

7. Watson P. F. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial / P. F. Watson, Behan // Theriogenology. – 2002. – № 57. – P. 1683–1693.

**Мельник В.А.** Внедрение внутриматочного осеменения свиноматок в условиях племзавода

*В статье приведены результаты внедрения инновационных репродуктивных технологий в свиноводстве для повышения воспроизводительных качеств племенных свиней. Технология внутриматочного осеменения свиноматок требует дополнительного изучения ее влияния на изменение маточной среды, выяснения безопасности процедуры, от чего зависит приживление или эмбриональная смертность, поросность и размер гнезда, а также гинекологические осложнения.*

*Ключевые слова:* племенные свиноматки, внутриматочные катетеры, спермодозы, воспроизводительное качество.

**V. Melnik** *The introduction of intrauterine insemination of sows in a breeding center. The results of the introduction of innovative reproductive technology in pig to improve the reproductive qualities of breeding pigs. Technology intrauterine insemination of sows requires further study of its impact on changing the uterine environment, determine the safety of the procedure, on which depends the engraftment or fetal mortality pregnancy and litter size, as well as gynecological complications.*

*Key words:* breeding sows, intrauterine catheters, semen doses, reproductive qualities.

УДК 636.4:591.16:612.6

**Княз'єва К.В.**, аспірант\*

**Денисюк П.В.** кандидат біологічних наук

Інститут свинарства та агропромислового виробництва НААН

## **ВПЛИВ рН СЕРЕДОВИЩА НА РОЗВИТОК СТАТЕВИХ ТА СОМАТИЧНИХ КЛІТИН, ЕМБРІОНІВ ТА ООЦИТ КУМУЛЮСНИЙ КОМПЛЕКС**

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

*У статті висвітлено вплив рН середовища на розвиток статевих та соматичних клітин, ембріонів та ооцит кумулюсний комплекс. Доведено, що рН є важливим фактором розвитку клітин, таким, наприклад, як температура. рН є впливовим параметром для культивування in vitro клітин. Вказано на необхідність контролювати величину цього параметра середовища, оскільки підвищення, або зниження, рН неодмінно буде позначатися на розвитку клітин. Висвітлено експериментальний матеріал щодо особливостей зміни рН. Показано, що основні внутрішньоклітинні процеси, включаючи синтез білка, функціонування мітохондрій, формування цитоскелету, проявляють високу чутливість до змін рН.*

*Ключові слова:* рН середовища, соматичні клітини, статеві клітини, ооцит кумулюсний комплекс (ОКК), ембріони, спермії.

Упродовж останнього десятиріччя накопичено значну кількість експериментальних даних щодо впливу рН середовища на розвиток клітини. Однак розуміння впливу

---

\* Науковий керівник – кандидат біологічних наук П.В. Денисюк

*pH*, тільки як негативного чи нейтрального фактора, унеможливило всебічне розкриття його значення в біологічних системах. Результати дослідження останніх років сприяли розкриттю і пізнанню позитивної ролі *pH* у процесах розмноження та розвитку. Актуальним залишається вивчення ролі *pH* у культивуванні ооцит кумулюсних комплексів (ОКК), соматичних клітин, доїмплантаційних ембріонів, заплідненні ооцитів, зберіганні сперми в клімат-шафах, оскільки *pH* суттєво впливає на всі ці процеси. Ми зробили спробу узагальнити основні дані, які є в сучасній науковій літературі щодо з'ясування ролі *pH* у цих процесах, що дозволить глибше зрозуміти механізми їх протікання й дасть можливість активно ними регулювати з метою покращення репродуктивних технологій як *in vitro* так і *in vivo*.

Кислотність або лужність середовища має великий вплив на розвиток клітини. Фізіологічною діючою основою в кислих і лужних середовищах є концентрація гідроксильних йонів гідрогену ( $\text{OH}^-$  і  $\text{H}^+$ ).

#### *pH середовища.*

Від величини водневого показника істотно залежить життєдіяльність мікроорганізмів. Іони водню впливають на електричний заряд колоїдів клітинної оболонки. При значному зрушенні *pH* в кислу або лужну сторону може змінитися знак заряду поверхні клітини, що призводить до зміни проникності клітинної мембрани для різних молекул і йонів живильного субстрата, отже, порушується нормальний процес обміну речовин [2].

Зміна *pH* впливає на ступінь дисперсності колоїдів цитоплазми, активність ферментів і інтенсивність біохімічної діяльності клітин. Розрізняють оптимальний, мінімальний і максимальний *pH* (активну реакцію середовища) для розвитку різних клітин, а також окислювально-відновний потенціал (*rH*).

Слід зазначити, що *pH* є динамічним. Його динамічність залежить від асоціації/дисоціації сполук у розчині та від дії будь-яких чинників, які впливають на цей баланс, наприклад від температури. Таким чином, *pH* може змінитися за досить короткий період часу [17]. Незакономірні коливання умов навколишнього середовища можуть бути руйнівними для гамет, ОКК та ембріонів у процесах *in vitro*. Часто не враховують, що, хоча логарифмічна шкала *pH* простіша у використанні, ніж лінійна, незначні зміни величини цього показника в її масштабі є насправді суттєвою зміною концентрації йонів  $\text{H}^+$ . Таким чином, *pH* - динамічний об'єкт, який, здавалося б, характеризується невеликими відхиленнями, але, фактично, - великими змінами концентрації  $\text{H}^+$  [9]. Наприклад, прийнятний діапазон постійної величини *pH* для середовища культивування ембріонів, за даними багатьох дослідників, – 7,2 – 7,4 одиниці (од.). Тим не менш, концентрація  $\text{H}^+$  може змінюватися за цих умов приблизно на 60% і сильно впливати на розвиток ембріонів.

Тим не менш, зміна концентрації  $\text{H}^+$ , може мати сильний вплив на розвиток ембріонів і ооцитів, приблизно на 60%.

#### *Вплив pH на розвиток клітин, гамет, ембріонів.*

Установлено, що основні внутрішньоклітинні процеси життєдіяльності – синтез білка, формування і функціонування мітохондрій, цитоскелетна регуляція, високочутливі до змін *pH* середовища. *pH* визначає заряд білків. Біля 70 і 38 % усіх білків у живих системах характеризуються ізоелектричними точками, що лежать нижче *pH* 7 од. і *pH* 6 од., відповідно, тобто мають негативний заряд за умови фізіологічного *pH*. Щоб послабити залужнювання, більшість клітин ссавців мають  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  обмінники родини обміну аніонів, які складаються з трьох ізоформ з різним сплайсингом [26]. Основними молекулами, що послаблюють закислювання, є  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмінники сімейства NHE гена [23]. Відомо щонайменше 9 ізоформ цього білкового обмінника. Як уважає переважна більшість дослідників [16], класичні експерименти з культивування соматичних клітин показали, що їх ріст і проліферація погіршуються, якщо порушується регуляція *pH* і якщо внутрішньоклітинний *pH* (*pH<sub>i</sub>*) зазнає впливу [19]. Загальноприйнято вважати, що контролер ферментера повинен бути здатним регулювати *pH* середовища культивування клітин ссавців так, щоб не допускати його осциляції [17].

На думку [Wu M. M. 28], для сортування прогормонів і подальшого їх перетворення потрібен точний градієнт  $pH$  між органелами регульованих секреторних шляхів. Вони знайшли, що в живих ендокринних клітинах  $pH$  постійного стану зменшується від  $7,4 \pm 0,2$  од. вмісту ендоплазматичного ретикулу, до  $6,2 \pm 0,4$  од. вмісту апарату Гольджі, і далі, – до  $5,5 \pm 0,4$  од. вмісту секреторних гранул. За допомогою флуоресцентного мікроскопа було показано, що існує часовий і просторовий розподіл  $pH$  у цитозолі та везикулярних відділках (компартментах) лізосом [22]. Зокрема, за рівнем  $pH$  цитозоля відрізнялися ЗТЗ фібробласти, клітини яєчника китайського хом'яка та інші клітини. Величини  $pH$  лізосом у ЗТЗ фібробластах знаходилися в межах від 4,5 од. до 4,9 од. Дослідники відмітили флуктуації  $pH$  у середині клітин після пертурбацій середовища.

Було показано, що чотири ізоформи  $Na^+/H^+$  обмінника розподілені між компартментами апарату Гольджі й беруть участь у регуляції  $pH$  органел. Причому, вони розподіляються не дискретно; області їх локалізації перекривають одна одну. Підтримання постійного клітинного об'єму та  $pH_i$  вважають важливим для нормальної клітинної функції. Двома найбільш важливими іонними транспортерами, що залучені у ці процеси, є перша ізоформа  $Na^+/H^+$  обмінника і перша ізоформа  $Na^+-K^+-2Cl^-$  співпереносника. Ці обидва види молекул стимулюються зморщуванням клітини та багатьма іншими стимулами, які включають широкий діапазон гормонів і факторів росту. Обидва переносники можуть бути важливими регуляторами клітинного об'єму. Їх активність впливає також, опосередковано чи неопосередковано, на внутрішньоклітинну концентрацію  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$  і  $H^+$  [25].

$Na^+/H^+$ -іонообмінник (а отже і  $pH$ ) регулює виживання клітини. Якщо  $pH$  середовища лежить у діапазоні від 6,8 од. до 7,0 од., то ОКК дозрівають до М2 на декілька годин довше ніж тоді, коли  $pH$  лежить у діапазоні від 7,2 од. до 7,4 од. [7]. Добре встановлена важливість регуляції  $pH_i$  у розвитку ранніх ембріонів ссавців. Ембріони миші мають дуже активний  $HCO_3^-/Cl^-$  обмінник для пом'якшення залужнювання [3]. Активність цього обмінника знайдена в ранніх ембріонах людини, хом'яка, корови. Його ефективність суттєва; одноклітинні ембріони миші можуть успішно розвиватися до бластоцисти в середовищі з  $pH \sim 8,2$  од. (нормальний  $pH$  середовища культивування ембріонів з одноклітинної стадії до бластоцисти  $\sim 7,3$  од.).

Ембріони миші регулюють підвищення  $pH$  понад фізіологічну величину за допомогою  $HCO_3^-/Cl^-$  обмінника, що знаходиться на плазматичній мембрані, так само, як це відбувається в соматичних клітинах. Але ці ембріони не мають механізму (його не виявили) для полегшення ацидозу. У заміні цього плазматична мембрана ембріона миші добре проникна для іонів  $H^+$ , і ацидоз контролюється простим потоком  $H^+$  іонів через плазматичну мембрану.

Не виявлено відчутних змін  $pH_i$  цитоплазми ооцитів ссавців після їх запліднення. Показано, що  $pH_i$  ооцитів людини протягом їх дозрівання й запліднення був завжди 7,4 од., а тому припустили, що ці процеси не включають у себе довгострокових змін  $pH_i$ . Ооцити, на стадії М2, і доімплантаційні ембріони могли протистояти залуженню середовища в однаковій мірі. Ранні ембріони, аж до стадії морули, нездатні подолати закислення, тоді як бластоцисти контролювали і закислення, і залуження [14]. Осіменіння ооцитів людини є чутливим, а введення спермія в цитоплазму – ні. З цих фактів дослідники припустили, що чутливою до  $pH$  є взаємодія спермія з ЗР – Zona Pellucida (прозорою оболонкою). Їх результати показали, що для успішного запліднення ооцита потрібен  $pH$  у 7,5 од. Подальший розвиток ембріона людини чутливіший до залуження більше, ніж до закислення.  $pH_i$  зростає протягом партеногенетичної активації IVM ооцитів свині, викликаній використанням 7 % етанолу та 50 мкмоль іонофору  $Ca^{2+}$ . Він не підвищився протягом 30 хв після введення спермія під ЗР ооцита, хоча утворення пронуклеуса спостерігалось через 6 год після цього.

Для ембріонів хом'яка, які перебувають на ранніх клітинних стадіях характерна нездатність регулювати  $pH_i$ , яка пов'язана з обмеженою здатністю розвиватися *in vitro*. Вона, також, пов'язана з порушенням іонного гомеостазу ембріона і його структурної

цілісності. У результаті вивчення регуляції  $pH_i$  у двоклітинних ембріонах мишей різних ліній було знайдено, що вони можуть долати внутрішньоклітинний ацидоз. У них виявлено  $Na^+/H^+$  антипортну активність, яка проявлялася за  $pH$ , нижчого за 7,15 од. Без наявності  $Na^+$  у зовнішньому середовищі ацидоз не зникав. Ембріони різних ліній мишей мають відмінності в механізмі регуляції  $pH$ .

За 5 % концентрації  $CO_2$  в інкубаторі, звичайно використовуваному для IVC,  $pH$  середовища підтримується на рівні 7,4 од.  $pH$  середовища стає значно вищим (від 7,6 од. до 7,7 од.), коли концентрація  $CO_2$  зменшується від 5 % до 2 % . У закритих пробірках, з середовищем IVC без буфера Хепес, у яких  $pH$  зростав до 7,99 – 8,0 од., розвиток ембріонів погіршувався як кількісно, так і якісно. А тому, автори припустили, що саме зростання  $pH$  було причиною цього погіршення. Регуляцію  $pH_i$  вважають фундаментальним гомеостатичним процесом, важливим для виживання та проліферації клітин практично всіх типів. Доімплантаційний ембріон ссавця, наприклад, має  $Na^+/H^+$  і  $HCO_3^-/Cl^-$  обмінники, які грубо протистоять ацидозу й алкалозу, відповідно. Протягом мейотичного дозрівання  $pH_i$ -регулююча здатність, яка сформувалася протягом росту, інактивується й залишається неактивною до успішного запліднення ооцита. Дослідники резонно зауважують, що в зв'язку зі змінами у фізіологічних потребах і зовнішньому середовищі, здається логічним уважати, що ооцити та ранні ембріони повинні б мати пристосування до обставин, що змінюються. За їх уявленнями, більшість клітинних процесів є гостро  $pH$  – чутливими. Вони пишуть, що зважаючи на добре установлений вплив змін у величині  $pH$  на клітинні функції, важко уявити собі, що на ріст і розвиток ооцитів може не вплинути  $pH$ , на 0,5 од. менший за нормальний.

Реактивація регуляції  $pH$  співпадає з припиненням осциляцій  $Ca^{2+}$  [11]. Деякі транспортери (обмінники), що регулюють  $pH$ , є чутливими до  $Ca^{2+}$  або шляхів його обміну [21]. І, таким чином, інактивація транспортерів, що регулюють  $pH$ , може попереджувати флуктуації  $pH_i$ , що виникають услід за заплідненням. Функціонально спарені  $pH$ -регулятори, –  $Na^+/H^+$  і  $HCO_3^-/Cl^-$  обмінники, діють як регулятори й клітинного осмосу. Зокрема, вони попереджують зморщування клітини, уводячи молекули хлористого натрію в цитоплазму і підвищуючи, у такий спосіб, осмотичний тиск. Ранні ембріони набувають нового механізму регуляції об'єму клітини, який ґрунтується на акумуляції в ній більше гліцину ніж неорганічних іонів. Цей механізм стає активним протягом мейотичного дозрівання, тобто, протягом періоду, коли  $Na^+/H^+$  і  $HCO_3^-/Cl^-$  обмінники інактивовані. Таким чином, інактивація, протягом мейозу, механізму, що регулює  $pH$ , відбувається для того, щоб уключити контроль осмосу, заснований на використанні гліцину. Було знайдено, що клітини гранульози самі по собі володіють сильними механізмами регуляції  $pH$ . Вони включають  $HCO_3^-/Cl^-$  обмінник для пом'якшення алкалозу,  $Na^+/H^+$  обмінник для пом'якшення ацидозу,  $Na^+$ - незалежну АТФ фазу (фермент, що розщепляє АТФ), або протонну помпу. Протягом мейотичного дозрівання ооцитів миші змінюється активність механізмів захисту від індукованого в них ацидозу, зокрема, - активність  $Na^+/H^+$  та  $HCO_3^-/Cl^-$  обмінників. Це може вказувати на важливість як підтримання певного  $pH_i$ , так і його зміни протягом дозрівання ооцита.

Концентрація йонів водню – показник того, на скільки навколишнє середовище клітин придатне для їх життєздатності. Адже  $pH$  впливає на величину електричного заряду клітини, електричний стан колоїдів, які входять до складу клітини.  $pH_i$  сприяє протіканню одних реакцій і робить не можливим протікання інших, а тому є одним з регуляторів обміну речовин сперміїв [6]. Залежне від концентрації калію підвищення  $pH_i$  стимулює метаболізм і рухливість сперміїв ссавців. Величина  $pH_i$  сперміїв кнура та барана швидко змінюється у напрямку до величини зовнішнього  $pH$ .  $pH$  у середині акросоми спермія миші, відразу після приготування сперми, дорівнює  $5,3 \pm 0,1$  од. [8]. Він градуально збільшується до  $6,2 \pm 0,3$  од. протягом 120 хв інкубації в середовищі, що сприяє капацитації. А спонтанна акросомна реакція відбувається, у процесі інкубації сперміїв, усе частіше, по мірі того, як залужнюється акросома.

Спермії кнура, що знаходяться в аеробних умовах, мають внутрішньоклітинні компартменти, які значно відрізняються за  $pH$ . Середня частина флагеллума, – подібної до

хвоста частини, що виступає вперед, у якій розміщені всі мітохондрії, була ідентифікована як кислий компартмент, з  $pH$  6,7 од. Внутрішньоклітинний  $pH$  голівки та довгої головної частини флагеллума знаходився на рівні 7,2 од. Позаклітинний  $pH$  дорівнював у цьому випадку 7,3 од. Коли середовище містило глюкозу, усі видимі компартменти спермія, як і середовище, закислювалися до  $pH$  6,2 од. в межах 20 год.  $pH$  впливає *in vitro* на реакції гліколізу в дозрілих сперматозоїдах кнура. Окислення глюкози пригнічується по мірі зниження  $pH$ . Будучи ізольованою, фосфофруктокіназа, – один із ферментів гліколізу, має максимальну активність за  $pH$  8,2 од., тобто досить далеко від фізіологічного значення  $pH$ , яке вважається рівним близько 7,4 од. Але за  $pH$  7,0 од. активність цього ферменту менша від максимальної лише на 25 %. І лише за  $pH$  6,0 од. активність цього ферменту *in vitro* повністю пригнічується. Окислення глюкози в цільній спермі не припиняється повністю навіть за  $pH$  6,0 од. З цих даних видно, у якому досить широкому діапазоні  $pH$  може працювати фермент. А тому, можна припустити, що він може працювати в осцилюючих за  $pH$  умовах середовища культивування теж [5]. Тим більше, що відомо про існування декількох ізоферментів цього ферменту, і припускають існування ізоферментів кожного ферменту гліколізу. Ще декілька років тому отримані в результаті добору рухливі спермії розводили в забуференому середовищі з  $pH$  7,8 од. Пізніше стали використовувати середовище запліднення з  $pH$  7,4 од., який, як вважають, повинно мати середовище, що оточує клітини.

#### *Регуляція pH.*

Якщо  $pH$  настільки чутливе, то важливо знати, як встановлювати і регулювати  $pH$ . Традиційно,  $pH$  є результатом балансу між концентрацією  $CO_2$  і кількістю бікарбонату, що додається в середовище для клітинних культур. Газоподібний  $CO_2$  розчиняється в водному розчині, й утворюється вугільна кислота, яка досягає рівноваги з кількістю розчиненого бікарбонату. Далі, для регулювання  $pH$  найпростіше змінювати концентрацію  $CO_2$  в інкубаторі. Підвищення концентрації  $CO_2$  над середовищем та в ньому знижує його  $pH$ , а вихід  $CO_2$  із середовища веде до підвищення його  $pH$ .

На час (швидкість) формування певної величини  $pH$  середовища культивування клітин впливає швидкість дифузії  $CO_2$  з газової атмосфери в рідке поживне середовище, об'єм середовища та площа його поверхні, товщина мінеральної олії, яку нашаровують на поверхню рідкого поживного середовища для зменшення швидкості його проникнення в рідину, а відтак і для зменшення швидкості зміни його  $pH$ .

Хоча концентрації  $CO_2$  й бікарбонату є основними чинниками, що визначають  $pH$ , вид білка й його концентрація теж впливають на величину цього параметра. Велике значення в практиці культивування клітин має стабілізація (підтримання стабільності величини)  $pH$ , а відтак – конструкція інкубатора (ферментера), яка повинна бути такою, щоб призводити до меншого збурення його величини. Хоча використання внутрішніх дверей інкубатора можуть зменшити витік газу і використання менших інкубаторів може допомогти у пришвидшенні відновленні необхідної концентрації  $CO_2$ , ці підходи не ідеальні, і використання буферів  $pH$  в середовищах може допомогти його стабілізації [18].

#### *Застосування біоритмічної осциляції температури й pH.*

Застосування біоритмічної осциляції  $pH$  може призвести до стимуляції проліферації клітин, переживання сперміїв, дозрівання ооцитів у вигляді ОКК, розвитку ембріонів [4].

У зв'язку з необхідністю затримання спонтанного ядерного дозрівання ооцита *in vitro*, виникла ідея замінити дороговартісний специфічний реактив, який дозволяє це зробити (дібутирил циклічний аденозинмонофосфат) дією неспецифічного фактора – постійною або змінною величиною  $pH$  певного значення. Адже відомо, що один із методів тривалого зберігання сперми полягав у закисленні плазми органічними кислотами й продувкою вуглекислим газом [15], тобто, кислий  $pH$  може консервувати, пригнічувати розвиток. А також, протягом досить тривалого часу досліджень з отримання ембріонів *in vitro* запліднення проводили в середовищі з лужним  $pH$  у 7,8 одиниці й більше [13] та/або обробляли спермії середовищем з таким  $pH$  [12]. Тобто,

лужний  $pH$  може стимулювати розвиток. Можна припустити, що його застосування простимулює цитоплазматичне дозрівання ооцита, у вигляді ОКК, і заодно пригнітить його ядерне дозрівання [10].

#### *Рівновага культури $pH$ середовища.*

Рівновага  $pH$  середовища культивування безпосередньо пов'язана з системою культури, яка використовується. Головне, щоб площа поверхні, обсяг посудини, а також використання кришок і вазелінової олії відповідали її встановленню й підтриманню. Середовища, які використовуються без нашарування олії на їх поверхню, надзвичайно чутливі до змін  $pH$ . Коли середовище об'ємом 1мл витягти з інкубатора, його  $pH$  відразу збільшиться і тільки через дві години досягне стабільності. А коли культуральну чашку з 1мл середовища витягти з інкубатора, через 5 хвилин її тримання в кімнатному повітрі  $pH$  підніметься і досягне величини 7,52 од. За тих же умов,  $pH$  об'єму середовища в 0,5 мл може досягати величини в 7,77 од. [24]. Нашаровуючи олію на поверхню середовища можна уповільнити зміни  $pH$ , але це також значно збільшує час, необхідний для досягнення його початкової величини в атмосфері  $CO_2$ .  $CO_2$  дифундує через олію дуже повільно. Стабільний  $pH$  0,5 мл середовища з 0,5 мл олії в інкубаторі досягається через майже 12 годин.  $pH$  50-мікролітрових крапель з менше ніж 0,5 мл олії урівноважується з  $CO_2$  атмосфери інкубатора близько 8 годин. І це дозволяє підтримати стабільний  $pH$  протягом принаймні 5-10 хвилин в кімнатному повітрі.

#### *Оптимізація середовища культури в ЕКО лабораторії. Вплив $pH$ та буферної ємності на якість гамет та ембріонів.*

Формування й підтримка відповідних умов культивування має важливе значення для мінімізації стресу для гамет та ембріонів і оптимізації середовища у пробірці. Одним із основних і важливих параметрів в цій роботі є  $pH$  [20]. Хоча ембріони мають обмежену здатність регулювати свій  $pH$ , ооцитам не вистачає надійних механізмів. Стійкість до відхилень у концентрації водневих іонів змінюється залежно від умов культивування, а також від лабораторних процедур. Заморожені, а потім розморожені ембріони, а також ооцити, особливо сприйнятливі до подразнень від зміни  $pH$ . Однією з основних цілей в ембріології є підвищення якості ембріонів, що їх отримують *in vitro* в лабораторії.

Таким чином, ключовим фактором у цій роботі є мінімізація навантаження на гамету та ембріони під час маніпуляцій з ними в межах навколишнього середовища в пробірці. Неправильно встановлена температура, сформований осмотичний тиск негативно позначаються на розвитку ембріона. Періодичні незакономірні коливання умов навколишнього середовища - також шкідливі стресори; вони досить легко впливають на внутрішньоклітинний стан. Одним з таких параметрів навколишнього середовища, який вимагає уваги за його налаштування, є  $pH$ .

Потрібні подальші дослідження щодо розкриття впливу  $pH$  середовища на розвиток соматичних, статевих клітин, ембріонів та ОКК, які будуть продовжені в осцилюючих умовах. Всебічно біологічні властивості змін  $pH$  матимуть великий вплив на неонастальний та постнатальний розвиток тварин.

### **БІБЛІОГРАФІЯ**

1. Аабипская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований /Аабипская А. С. – М.: Медицина, 1978. – 392 с.
2. Богданов В. Н. Микробиология молока и молочных продуктов./ Богданов В. Н. – М: Пищевая промышленность, 1969. – с 3.
3. Денисюк П.В., Мартыненко Н.А. Культивирование преимплантационных эмбрионов в среде с осциллирующим рН // Тез. докл. 2-ой Межгосударственной конф. "Селекционно-генетические и биотехнологические проблемы разведения крупного рогатого скота". – 1995 г., г. Брест. – Брест, 1995. – С. 52 – 53.

4. Денисюк, П.В. Вплив на ембріон і організм осциляторним біоритмічним розширенням умов середовища // Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького. – 2010. – Т. 12. – № 2 (44). – Ч. 2. – С. 60 – 69.
5. Денисюк П.В. Метод культивування доімплантаційних ембріонів свині в середовищі з примусово викликаною осциляцією рН. // Сучасні методики досліджень у свилярстві. – Полтава: РВВ Полтавської держ. аграрн. акад. – 2005. – С. 100 – 104.
6. Денисюк, П.В. Особенности развития доимплантационных эмбрионов свиньи in vitro в средах со стабильным и осциллирующим рН // Вісн. проблем біол. і мед. – Полтава, 2002. – № 2. – С. 13 – 18.
7. Денисюк П.В. Вплив рН середовища на розвиток in vitro доімплантаційних ембріонів свині: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.13 / П.В. Денисюк; [Інститут тваринництва УААН]. – Харків, – 1997. – 25 с.
8. Денисюк П.В. Развитие одноклеточных эмбрионов свиньи in vitro при двух вариантах меж осциляції рН // Матер. Міжнар. Наук.-виробн. Конф. – Київ, Асканія-Нова. – 1997. – С. 25 – 26.
9. Корчан Н. О. Культивування ооцит-кумулясних комплексів свині за осцилюючих температури та рН // Наук. вісн. ЛНАУ. Серія Ветеринарні науки. – Луганськ: «Елтон-2», 2012. – № 37. – С. 68 – 73.
10. Корчан Н.О., Денисюк П.В. Застосування примусової біоритмічної осциляції рН середовища культивування поза організмом як способу, призначеного для збільшення міри розростання ооцит-кумулясних. Патент 68013, 2011.
11. Денисюк П.В. Спосіб примусової осциляції рН середовища культивування біологічних мікрооб'єктів. Патент РФ, № 98094883, 2002.
12. Agung B. In vitro fertilization and development of porcine oocytes matured in follicular fluid / B. Agung // J. of Reprod. and Dev. – 2013. – Vol. 59, No 2, P. 103–106.
13. Asano A. Activation and penetration in vitro of pig oocytes treated with calcium ionophore / A. Asano, K. Niwa // J. of Reprod. and Dev. – 2004. – V. 50. N. 1. P. 77 85.
14. Denysiuk P.V. Pig embryo culture in medium at pH forced to be biorhythmically oscillating /: Cell Technology Week abstracts book of the 1 International Scientific Conference of Students and PhD Students Kyiv // Denysiuk P.V., 2013. – P. 7.
15. Du Mesnil Improvement of practical use of preservation techniques for boar semen by saturation of the diluent with carbon dioxide / Du Mesnil // Ann Zootech Suppl 1959. – (8):81-96.
16. Fitz Harris G. Regulation of intracellular pH during oocyte growth and maturation in mammals / G. Fitz Harris, J. M. Baltz // Reproduction. – 2009. – V. 138. – N. 4. – P. 619–627.
17. Julien C. Scaling Up from Spinners, TF lasks & Shakers: A versatile bioreactor for mammalian and microbial cells [Електронний ресурс] / C. Julien. may 1998. – Режим доступу : <http://www.biocompare.com>
18. Jason E. Swain Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality // Jason E. -2014. pages 6 – 16
19. Kapus A. Functional characterization of three isoforms of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation / A. Kapus. // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269. – P. 23544 – 23552.
20. Kay Elder Woodward Troubleshooting and Problem-Solving in the IVF Laboratory/ Kay Elder // Biol. – 2015. P. 204 -205.
21. Korchan N. Development of pig cumulus-oocyte complexes at constant and oscillating temperature and pH / N. Korchan // Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2013. – Вип. 2 (64). – С. 22-27.
22. Lin H. J. Fluorescence life time resolved pH imaging of living cells / H. J. Lin // Cytometry Part A. – 2003. – V. 52A. – Is. 2. – P.
23. Orłowski J. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family / J. Orłowski, S. Grinstein // Pflügers Archiv. – 2004. – V. 447. – P. 549 – 565.
24. Patrick Quinn. Culture media, solutions, and systems in human ART / edited hv// Patrick Quinn. – 2014.- P. 152

25. S. F. Pedersen Pedersen S. F. Physiology and pathophysiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup> cotransport in the heart, brain, and blood / S. F. Pedersen // *AJP Regul. Physiol.* – 2006. V. 291. N. 1. – P. R1, R25. 77 – 89.
26. Romero M. F. The SLC4 family of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters / M. F. Romero // *Pflügers Archiv.* – 2004. – V. 447. – P. 495 – 509.
27. Kay Elder Woodward Troubleshooting and Problem-Solving in the IVF Laboratory/ Kay Elder // – 2015.
28. Wu M. M. Mechanisms of pH Regulation in the Regulated Secretory Pathway / M. M. Wu, M. Grabe, S. Adams et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 33027.

**Князьева К.В., Денысюк П.В.** Влияние pH среды на развитие половых и соматических клеток, эмбрионов и ооцит кумулюсный комплекс  
*В статье изложено влияние pH среды на развитие половых и соматических клеток, эмбрионов и ооцит кумулюсный комплекс. Доказано, что pH является важным фактором развития клеток, таким, например, как температура. pH является влиятельным параметром для культивирования in vitro клеток. Нужно контролировать величину этого параметра среды, поскольку повышение или снижение pH непременно будет сказываться на развитии клеток. Изложено экспериментальный материал об особенностях изменения pH. Показано, что основные внутриклеточные процессы, включая синтез белка, функционирование митохондрий, формирование цитоскелета, високочувствительность к изменениям pH.*

*Ключевые слова: pH среды, соматические клетки, половые клетки, ооцит кумулюсный комплекс (ОКК), эмбрионы, сперматозоиды.*

**K.V. Kniazieva, P.V. Denysyuk.** Effect of pH on the development of germ and somatic cells, embryos and oocyte cumulus complex  
*In the article the influence of pH on the development of germ and somatic cells, embryos and oocyte cumulus complexes. Proved that pH is an important factor in the development of cells, such as, eg, temperature. pH is an influential parameter for culturing cells in vitro. It is necessary to control the value of this parameter environment as increase or decrease in pH will inevitably affect cell development. Deals with experimental features for pH changes. It is shown that the major intracellular processes, including protein synthesis, functioning mitochondria, cytoskeleton formation, vysokochutlyvist to changes in pH.*

*Key words: pH, somatic cells, germ cells, oocyte cumulus complexes (OCC), embryos, sperm.*