

ФІЗІОЛОГІЯ

УДК 57

Н.О. Корчан, П.В. Денисюк

РОЗВИТОК ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ (ОКК) IN VITRO ЗА ОСЦИЛЮЮЧОЇ ТЕМПЕРАТУРИ

Інститут свинарства ім. О.В.Квасницького НААН України (Полтава)

Дана робота є фрагментом наукової теми «Розробити і впровадити новітні способи технології штучного осіменіння свиней та трансплантації ембріонів в умовах промислової технології», № держ.реєстрації 0106 У 004221.

Вступ. Добре відомо, що розвиток живого залежить як від генетичної програми, так і від умов зовнішнього середовища, які можуть або сприяти її реалізації, або не сприяти. А відтак, маніпулювання умовами середовища можна досягти покращення росту – розвитку біологічного об'єкта, посприяти вилученню його (ре)продуктивного потенціалу.

При аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми було виявлено що, у всьому світі, як на практиці, так і, особливо, у наукових дослідженнях, широко використовують так звані постійні умови. Їх створюють певною стабілізацією умов зовнішнього середовища, усвідомлено, чи ні, керуючись парадигмою стабільності.

Разом з тим, відомо ряд досліджень, які вказують на те, що умови середовища, величини параметрів яких змінюються за синусоїдою, - осцилюючі умови, - можуть бути кориснішими для росту-розвитку живого за постійні, особливо тоді, коли останні надмірно стабілізують. Ще в 1964 році Шноль писав, що „... тваринники, ..., фізіологи і біохіміки повинні змінити своє відношення до „ постійних “ умов – безперервне освітлення і постійна температура аж ніяк не є нормальними умовами “ [4]. Надмірно постійні умови середовища не можуть бути корисними.

Показано, що осцилюючі умови можуть бути корисними для розвитку мікроорганізмів, ракоподібних, рослин, риб, птахів та ссавців.

Осцилюючі умови середовища поки що обмежено використовуються за культивування гамет, клітин та доімплантаційних ембріонів in vitro.

Існують роботи, в яких показано, що ембріони миші розвиваються краще, якщо підтримувати осциляцію концентрації іонів кальцію, яка виникає після входження спермія в ооцит [5]. Показано, також, що ембріони свині розвиваються in vitro від 1 – 4-клітинної стадії до бластоцисти краще за осцилюючого рН ніж за стабільного [2, 3].

До цього часу не існувало робіт, у яких було б досліджено розвиток in vitro ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) за осцилюючої температури.

Метою дослідження було вивчення розвитку in vitro ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) за осцилюючої температури.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом досліджень були ОКК, які отримували з фолікул яєчників, вилучених з убитих на м'ясокомбінаті свиней. Усього було проведено 13 культур, прокультивовано 185 ОКК.

Усі дослідження проведені в лабораторії фізіології інституту свинарства ім. О.В.Квасницького УААН.

У зв'язку з тим, що ОКК свині культивують протягом лише 40 – 48 годин, вирішили дослідити вплив на їх розвиток температури, осцилюючої з одногодинним періодом, з яким, як відомо, відбувається синтез білка в клітинах [1]. Через те, що біоритми розвитку ОКК свині нам не відомі, вирішили застосувати ритм, який циклічно змінювався від 30 хв. до 90 хв. з 12-годинним періодом так, що у середньому він складав одну годину. З метою створення такого ритму осциляції температури переобладнали сухоповітряний термостат ТС-80 у термоосцилятор. А саме, уклали в нього до 30 л води у пластикових пляшках і запрограмували його вмикання – вимикання за допомогою таймерів фірм Brilux та Feron. Про динаміку зміни температури в камері з ОКК судили з такої в паралельній камері, зі вставленим у неї термометром, який пронизує стінки камери термоосцилятора, і за показами якого можна спостерігати у будь-який час. Амплітуду осциляції величини температури змінювали, змінюючи об'єм води у термоосциляторі. У іншому термостаті ТС-80 температура підтримувалася стабільною від 38,9°C до 39,0°C. ОКК культивували в середовищі NCSU, яке готували власноручно за літературними прописами з реагентів фірми Sigma. ОКК культивували за стабільного рН, який створювали задуванням у газову камеру, - 100 мл медичний градуйований флакон з широким горлом, - суміші вуглекислого газу з повітрям, що давала стабільний рН навколо 7,4. Розвиток ОКК оцінювали за зміною величини його діаметра в резуль-

таті культивування протягом однієї доби. Діаметр ОКК вимірювали до та після культивування за допомогою окуляр-мікрометра бінокулярного мікроскопа МБС – 9. Біометричну обробку здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Statistic та Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Було знайдено, що розподіл величин початкових (до культивування) та кінцевих (через добу культивування) діаметрів ОКК апроксимується кривою нормального розподілу. А тому, дані розподіли можна описувати середнім арифметичним та його похибкою і можна проводити порівняння середніх за допомогою критерію Ст'юдента. За результатами культивування було виявлено, що: 1) успішний приріст діаметра ОКК мав місце у досить широкому діапазоні осциляції температури,

- від 36°C до 39°C; 2) чим більшими були початкові розміри ОКК, тим більшими вони мали тенденцію ставати за стабільної температури ($r = 0,48$; $p = 0,098$), тим більшими вони ставали через добу культивування за осцилюючої температури ($r = 0,94$; $p < 0,05$); 3) кінцевий діаметр ОКК, через добу культивування за осцилюючої температури, мав тенденцію негативно і недостовірно корелювати ($r = - 0,26$; $p = 0,4$) з шириною діапазону її зміни (розмахом, або подвійною амплітудою).

4) Збільшення діаметра ОКК під час їх дозрівання в культурі *in vitro* протягом доби, за осциляції температури в діапазоні від 36°C до 39°C, одночасно з одно- та 12-годинним періодами, достовірно не відрізнялося від такого, яке мало місце за стабільної температури 38,9 – 39,0°C (табл.).

Таблиця

Микрофлора полости рта (lg КОЕ/мл) и видовой состав бактериальной загрязнённости индивидуальных зубодесневых предохранителей

№ п/п	Температура культивування							
	стабільна				осцилююча			
	n	Діаметр, одиниць, M±m		Приріст,%	n	Діаметр, одиниць, M±m		Приріст,%
початк		кінцевий	початк			кінцевий		
1	25	16,4 0,98	25,5 2,18	55,49	15	16,0 0,71	26,6 2,41	66,25
2	15	14,4 0,22	26,53 1,93	84,24	15	15,27 0,63	22,33 1,72	46,23
3	15	14,67 0,58	28,73 2,34	95,84**	15	14,73 0,50	21,00 1,53	42,57
4	15	16,53 0,55	32,33 1,11	95,58	14	15,57 0,57	29,36 1,13	88,57
5	15	16,4 0,82	23,0 1,36	40,24	15	15,47 0,73	26,27 1,37	69,81
6	11	15,91 1,95	24,9 3,78	56,51	12	13,33 0,62	23,0 1,97	75,54
7	15	15,6 0,46	28,13 1,58	80,32	15	17,0 1,23	32,4 1,85	90,59
8	11	12,82 0,44	18,42 2,29	43,68	12	11,42 0,45	15,67 1,40	37,22
9	14	13,93 1,21	22,21 2,33	59,44	15	13,87 0,41	22 1,63	58,62
10	10	13,2 0,47	15,9 1,23	20,45	10	13,1 0,46	16,4 1,78	25,19
11	14	14,5 0,46	22,92 1,45	58,07	14	14,5 0,63	21,54 1,57	48,55
12	15	18,67 1,30	35,53 2,43	90,31	15	19,73 1,69	44,6 3,67	126,1
13	10	16,3 0,85	28,1 2,36	72,39	10	14,3 0,79	20,9 2,15	46,15
M±m	185	15,48 0,26	25,92 0,66	67,44	177	15,10 0,26	25,32 0,76	67,68

Примітка: ** - $p < 0,01$. Напівжирним шрифтом виділені ті значення приросту діаметра ОКК, за якими один із варіантів культивування, досліду або контролю, переважав другий, але не достовірно, якщо значення не позначено зірочками.

5) У 4 культурах із 13 процент приросту діаметра ОКК був більший за осцилюючої температури, ніж за стабільної, але різниця не достовірна;

6) У 3 культурах процент приросту діаметра ОКК був більший за стабільної температури, ніж за осцилюючої, але різниця була достовірною ($p < 0,01$) лише в одному випадку.

Імовірними причинами того, що не виявлено очікуваного кращого впливу осцилюючої температури у порівнянні зі впливом стабільної можуть бути такі: 1) мала тривалість культивування, - протягом усього однієї доби; 2) застосування такого ритму зміни температури, який не є резонансним щодо ритму росту-розвитку ОКК; 3) застосування не оптимальної амплітуди осциляції температури.

Висновки. Збільшення діаметра ОКК під час їх дозрівання в культурі *in vitro* за осциляції температури в діапазоні від 36°C до 39°C, одночасно з одно- та 12-годинним періодами, достовірно не відрізняється від такого, яке має місце за стабільної температури 38,9 – 39,0°C. А отже осцилюючі умови середовища можуть бути, щонайменше, не гіршими за стабільні.

Перспективи подальших досліджень. Якщо стане відомим біоритм розвитку ОКК *in vivo* та з'явиться можливість отримувати ембріони *in*

vitro, сприятливий вплив осцилюючої температури адекватнішої (природі біологічного об'єкта) характеристики може стати значно виразнішим. Уважаємо за корисне вивчити вплив осцилюючої температури (як з одно-, так і з 24-годинним періодами) на розвиток *in vitro* доімплантаційних ембріонів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бродский В. Я. Околочасовые биологические ритмы. Распространение, природа, значение, связи с циркадианной ритмикой / В. Я. Бродский // Хронобиология и хрономедицина; ред. Комаров Ф. И., Рапопорт С. И. – 2000. – С. 91-101.
2. Денисюк П. В., Мартыненко Н. А. Принципиально новый метод культивирования доимплантационных эмбрионов млекопитающих // Доповіді Нац. АН України. - 1995. - № 11. - С. 148 - 149.
3. Денисюк П. В. Вплив рН середовища на розвиток *in vitro* доімплантаційних ембріонів свині: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.13 „Фізіологія людини і тварин“ / П. В. Денисюк. - Харків, 1997. - 25 с.
4. Шноль С. Э. Предисловие к русскому изданию / С. Э. Шноль // Биологические часы. – Москва: Мир, 1964. – С. 5 – 10.
5. Ozil J. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation / J. Ozil // Development. – 1990. – V. 109. – P. 117 – 127.

УДК 57

РОЗВИТОК ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ (ОКК) IN VITRO ЗА ОСЦИЛЮЮЧОЇ ТЕМПЕРАТУРИ

Корчан Н.О., Денисюк П.В.

Резюме. Показано, що збільшення діаметра ОКК під час їх дозрівання в культурі *in vitro* протягом доби, за осциляції температури в діапазоні від 36°C до 39°C, одночасно з одно- та 12-годинним періодами, достовірно не відрізняється від такого, яке має місце за стабільної температури 38,9 – 39,0°C.

Ключові слова: ооцит, біоритм, температура, культивування *in vitro*, осциляція.

УДК 57

РАЗВИТИЕ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ (ОКК) IN VITRO ПРИ ОСЦИЛЛИРУЮЩЕЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Корчан Н.А., Денисюк П.В.

Резюме. Показано, что увеличение диаметра ОКК во время их созревания в культуре *in vitro* в течение суток, при осцилляции температуры в диапазоне 36 - 39°C, одновременно с одно- и 12-часовым периодами, достоверно не отличается от такого, какое имеет место при стабильной температуре 38,9 – 39,0°C.

Ключевые слова: ооцит, биоритм, температура, культивирование *in vitro*, осцилляция.

UDC 57

DEVELOPMENT of OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES (OCC) in vitro at OSCILLATING TEMPERATURE

Korchan N. O., Denysyuk P.V.

Summary. It is found that increasing in diameter of cumulus oocyte complexes during their maturation in *in vitro* culture for 24 hours at temperature oscillation in the range of 36 – 39°C, simultaneously with one and 12 hour periods, is not differ significantly from one that takes place at stable temperature 38,9 – 39,0°C.

Key words: oocyte, biorhythm, temperature, *in vitro* culture, oscillation.

Стаття надійшла 10.02.2011 р.