

**РОЗВИТОК ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ (ОКК) IN VITRO ЗА
ОСЦИЛЮЮЧОГО pH****Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН України (м. Полтава)**

Дана робота є фрагментом наукової теми «Визначити закономірності впливу біоритмічних змін умов середовища на дозрівання ооцитів свині in vitro», № державної реєстрації 0111U004038.

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, створенням умов зовнішнього середовища, більш адекватних природі живого, можна досягти покращення його росту-розвитку, посприяти вилученню його (ре)продуктивного потенціалу.

У результаті аналізу останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми, було виявлено, що в усьому світі, як на практиці, так і, особливо, у наукових дослідженнях, широко використовують так звані постійні умови. Їх створюють стабілізацією умов зовнішнього середовища, усвідомлено, чи ні, керуючись парадигмою стабільності. Причому, постійність умов середовища намагаються стабілізувати щосили.

Але, давно існує й протилежна точка зору, за якою «... тваринники, ..., фізіологи й біохіміки повинні змінити своє відношення до «постійних» умов – безперервне освітлення й постійна температура аж ніяк не є нормальними умовами» [6]. Надмірно постійні умови середовища не можуть бути корисними. 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. Показано, що біоритмічно 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 доїмплантаційних 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 [9]. Показано, також, що ембріони свині розвиваються in vitro від 1 – 4-клітинної стадії до бластоцисти краще за осцилюючого pH ніж за постійного [2, 4].

До цього часу не існувало робіт, у яких було б досліджено розвиток in vitro ОКК за осцилюючого pH.

Метою дослідження було вивчення розвитку ОКК in vitro за біоритмічно осцилюючого pH.

Об'єкт і методи дослідження. У якості об'єкта дослідження були вибрані ОКК. Такий вибір обумовлений необхідністю збільшення кількості та

покращення якості дозрівання in vitro ооцитів (у вигляді ОКК), з яких у подальшому in vitro отримують ембріони. Останні у великій кількості використовують для багатьох наукових та практичних цілей. ОКК свині культивують протягом лише 40–48 годин. Методика культивування деякої множини ОКК дає змогу оцінити розростання кумулюсу протягом перших 24 год цього процесу. На скільки нам відомо, на сьогодні існує лише одна методика створення біоритмічної осциляції pH середовища культивування об'єктів, сумірних з ОКК, яка передбачає використання осциляторної зміни pH з добовим періодом [3-5]. А тому, вирішили дослідити вплив саме такої зміни pH середовища дозрівання ОКК на міру їх розростання. Останнє відбувається за рахунок збільшення кількості клітин кумулюсу та міжклітинного матриксу.

З убитих на м'ясокомбінаті свиней вилучали яєчники й доставляли їх у лабораторію, де з фолікул отримували ОКК. Дозрівання ОКК проводили в середовищі NCSU, яке готували власноручно за літературними прописами з реагентів фірми Sigma. До нього додавали 10 % фолікулярної рідини, 10 МО/мл хоріонічного гонадотропіну людини, 10 МО/мл хоріонічного гонадотропіну коня, 0,57 ммоль цистеаміну та 20 мкг/мл гентаміцину сульфату.

Культивування за постійних pH і температури здійснювали фактично за методикою [7]. Чашки з ОКК або з ооцитами або з ембріонами, у відповідному середовищі, вкладали в газові камери, – 100 мл медичні градуйовані флакони з широким горлом, – продували газовою сумішшю вуглекислого газу з повітрям, що давала постійний pH навколо 7,4, й герметично закупорювали. Величину pH середовища контролювали шляхом його вимірювання в паралельних камерах, які не містили ОКК та ембріонів. Для цього відбирали аліквоту середовища й міряли pH-метром його pH.

Осциляцію pH з добовим періодом створювали за методом [3-5]. Для цього використовували спеціально сконструйовані газові камери – алюмінієві бюкси з напівпроникними для газів трубками із силіконової гуми. ОКК переносили у скляні камери з середовищем дозрівання, на яке попередньо нашарувували вазелінову олію. Ці камери вкладали в газові камери. Останні продували сумішшю вуглекислого газу з повітрям, яка надавала середовищу мінімальний pH у 7,2 одиниці. Через добу pH середовища ставав значно більш лужним завдяки виходу вуглекислого газу із середовища, а потім – і з газової камери по градієнту його концентрації.

БІОЛОГІЯ

Таблиця

Порівняння приросту діаметра ОКК у середовищі NCSU з 10 % ФР за постійного та осцилюючого рН

| № з/п | рН культивування | | | | | | | | | | |
|-------|------------------|-------------------------|----------------------|---------------|-----------------------------|------------|-------------------------|---------------|---------------|-----------------------------|-----------------|
| | постійний | | | | | осцилюючий | | | | | |
| | n | діаметр, М±m одиниць | | приріст, % | | n | діаметр, М±m одиниць | | приріст, % | | ΔрН, одиниць |
| | | почат. | кінцев. | відносний | За Броді | | почат. | кінцев. | відносний | за Броді | |
| 1 | 25 | 16,4 0,98 | 25,5* 2,18 | 55,49 | 43,44 | 10 | 16,50 0,76 | 20,40 1,39 | 23,64 | 21,14 | 0,98 |
| 2 | 15 | 14,4 0,22 | 26,53 1,93 | 84,24 | 59,27 | 15 | 15,40 0,75 | 28,13 1,92 | 82,66 | 58,49 | 0,96 |
| 3 | 15 | 14,67 0,58 | 28,73 2,34 | 95,84 | 64,79 | 15 | 15,00 0,45 | 26,07 1,21 | 73,80 | 53,91 | 1,02 |
| 4 | 15 | 16,53 0,55 | 32,33 1,11 | 95,58 | 64,67 | 15 | 15,20 0,37 | 25,00 1,47 | 64,47 | 48,76 | 0,78 |
| 5 | 15 | 16,4 0,82 | 23,0 1,36 | 40,24 | 33,50 | 15 | 15,33 0,53 | 23,19 1,68 | 51,27 | 40,81 | 1,0 |
| 6 | 11 | 15,91 1,95 | 24,9 3,78 | 56,51 | 44,06 | 10 | 14,20 1,08 | 23,9 2,50 | 68,31 | 50,92 | 0,75 |
| 7 | 15 | 15,6 0,46 | 28,13 1,58 | 80,32 | 57,31 | 16 | 14,94 0,26 | 28,13 0,99 | 88,29 | 61,25 | 0,60 |
| 8 | 11 | 12,82 0,44 | 18,42 2,29 | 43,68 | 35,85 | 12 | 12,42 0,30 | 17,50 2,44 | 40,90 | 33,96 | 1,35 |
| 9 | 14 | 13,93 1,21 | 22,21 2,33 | 59,44 | 45,82 | 15 | 14,27 0,58 | 18,93 1,56 | 32,66 | 28,07 | 1,35 |
| 10 | 10 | 13,2 0,47 | 15,9 1,23 | 20,45 | 18,56 | 10 | 11,60 0,23 | 14,80 0,87 | 27,59 | 24,24 | 1,13 |
| 11 | 14 | 14,5 0,46 | 22,92 1,45 | 58,07 | 45,00 | 14 | 15,71 0,72 | 28,43 2,26 | 80,97 | 57,63 | 0,41 |
| 12 | 15 | 18,67 1,30 | 35,53 2,43 | 90,31 | 62,21 | 16 | 21,75 1,67 | 38,88 2,79 | 78,76 | 56,51 | 0,25 |
| 13 | 10 | 16,3 0,85 | 28,1 2,36 | 72,39 | 53,15 | 10 | 15,90 1,01 | 23,30 2,16 | 46,54 | 37,76 | 0,65 |
| M±m | | 15,48 0,26 | 25,92 0,66 | 65,58 6,71 | <u>48,28</u> <u>3,98</u> | | 15,41 0,27 | 24,98 0,66 | 58,45 6,51 | <u>44,11</u> <u>4,03</u> | 0,86 |
| Cv | | 23,13 | 34,45 | 35,42 | 28,52 | | 23,29 | 35,14 | 38,56 | 31,63 | |

Примітка: * – p < 0,05. 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.

Стабільність постійної температури в діапазоні від 38,9°C до 39,0°C забезпечували за допомогою термостату ТС-80.

Розвиток ОКК оцінювали за зміною величини його діаметра в результаті культивування протягом однієї доби. Діаметр ОКК вимірювали до та після культивування за допомогою окуляр-мікрометра бінокулярного мікроскопа МБС-9. Вираховували величину відносного приросту, у процентах, за формулою: $100 \cdot \frac{(M2 - M1)}{M1}$, та величину приросту за формулою Броді [8], теж у процентах: $2 \cdot \frac{(M2 - M1)}{[(M2 + M1)]}$, де M1 – діаметр ОКК до культивування, а M2 – діаметр ОКК через добу від початку культивування.

Биометричну обробку здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Excel та STATISTICA.

Усі дослідження проведені в лабораторії фізіології інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН України.

Результати досліджень та їх обговорення. Усього було проведено 13 культур, прокультивовано 358 ОКК.

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, й можна проводити порівняння середніх за допомогою критерію Ст'юдента.

За результатами культивування було виявлено, що:

1) приріст діаметра ОКК мав місце у досить широкому діапазоні осциляції рН, – від 7,20 одиниці до 8,55 одиниці ($7,2 - 8,06 \pm 0,1$);

2) збільшення діаметра ОКК під час їх дозрівання в культурі *in vitro* протягом доби, за осциляції рН у цьому діапазоні з 24-годинним періодом ($44,11 \pm 4,03$ % за формулою Броді), достовірно не відрізнялося від такого, яке мало місце за постійного рН у $7,42 \pm 0,04$ одиниці ($48,28 \pm 3,98$ % за формулою Броді);

3) у 7 культурах із 13 процент приросту діаметра ОКК був більший за постійного рН ніж за осцилюючого, але різниця виявилася достовірною ($p < 0,05$) лише в одній (3-ій) культурі;

4) у 6 культурах із 13 процент приросту діаметра ОКК був більший за осцилюючого рН ніж за постійного, але різниця виявилася не достовірною.

5) чим більшими були початкові розміри ОКК, тим більшими вони мали тенденцію ставати за постійних умов ($r = 0,48$; $p = 0,098$), тим більшими вони ставали через добу культивування за осцилюючого рН ($r = 0,86$; $p < 0,0002$);

6) кінцевий діаметр ОКК, через добу культивування за осцилюючого рН, негативно корелював ($r = -0,82$; $p = 0,0005$) з шириною діапазону його зміни (розмахом, або подвійною амплітудою).

7) Уплив осцилюючого рН на збільшення діаметра ОКК в культурі *in vitro* більше урізноманітнює кінцеві розміри ОКК ($C_v = 31,63$) ніж вплив постійного рН ($C_v = 28,52$) (**табл.**).

Імовірними причинами того, що не виявлено очікуваного кращого впливу осцилюючого рН у порівнянні зі впливом постійного можуть бути такі: 1) мала тривалість культивування, – протягом усього однієї доби; 2) застосування досить великого періоду біоритму зміни рН, – бажано б у майбутньому випробувати одногодинний ритм осциляції рН; 3) застосування неоптимальної амплітуди біоритмічної осциляції рН у деяких культурах цього пошукового дослідження; 4) використання середовища, розробленого для культивування саме в постійних умовах, – потрібно розробити середовище для культивування в осцилюючих умовах.

Висновки. Збільшення діаметра ОКК під час їх дозрівання в культурі *in vitro* протягом доби, за осциляції рН в діапазоні від 7,2 одиниці до $8,06 \pm 0,1$ одиниці з 24-годинним періодом, достовірно не відрізняється від такого, яке має місце за постійного рН у $7,42 \pm 0,04$ одиниці. А отже, біоритмічно осцилюючі умови середовища можуть бути, щонайменше, не гіршими за постійні.

Перспективи подальших досліджень. Використання осциляції рН з найбільш оптимальною амплітудою, з біоритмом, меншим за добовий (циркахоральним, або навколо одногодинним) та ще й довше ніж протягом доби культивування, покращить кількісні та якісні показники дозрівання ОКК *in vitro*, запліднення дозрілих ооцитів та розвитку отриманих з них 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. Принципиально новый метод культивирования доимплантационных эмбрионов млекопитающих / П.В. Денисюк, Н.А. Мартыненко // Доповіді Нац. АН України. – 1995. – № 11. – С. 148 - 149.
3. Денисюк П.В. Способ культивирования доимплантационных эмбрионов савців поза організмом. Патент України № 10067 А, клас С 12 N.5/00 з пріоритетом від 23.04.1993 // Бюл. № 3, 30.09.1996.
4. Денисюк П.В. Вплив рН середовища на розвиток *in vitro* доимплантационних 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.
5. Денисюк П.В. Способ примусової осциляції рН середовища культивування біологічних мікрооб'єктів. Деклараційний патент України на винахід, № 46186 А, клас 6А 61М 1/14 С/12 5/06 з пріоритетом від 17.09.1998 // Бюл. № 5. – 15.05.2002.
6. Шноль С.Э. Предисловие к русскому изданию / С.Э. Шноль // Биологические часы. – Москва: Мир, 1964. – С. 5 – 10.
7. Brinster R.L. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst / R.L. Brinster // Exp. Cell Res. - 1963. - 32. - P. 205 - 208.

8. Brody S. Bioenergetics and growth. With special reference to the efficiency complex in domestic animals / S. Brody. - N.Y.; Hafner. - 1945. - 1023 p.
9. 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 ОСЦИЛЮЮЧОГО PH

Корчан Н.О., Денисюк П.В.

Резюме. Показано, що збільшення діаметра ОКК під час їх дозрівання в культурі in vitro протягом доби, за осциляції рН в діапазоні від 7,2 одиниці до $8,06 \pm 0,1$ одиниці з 24-годинним періодом, достовірно не відрізняється від такого, яке має місце за постійного рН у $7,42 \pm 0,04$ одиниці. А отже, біоритмічно осцилюючі умови середовища в даному випадку можуть бути, щонайменше, не гіршими за постійні умови.

Ключові слова: свиня, ооцит, біоритм, рН, культивування, in vitro, осциляція.

УДК 57

РАЗВИТИЕ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ (ОКК) IN VITRO ПРИ ОСЦИЛЛИРУЮЩЕМ PH

Корчан Н.А., Денисюк П.В.

Резюме. Показано, что увеличение диаметра ОКК во время их дозревания в культуре in vitro в течение суток, при осцилляции рН в диапазоне $7,2 - 8,06 \pm 0,1$ единицы с 24-часовым периодом, достоверно не отличается от такого, которое имеет место при постоянном рН в $7,42 \pm 0,04$ единицы. Следовательно, биоритмично осциллирующие условия в данном случае могут быть, как минимум, не хуже постоянных условий.

Ключевые слова: свинья, ооцит, биоритм, рН, культивирование, in vitro, осцилляция.

UDC 57

Development Of Oocyte-Cumulus Complexes (Ooc) In Vitro At Oscillating pH

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 pH oscillated in the range of $7.2 - 8,06 \pm 0,1$ units with 24 hour periods, is not differ significantly from one that takes place at stable pH of $7,42 \pm 0,04$. Therefore, biorhythmically oscillating conditions can be in this case at least not worse than constant ones.

Key words: pig, oocyte, biorhythm, pH, in vitro culture, oscillation.

Стаття надійшла 16.02.2012 р.