів бугая методом полуменевої фотометрії визначили широкі ліміти концентрації $Ca^{2+} - 4 - 14$, $K^+ - 40 - 194$, $Na^+ - 109 - 341$ мМ і співвідношень $Na^+ : Ca^{2+} - 13 - 39:1$, $K^+ : Ca^{2+} - 4 - 23:1$, $Na^+ : K^+ - 1 - 5:1$. Припустили, що неоднакові (низькі, середні, високі) концентрації й співвідношення створюють відповідні умови рівноваги (баланс, гомеостаз) іонів за яких формується повноцінність структури й функцій сперматозоїдів в яєчках; відбувається виділення секретів спермальної плазми з придат-