

вання і созрівання половых кліток. Генетическая обслловлена унікальністю наследственной інформації в пределах генотипа, что єсть следствием процесов кроссинговера, котрыє мають место во время мейотического созрівання гамет. Физиологическая компонента характеризується як уровень текущих физиологических процесов в гамете, котрыє обуславливаются разными причинами. Сделано вывод, что биологическая разнокачественность гамет является важным понятием, котрое может содержать разнообразную характеристику гаметы. Ключевые слова: гамета, разнокачественность, сперматозоид, яйцеклетка.

**V.O. Lobchenko.** Some aspects of various biological quality of gametes. Consideration of biological essence of various biological qualities of gametes concept are presented. The premises, that may necessitate various quality of gametes as somatic, genetic and physiological are analyzed. To somatic ones are belonged morphological, linear, volumetric and other gamete differences that are necessitated by the features of gamete formation and maturation. Genetic one is given by the hereditary unique in genotype area that is a result of crossing-over that take place during gamete meiotic process. Physiological ones are characterized as a level of a current physiological process in gamete stimulated by different reasons. The conclusion was made that various biological qualities of gametes are an important concept that includes versatile gamete features. Key words: gamete, various biological quality, spermatozoa, egg.

УДК 636.4.612

**Лобченко С.Ф.**, молодший науковий співробітник  
**Волошук В.М.**, доктор сільськогосподарських наук  
**Лобченко В.О.**, кандидат біологічних наук  
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

## ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ДОДАТКОВОЇ КІЛЬКОСТІ КАТІОНІВ КАЛЬЦІУ У СЕРЕДОВИЩІ НА ЖИТТЄВІСТЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРА ПОЗА ОРГАНІЗМОМ

Рецензент – кандидат біологічних наук *К.Ф. Почерняєв*

Досліджували вплив додаткової кількості катіонів кальцію, як важливого чинника підготовки сперматозоїдів кнура до запліднення поза організмом на їх життєвість в середовищі інкубування. Встановлено, що лактат кальцію істотно не змінює життєвість сперматозоїдів за концентрації від 2 ммоль до 16,2 ммоль. Надвисокі концентрації  $Ca^{2+}$  (вище 22,7 ммоль) спричинювали помітне зниження життєвості сперматозоїдів. Зразки сперми, що були відмиті від плазми, істотно втрачали життєвість як у контрольних зразках, так і з додавання  $Ca^{2+}$ . Зроблено висновок, що сперматозоїди кнура задовільно зберігають життєвість у середовищах, що містять високу концентрацію катіонів кальцію. Такі кількості  $Ca^{2+}$  можуть використовуватися для підготовки сперматозоїдів до запліднення поза організмом.

*Ключові слова: життєвість, кальцій, капацитація, лактат, поза організмом, сперматозоїд, хлорид*

**Постановка проблеми.** Свинарство забезпечує значну частину енергетичного та протеїнового харчового продукту для людства. Однак, такі важливі сучасні репродуктивні технології як дозрівання та запліднення ооцитів поза організмом, культивування ембріонів, кріоконсервація гамет і ембріонів, не досягли такого рівня, щоб бути використаними у виробничих процесах [5]. Зокрема, не розроблена технологія одержання повноцінних ембріонів із дозрілих та запліднених *in vitro* ооцитів, де одним із важливих процесів є підготовка сперматозоїдів до запліднення.

Така підготовка має містити процедури, що забезпечують щонайменше капацитацію та високу життєвість сперматозоїдів, як ступінь їх життєздатності в конкретних умовах, здатність проникати у яйце за мінімального рівня поліспермії та формувати чоловічий пронуклеус.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Вважається, що популяція капацитованих сперматозоїдів повинна мати достатню життєвість щонайменше впродовж 2,5 год після проведення процедури капацитації задля забезпечення можливості безпосереднього контакту з ооцитами, що запліднюються [4]. При втраті рухливості сперматозоїдів раніше зазначеного терміну, розраховувати на запліднення не варто. У зв'язку з цим, стає важливим визначення життєвості сперматозоїдів кнура в умовах присутності у середовищі для запліднення спеціальних факторів, що сприяють цьому процесові. Зокрема, таким фактором є катіон кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Показано [3, 7, 9], що концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі запліднення, яке забезпечує рівень пенетрування яйцеклітин більше ніж 50 % була від 1,72 ммоль до 8,76 ммоль. Разом із тим вважається, що концентрація кальцію в спермі кнура складає 22,16 ммоль [1]. Відзначають також, що акросомна реакція, яка тісно пов'язана із заплідненням, у ссавців повністю залежить від присутності позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , а зміни в проникності цих катіонів є одним із головних сигналів до індукування акросомної реакції [6, 8]. Застосовуючи лактат кальцію для обробки еякульованих сперматозоїдів у середовищі 199 одержано високий рівень пенетрації овульованих ооцитів – 89 % [2].

**Мета досліджень і методика їх проведення.** Метою цього дослідження було визначення життєвості сперматозоїдів кнура за різних способів підготовки та інкубування в середовищі при температурі 38°C, що містить додаткову кількість  $\text{Ca}^{2+}$ .

Для досліджень використовували зразки сперми, які відбирали від кнурів, що належали станції штучного осіменіння Інституту свинарства і АПВ НААН. Показники рухливості та концентрації статевих клітин визначали після одержання еякуляту візуально з допомогою мікроскопу та фотоелектроколориметром. Відбирали тільки ті зразки еякулятів, які мали показник рухливості сперматозоїдів не нижчий, ніж 80 % та концентрацію не меншу, ніж  $0,2 \times 10^8$  гамет/см<sup>3</sup>. Оцінені зразки еякулятів терміново доставляли в лабораторію та опрацьовували в умовах стерильного боксу. У три флакони відбирали необхідну кількість сперми та розріджували її до концентрації  $0,05 \times 10^8$  гамет/см<sup>3</sup> середовищем 199. У двох флаконах сперму відмивали шляхом центрифугування (центрифуга лабораторна медична ОПн-8) впродовж 5 хвилин за швидкості 3000 об./хв. та замінювали надосадову рідину середовищем 199. Таку процедуру проводили тричі після чого знову один із флаконів розріджували тим же середовищем, а інший з додаванням БСА (з розрахунку 5 мг/мл) до концентрації  $0,05 \times 10^8$  гамет/см<sup>3</sup> та розфасовували у флакони по 1 мл. Після цього формували дослідні інкубаційні флакони, додаючи відповідну кількість лактату кальцію (від 2,0 ммоль до 16,2 ммоль) та хлориду кальцію (від 22,7 ммоль до 113,5 ммоль). Флакони розміщували в теплому ексікаторі, який перебував у термостаті, де температура підтримувалася на рівні 38 °C. Через кожні 2 год впродовж 8 годин від початку дослідження відбирали проби для визначення рухливості сперміїв у зразках. За одержаними даними вираховували показник життєвості сперматозоїдів, що визначався як площа фігури, обмеженої ко-

ординатами рухливості та часу, а також кривою падіння рухливості, поданої в частці від одиниці за формулою:  $S = a_0 + 2a_1 + 2a_2 + 2a_3 + 2a_4$ , де:  $S$  – показник виживання;  $a$  – рухливість сперміїв на відповідний термін її визначення.

В експериментах були досліджені зразки сперми, одержані від 11 кнурів. Отримані дані оброблялись статистично.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Показники життєвості сперматозоїдів, одержані в цих дослідженнях, засвідчили, що зразки сперми, які підлягали відмиванню, мали їх значення істотно нижчими ніж без відмивання. Так, контрольні зразки в дослідженнях із лактатом кальцію мали значення 4,37 од. проти 2,05 од. та 2,11 од., а з хлоридом кальцію відповідно 5,54 од. проти 1,41 од. та 2,44 од. Подібна закономірність спостерігається й в решті експериментальних зразків із різним умістом  $Ca^{2+}$  (табл. 1 та 2). Така закономірність засвідчує високу стабілізуючу роль спермальної плазми.

Лактат кальцію в досліджених концентраціях спричиняв незначне зменшення життєвості сперматозоїдів. Однак, ці значення не відрізнялись достовірно від контрольних як для зразків без відмивання плазми, так і у відмитих від неї (табл. 1). Ці результати показали, що лактат кальцію, при застосуванні його для підготовки сперматозоїдів до запліднення поза організмом чи в середовищах для запліднення в ефективних концентраціях не зменшує життєвість сперматозоїдів.

### 1. Показники життєвості сперматозоїдів кнура за умови інкубування при 38 °С у середовищі з лактатом кальцію (n = 6)

Підготовка сперми	Середовище розрідження	Контроль (без лактату кальцію)	Уміст лактату кальцію (ммоль)			
			2,0	4,0	8,1	16,2
Без відмивання	199	4,37±0,49	4,78±0,60	4,79±0,57	4,52±0,63	4,06±0,58
Відмита	199	2,05*±0,68	1,38±0,30	1,15±0,15	1,17±0,27	0,87±0,01
Відмита	199 із БСА	2,11**±0,34	1,14±0,35	1,70±0,17	1,78±0,39	1,24±0,11

*Примітка: вірогідність різниці в графі “контроль” порівняно зі значенням “без відмивання” (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ )*

У дослідженнях із хлоридом кальцію, що застосовувався у надвисоких концентраціях, виявлено їх значення, які зпчинювали помітне зниження життєвості сперматозоїдів. Так, за концентрації 22,7 ммоль життєвість (5,54 од.) у порівнянні з контролем (4,53 од.) понизилася майже на 20 %, а вже за концентрації 45,4 ммоль достовірно знизилася вже майже на 35 %. У зразках із відмитою спермою вже найменша із досліджуваних концентрацій хлориду кальцію знизилася життєвість до найменших значень. Присутність у середовищі БСА дещо пом’якшувала негативну дію надвисоких концентрацій, але життєвість сперматозоїдів істотно понижувалась (табл. 2).

### 2. Показники життєвості сперматозоїдів кнура за умови інкубування при 38 °С у середовищі 199 із хлоридом кальцію (n = 5)

Підготовка сперми	Середовище розрідження	Контроль (без хлориду кальцію)	Уміст хлориду кальцію (ммоль)			
			22,7	45,4	90,8	113,5
Без відмивання	199	5,54±0,44	4,53±0,49	3,67**±0,33	2,28***±0,40	1,48***±0,31
Відмита	199	1,41***±0,13	0,85**±0,02	0,81**±0,01	0,80**±0,01	0,85**±0,03
Відмита	199 із БСА	2,44***±0,12	1,27***±0,08	1,17***±0,09	0,88***±0,04	0,85***±0,03

*Примітка: вірогідність різниці порівняно з контролем, а в графі “контроль” порівняно зі значенням “без відмивання” (\*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ )*

**Висновки.** Сперматозоїди кнура задовільно зберігають життєвість за умов інкубування при 38 °С у середовищах, що містять додаткову (від 2 ммоль до 22,7 ммоль) кількість катіонів кальцію. Подальше їх збільшення зумовлює істотне зниження життєвості статевих клітин. Середовища з додатковою кількістю  $\text{Ca}^{2+}$  можуть використовуватися для підготовки сперматозоїдів до запліднення поза організмом.

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин / В.А. Яблонський [та ін.]; під заг. ред. В.А. Яблонського, О.І. Сергієнка, Р.С. Стойки – Львів: ТзОВ ВФ Афіша, 2009. – 218 с.: 35 іл.
2. Cheng W. T. K. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes in vivo and in vitro / W. T. K. Cheng, R. M. Moor, C. Polge // *Theriogenology*. – 1986. – 25. – P. 146.
3. Mattioli M. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro / M. Mattioli, G. Bacci, E. Seren // *Theriogenology*. – 1989. – 31. – P. 1201 – 1207.
4. Nagai T. Effect of caffeine on in vitro fertilization of pig follicular oocytes / T. Nagai, K. Miura, K. Kikuchi // *Journal of Reproduction and Development*. – 1993. – 39. – P. 347 – 352.
5. Nagai T. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes // *Animal Reproduction Science*. – 1996. – 42. – P. 153 – 163.
6. Singh J. P. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa / J.P. Singh, D.F. Babcock, H.A. Lardy // *Biochemical Journal*. – 1978. – 172. – P. 549 – 556.
7. Suzuki K. Ejaculated boar spermatozoa can penetrate oocytes matured in culture / K. Suzuki, M. Ebihara, T. Nagai // *Proc. 87<sup>th</sup> Meeting of the Japanese Society for Zootech. Science*. – 1995. – P. 275. Abstr.
8. Yanagimachi R. Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa by detergents and other reagents // *Biology of Reproduction*. – 1975. – 13. – P. 519 – 526.
9. Yoshida M. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro / M. Yoshida, Y. Mizoguchi, K. Ishigaki, // *Theriogenology*. – 1993. – 39. – P. 1303 – 1311.

**Лобченко С. Ф., Волощук В. М., Лобченко В. А.** Исследование действия дополнительного количества катионов кальция в среде на жизнеспособность сперматозоидов хряка вне организма.

*Исследовали воздействие дополнительного количества катионов кальция, как важного элемента подготовки сперматозоидов хряка к оплодотворению вне организма на их жизнеспособность в среде инкубирования. Установлено, что лактат кальция существенно не изменяет жизнеспособность сперматозоидов при концентрации от 2 ммоль до 16,2 ммоль. Сверхвысокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (выше 22,7 ммоль) были причиной заметного падения жизнеспособности сперматозоидов. Образцы спермы, которые были отмыты от плазмы, существенно теряли жизнеспособность как в контрольных образцах так и при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$ . Сделан вывод, что сперматозоиды хряка хорошо сохраняли активность в средах, которые содержали высокую концентрацию катионов кальция. Такие количества кальция могут быть использованы для подготовки сперматозоидов к оплодотворению вне организма.*

*Ключевые слова: вне организма, жизнеспособность, кальций, лактат, капацитация, сперматозоид, хлорид*

**S.F. Lobchenko, V.M. Voloshchuk, V.O. Lobchenko.** The study of additional amount of calcium ion in a medium on viability of boar spermatozoa *in vitro*.

*An additional amount of calcium ion as an important component of a culture medium for in vitro fertilization on viability of boar spermatozoa was studied. It has been determined that calcium lactate does not change significantly spermatozoa viability at the concentration from 2 mM to 16.2 mM. Super high concentrations of Ca<sup>2+</sup> (more than 22.7 mM) generated loss of sperm viability. The samples of sperm that was washed lost greatly their viability in the control samples and in Ca<sup>2+</sup> enriched ones. It was concluded that boar spermatozoa kept their viability satisfactory in the mediums with high Ca<sup>2+</sup> concentration. Such amounts of Ca<sup>2+</sup> are possible to use for spermatozoa preparation for in vitro fertilization.*

*Key words: capacitation, calcium, chloride, in vitro, lactate, spermatozoa, viability*

УДК 636.4: 678.048

**Сварчевська О.З.**, кандидат сільськогосподарських наук  
Інститут біології тварин НААН

## **СТАН ГЛУТАТИОНОВОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПОРΟΣЯТ У ПОСТНАТАЛЬНИЙ ПЕРІОД ОНТОГЕНЕЗУ ЗА ДІЇ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНОЇ ДОБАВКИ**

*Рецензент – кандидат біологічних наук А.М. Шостя*

*У статті наведено дані про вплив біологічно-активної кормової добавки до раціону поросят на вміст відновленого глутатіону, активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази у крові. Дана біологічно-активна кормова добавка включала: сульфат цинку - 100 мг/кг, хлорид хрому - 150 мкг/кг, йодид калію - 0,25 мг/кг, вітамін С - 80 мг/кг комбікорму. Встановлено, що за дії біологічно-активних речовин в крові новонароджених поросят збільшується вміст відновленого глутатіону, активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази. Отримані результати свідчать про стимулюючий вплив біологічно-активної кормової добавки на стан глутатіонової антиоксидантної системи у новонароджених поросят.*

*Ключові слова: антиоксидантна система, кормова добавка, глутатіон.*

**Постановка проблеми.** Ранній постнатальний період у тварин супроводжується стресами і зниженням активності антиоксидантної та імунної систем [1]. Глутатіонова антиоксидантна система ефективно захищає клітини від оксидативного стресу, і зазвичай тільки при її виснаженні виникають серйозні ушкодження [7, 9, 10].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** В літературі є дані про стимулюючий вплив окремих мікроелементів, зокрема хрому, на активність антиоксидантної системи в печінці щурів [5, 11]. Крім цього відомо, що хром у комплексі з цинком виявляє антиоксидантну дію в організмі людей з цукровим діабетом [6, 8]. Однак, мало уваги присвячено дослідженню впливу хрому в комплексі з іншими біологічно-активними речовинами на стан глутатіонової антиоксидантної системи в організмі свиней. Актуальність вивчення цього питання