

ВПЛИВ РОСТОВИХ ФАКТОРІВ ТА ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ НАДВИСОКИХ ЧАСТОТ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВОДІВ КОРІВ

І. І. Гевкан, Ю. І. Сливчук
Інститут біології тварин УААН

Наведено дані про вплив ростових факторів та електромагнітного поля надвисоких частот на проліферативну активність культури клітин яйцепроводів корів. Встановлено, що різні посівні концентрації клітин по-різному впливають на інтенсивність росту культури. Створено безперервно працюючий біотехнологічний цикл з використанням фідерної культури яйцепроводів для дозрівання ооцитів та регенерації дроблення ембріонів та розроблено методи її кріоконсервування. Досліджено динаміку проліферативного росту культури в процесі культивування та вміст окремих біохімічних показників у кондиційному середовищі.

Ключові слова: корови, культура епітеліальних клітин яйцепроводів, ростові фактори, електромагнітне поле надвисоких частот, проліферативний ріст, біохімічні показники, кондиційне середовище.

Умови, що оточують клітину *in vivo*, суттєво відрізняються від умов культивування *in vitro* за просторовою організацією і діючими на клітини позаклітинними фізико-хімічними чинниками [16]. Тому при заплідненні яйцеклітин *in vitro* [5-6] через відсутність підтримуючого клітинного оточення відбувається затримка інтенсивності диференціації зародкових клітин і розвитку ембріонів до трансферабельних стадій поза організмом.

Негативний вплив різних чинників зовнішнього середовища на культивування ооцитів та ембріонів поза організмом може бути зменшений завдяки дозріванню ооцитів на культурі клітин з репродуктивних органів тварин [1-2, 7, 14].

Механізм сприятливої дії моношару епітеліальних клітин яйцепроводів на розвиток ОКК і ембріони тварин полягає у створенні фідерними клітинами кондиційного середовища, яке містить відповідні фактори росту. Для проліферативного росту і функціональної активності такі клітини вимагають наявності у культуральному середовищі оптимального рівня гормонів та ростових факторів [3].

Відомо, що клітини тварин у культурі зберігають ту саму потребу в поживних речовинах, як і в організмі. Створення умов вирощування клітин *in vitro* адекватних умовам живого організму є важливим і, водночас, важким завданням [8].

Розрізняють два основні компоненти поживного середовища: низькомолекулярні сполуки (метаболіти, вітаміни, іони) і ростові чинники [3-4, 9]. До ростових чинників відносять речовини, які мають здатність стимулювати проліферацію клітин, знаходячись поза клітиною і взаємодіючи з її поверхнею [12].

У сироваткових середовищах джерелом цих ростових чинників і багатьох міnorних компонентів є сама сироватка крові тварин. Вимоги клітин до різних чинників поживного середовища залежать від типу і властивостей культури [8].

Під час активної підготовки материнських репродуктивних органів до прийняття зиготи в дію вступають складні регуляторні системи як зі сторони організму матері, так і ембріона, що пов'язані зі специфічними ростовими факторами, серед яких на особливу увагу заслуговують інсуліноподібний (ІФР) та епідермальний фактори росту (ЕФР) [11,15]. Дію цих низькомолекулярних сполук в ембріогенезі тварин добре вивчено [12], а ЕФР виділяють у лабораторних умовах [9]; але передбачити їх вплив на клітинну культуру яйцепроводів *in vitro* досить важко, що можна пояснити складністю механізмів регуляції взаємодій між клітиною і оточуючим мікросередовищем. Саме різноманітність цих взаємодій поставили нас перед необхідністю експериментального вивчення впливу інсуліну (аналог інсуліноподібного фактора росту) і ЕФР на проліферативний ріст культури епітеліальних клітин яйцепроводів, а в наступних дослідженнях вивчення її функціональної здатності щодо дозрівання ооцитів корів та овець в умовах *in vitro*.

Електромагнітні поля надвисокої частоти (ЕМП НВЧ) широко застосовують у медицині [17], сільському господарстві, репродуктивній біотехнології для лікування хвороб, підвищення проростання зерна, активації проліферативної активності клітин.

Одержання культури епітеліальних клітин яйцепроводів – затратний та довготривалий процес, пов'язаний з дефіцитністю біоматеріалу на м'ясокомбінатах, необхідністю довготривалої ферментативної обробки тканин з метою отримання ізольованих клітин та їх очистки для утворення фідерного моношару. Тому метою нашої роботи було - створити безперервно працюючий біотехнологічний цикл із використанням фідерної культури яйцепроводів для дозрівання ооцитів і регенерації дроблення ембріонів та розробити методи підвищення її проліферативної активності ростовими факторами і ЕМП НВЧ та способи кріоконсервування. Створення нових підходів до заморожування культури клітин із метою збереження її життєздатності та функціональності щодо синтезу специфічних білків і факторів росту дасть можливість вирішити проблему її дефіцитності і використовувати в будь-який час без обмежень у різних галузях ембріональної біотехнології. Вивчення інтенсивності обмінних процесів у культурі фідерних клітин із визначенням окремих біохімічних показників у кондиційному клітинному середовищі за умов застосування ростових факторів та електромагнітного поля надвисокої частоти дасть змогу встановити функціональну активність культури.

Матеріали і методи досліджень. Для вирішення поставленої мети біоматеріал для одержання культури фідерних клітин яйцепроводів корів відбирали від клінічно здорових корів, забитих на Винниківському м'ясопереробному підприємстві.

Отримання суспензії ізольованих клітин проводили за модифікованою нами методикою J. Kuzen і R. Rite, описаною в попередніх дослідках [10], суть якої полягає в швидкій механічній та ферментативній обробці тканини яйцепроводів корів. З цією метою після забою тварин відбирали яйцепроводи і доставляли в охолоджену стані до лабораторії ембріональної біотехнології. В умовах стерильного боксу їх промивали, подрібнювали ножицями та гомогенізували в середовищі ДМЕМ у скляному гомогенізаторі, фільтрували через 4 шари марлі, здійснювали триразове ресуспендування в 2 мл ДМЕМ з наступним центрифугуванням при 1000 об/хв упродовж 10 хв та трипсилізували 0,5% трипсином з ЕДТА (1:1). Клітини інкубували в термостаті впродовж 25 хв, два рази відмивали від трипсину додаючи середовище ДМЕМ з БСА для нейтралізації

трипсину, центрифугували при 1000 об/хв упродовж 2 хв для одержання чистих ізольованих клітин. Визначення концентрації клітин проводили в камері Горяєва.

Заморожування культури клітин. Для створення кріобанку епендорфи з культурою клітин заморожували одноступенево в холодильній камері за температури -80°C у флаконі з подвійною стінкою, в якій містився ізопропанол. Температура замерзання ізопропанолу -20°C , що забезпечує поступове заморожування клітин до -80°C . Заморожену клітинну суспензію довготривало зберігали в епендорфах у холодильній камері.

Розморожування культури клітин. Епендорф із культурою клітин пінцетом переносили у водяну баню при $t=38,5^{\circ}\text{C}$ на 1-2 хв. Розморожену суспензію клітин переносили у центрифужну пробірку і розбавляли у 5-10 разів основним культуральним середовищем (ОС) та витримували 12 годин у термостаті за температури $38,5^{\circ}\text{C}$ для віталізації. Через 12 годин суспензію центрифугували 5 хв при 1000 об/хв; надосадову рідину видаляли, до осаду додавали порцію свіжого ОС і ресуспендували. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва, розраховували посівну концентрацію і висівали у чашки Петрі в краплю середовища.

Досліди 1 і 2 проводили впродовж 72 годин з метою порівняльного вивчення впливу досліджуваних факторів: інсуліну і епідермального фактору росту та електромагнітного поля надвисокої частоти за умов застосування різних посівних концентрацій клітин. Початкова концентрація клітин становила 0,6 та 1,2 млн/мл у краплях $V=200$ мкл у всіх дослідних групах. Культивували клітини в термостаті за температури $38,5^{\circ}\text{C}$ з 5%-им вмістом CO_2 та максимальній вологості за схемою (табл. 1).

1. Схема дослідів 1 і 2. Визначення динаміки проліферативного росту розморожених фідерних клітин під впливом ростових факторів та ЕМП НВЧ

Групи клітин	Середовище культивування	Дослід	
		1	2
Контрольна	ОС:	$C=0,6 \times 10^6$ клітин/мл	$C=1,2 \times 10^6$ клітин/мл
Дослідна 1	ОС з 20 мкг/мл інсуліну		
Дослідна 2	ОС з 10 нг/мл ЕФР		
Дослідна 3	ОС з 20 мкг/мл інсуліну та 10 нг/мл ЕФР		
Дослідна 4	ОС з ЕМП НВЧ впродовж 3хв.		

Примітка: С - початкова концентрація клітин; ОС - основне середовище: ТСМ-199 + 0,4% BSA + Na- піруват + 4 мкг/мл гентаміцину + 10 мкг/мл ФСГ+ЛГ + 1 мкг/мл естрадіолу-17 β + 0,2 мкг/мл преднізолону.

Ростові чинники застосовують з метою підвищення проліферативної і функціональної активності фідерного моношару. Враховуючи те, що ростові чинники є дорогими нами була зроблена спроба замінити їх дією фізичних чинників а саме - електромагнітним полем надвисоких частот (ЕМП НВЧ).

Для цього за період 72-годинного культивування культуру клітин перед культивуванням і через кожні 24 години піддавали 3-хвилинній дії ЕМП НВЧ з частотою коливань 30-300 ГГц. Після кожних 24 годин культивування змінювали середовище та підраховували кількість клітин для визначення їх проліферативної активності.

З метою вивчення функціональної активності фідерного моношару клітин яйцепроводів проводили поетапний відбір кондиційного середовища клітинних культур контрольної і дослідних груп упродовж 72 годин культивування через

кожні 24 години і визначали в ньому окремі біохімічні показники а саме: загальний білок, кальцій і фосфор.

Результати досліджень.

Дослід 1. При підрахунку кількості клітин через 24 години культивування при початковій концентрації 0,6 млн/мл у контрольній і дослідних групах суттєвої різниці за проліферативним ростом не виявлено. Однак, спостерігали тенденцію до підвищення кількості клітин у групах, до середовища яких додавали інсулін - дослідна 1 та інсулін з епідермальним фактором росту - дослідна 3 (табл.2). У 4-й дослідній групі, де клітини обробляли електромагнітним полем надвисокої частоти (ЕМП НВЧ), виявили зниження концентрації клітин відносно контролю, очевидно, дія ЕМП НВЧ на ослаблені після деконсервації клітини має інгібуючий вплив на проліферативні процеси.

2.Динаміка проліферативного росту деконсервованої культури фідерних клітин яйцепроводів корів, початкова посівна концентрація $0,6 \times 10^6$ кл/мл

Групи (n=3)	Концентрація клітин ($n \times 10^6$ /мл), та тривалість (год.) культивування ($M \pm m$)			
	початкова	24	48	72
Контроль	0,6	$1,9 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,8$	$6,7 \pm 1,0$
Дослідна 1	0,6	$2,3 \pm 0,5$	$4,0 \pm 1,9$	$9,9 \pm 1,3$
Дослідна 2	0,6	$1,3 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$	$10,7 \pm 1,3^*$
Дослідна 3	0,6	$2,4 \pm 0,8$	$4,7 \pm 1,6$	$17,1 \pm 0,4^{**}$
Дослідна 4	0,6	$0,8 \pm 0,1$	$4,4 \pm 1,0$	$15,0 \pm 0,5^{**}$

Примітка: 1) * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,01$; 2) К - ОС без культури клітин; К' - ОС з культурою клітин; дослідна 1 – ОС з культурою клітин + інсулін; дослідна 2 – ОС з культурою клітин + ЕФР; дослідна 3 – ОС з культурою клітин + комплексне додавання факторів інсуліну та ЕФР; дослідна 4 - ОС з культурою клітин під дією ЕМП НВЧ.

Суттєві різниці були виявленні між окремими дослідними та контрольною групами після 48- та 72-годинного культивування. Зокрема, найбільш помітне збільшення кількості клітин виявлено у групі з інсуліном та інсулін з ЕФР (дослідна 1 і 3, відповідно). У цих групах кількість клітин зростала з 2,3 і 2,4 після 24 годинного культивування до 4,0 і 4,7 $\times 10^6$ клітин/мл, відповідно. Менше виражене зростання кількості клітин спостерігали у 2-ій дослідній групі, до ОС якої додавали ЕФР. Дворазова обробка клітин ЕМП НВЧ з експозицією дії 3 хвилини (дослідна група 4) через 48 годин культивування зумовила збільшення кількості клітин більше ніж в чотири рази в порівнянні з результатами 24-годинного культивування. Виявлений проліферативний ріст відбувається за рахунок «активації» і «тренування» клітин, яке можна пояснити підвищенням адаптивної здатності клітин після повторного застосування ЕМП НВЧ, очевидно, зумовленого зростанням ефективності поглинання і акумуляції ними потоку енергії ЕМП, при резонансних частотах білкових молекул, та зростання амплітуди їх коливань.

Через 72 години культивування розмороженої культури клітин у контрольній групі клітин (ОС) і усіх дослідних групах спостерігали інтенсивний проліферативний ріст. Це вказує на те, що культура клітин на даний час повністю відновила свою життєздатність, функціональність і проліферативну активність та може бути застосована для використання в різних біотехнологічних методах із метою стимуляції ооцитарного і ембріонального розвитку.

При окремому додаванні до ОС інсуліну та ЕФР (1-ша і 2-га дослідні групи) виявлено нижчий проліферативний ріст клітин, ніж їх спільне введення до ОС (3-тя дослідна група), що призводило до підвищення концентрації клітин більш, ніж у 2,5

раза в порівнянні з контролем – $17,1 \times 10^6$ проти $6,7 \times 10^6$ клітин/мл відповідно. Загальна кількість клітин у 3-й дослідній групі впродовж 72 годин культивування збільшилася у 28,5 раза, у порівнянні з початковою посівною концентрацією.

Значне підвищення активності проліферативного росту клітин 4-ї дослідної групи за умов впливу ЕМП НВЧ упродовж 72-годинного культивування ($15,0 \times 10^6$ клітин/мл) може бути основою для розробки методів створення моделі штучного яйцепроводу, для дозрівання ооцитів при заплідненні *in vitro* і розвитку ембріонів до трансферабельних стадій, а також здешевлення і більш широкого застосування цих ембріобіотехнологічних методів.

З метою вивчення інтенсивності обмінних процесів у культурі фідерних клітин з початковою концентрацією клітин 0,6 млн/мл під впливом ростових факторів та ЕМП НВЧ проводили визначення окремих біохімічних показників у кондиційному середовищі після 24, 48 та 72 годин культивування (табл. 3).

3. Біохімічні показники у кондиційному середовищі деконсервованої культури клітин яйцепроводів, початкова посівна концентрація $0,6 \times 10^6$ кл/мл

Групи	Час культивування (години)							
	24			48		72		
	загальний білок, г/л	кальцій, ммоль/л	фосфор, ммоль/л	кальцій, ммоль/л	фосфор, ммоль/л	загальний білок, г/л	кальцій, ммоль/л	фосфор, ммоль/л
К	9,4	2,25	1,60	2,25	1,60	9,4	2,25	1,60
К'	12,1	2,52	0,80	2,02	1,82	8,5	2,30	1,07
Дослідна 1	11,2	2,56	0,87	1,92	0,92	14,4	2,33	0,84
Дослідна 2	11,9	2,61	0,99	2,17	2,36	13,2	2,25	0,80
Дослідна 3	12,1	2,70	0,90	2,36	0,81	13,4	2,34	0,54
Дослідна 4	12,6	2,54	0,87	2,39	0,89	13,2	2,35	1,22

Примітка: К - ОС без культури клітин; К' - ОС з культурою клітин; дослідна 1 - ОС з культурою клітин + інсулін; дослідна 2 - ОС з культурою клітин + ЕФР; дослідна 3 - ОС з культурою клітин + комплексне додавання факторів інсуліну та ЕФР; дослідна 4 - ОС з культурою клітин під дією ЕМП НВЧ.

У результаті проведених біохімічних досліджень кондиційного середовища після 24-годинного культивування клітин виявлено тенденцію до підвищення вмісту білка у контрольній та усіх дослідних групах у порівнянні з відповідним показником у основному середовищі. Аналогічну тенденцію виявлено і при визначенні концентрації кальцію, що, очевидно, можна пов'язати з інтенсивністю обмінних процесів, які відбуваються між основним культуральним середовищем та цитоплазмою клітин. 24-годинне культивування клітин зумовило зниження концентрації фосфору у кондиційному середовищі майже в 1,5 раза у контрольній та усіх дослідних групах, у порівнянні з відповідною концентрацією в основному середовищі.

Тенденція до збільшення вмісту білка в кондиційному середовищі зберігалась і після 48- та 72-годинного культивування. Найбільш виразні зміни виявлено у 1-й, 3-й та 4-й дослідних групах, до культурального середовища яких додавали ростові фактори та обробляли ЕМП НВЧ, у порівнянні з контролем та відповідним показником в основному середовищі.

Після 48-годинного культивування у 2-й дослідній групі виявлено підвищення вмісту фосфору майже в 2 рази, у порівнянні з відповідним показником у основному середовищі, що, можливо, можна пов'язати з підвищеною АТФ-азною

активністю, тобто з підвищеним енергетичним обміном у цій групі культури клітин, які культивували в ОС із додаванням ЕФР.

Значне, більше ніж у три рази, зниження вмісту фосфору виявили у групі з інтенсивним проліферативним ростом (3-я дослідна група), де застосовували комплексне додавання ростових чинників - інсуліну та ЕФР. На нашу думку, значне зниження вмісту фосфору в кондиційному середовищі може бути пов'язане з використанням фосфору як субстрату для синтезу АТФ при інтенсивному енергетичному обміні в активно проліферуючій культурі клітин яйцепроводів корів.

Дослід 2 був проведений з метою порівняльного вивчення впливу ростових чинників: інсуліну і епідермального чинника росту та електромагнітного поля надвисокої частоти, за умов застосування збільшеної початкової концентрації деконсервованих клітин $-1,2 \times 10^6$ /мл на інтенсивність їх проліферативного росту та створення щільного моношару.

При підрахунку кількості клітин через 24 год культивування (табл.4) у всіх групах кількість клітин зросла у 2-3 рази, що, очевидно, пов'язане зі збільшенням початкової посівної концентрації до $1,2 \times 10^6$ клітин/мл. У порівнянні з дослідом 1 перша обробка ЕМП НВЧ деконсервованої культури не викликала зниження проліферативного росту. Кількість клітин 4-ї дослідної була аналогічна рівню контрольної групи і становила $3,6 \times 10^6$ клітин/мл.

4.Динаміка проліферативного росту деконсервованої культури фідерних клітин яйцепроводів корів, початкова посівна концентрація $1,2 \times 10^6$ кл/мл (M±m)

Групи (n=3)	Концентрація клітин (n x 10 ⁶ /мл)			
	початкова	через 24 год	через 48 год	через 72 год
Контроль	1,2	$3,6 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,5$	$6,7 \pm 1,8$
Дослідна 1	1,2	$3,0 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,4$	$21,4 \pm 0,7^{***}$
Дослідна 2	1,2	$2,6 \pm 0,2$	$3,7 \pm 1,1$	$11,0 \pm 1,1^*$
Дослідна 3	1,2	$3,9 \pm 1,1$	$3,9 \pm 0,6$	$24,3 \pm 0,6^{***}$
Дослідна 4	1,2	$3,6 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,8$	$15,5 \pm 1,0^{**}$

Примітка: *p<0,05; **p<0,01, *** p<0,001.

Після 48 годин культивування в усіх дослідних групах суттєвих різниць за концентрацією клітин, у порівнянні з контролем, не виявлено. Через 72 години культивування деконсервованої культури при підрахунку клітин виявлено різке підвищення їх проліферативної активності в усіх дослідних групах на відміну від контрольної групи. Аналогічно до дослідів 1, додавання до ОС ЕФР (дослідна група 2) зумовило незначне підвищення проліферативного росту культури, тоді, як комплексне застосування інсуліну та ЕФР призвело до підвищення концентрації клітин в 1 мл у цій групі з 1,2 до $24,3 \times 10^6$ клітин/мл, що у 3,2 раза перевищує відповідні показники в контрольній та в 1,5 раза по аналогічній групі в досліді 1.

Додавання до ОС інсуліну (дослідна група 2) зумовило інтенсивне підвищення проліферації клітин приблизно в 3,2 раза порівняно з контрольною групою. Комплексне застосування обох ростових факторів спричинило збільшення кількості клітин у 3-ій дослідній групі у 3,6 раза, порівняно з контролем. Загальна кількість клітин, за умов додавання обох чинників, зросла до 24,3 млн клітин в 1 мл, що у 20,3 раза більше ніж початкова посівна концентрація клітин у цьому досліді.

Триразове оброблення клітин ЕМП НВЧ (експозиція обробки становила 3 хвилини) і культивування їх впродовж 72 годин показала, що інтенсивність проліферації клітин 4-ї дослідної групи не перевищує відповідну кількість клітин у аналогічній групі в досліді 1. Отже, збільшення концентрації клітин при посіві не вплинула на збільшення кількості клітин у цій групі впродовж 72 годинного культивування, тому можна вважати, що збільшення початкової концентрації розморожених клітин, за умов дії ЕМП НВЧ, є недоцільним.

Таким чином, розроблена технологія одержання, культивування та довготривалого зберігання культури фідерних клітин яйцепроводів корів, яка використовується нами для створення моделі штучного яйцепровода, відповідає вимогам і є ефективною.

При аналізі показників біохімічних досліджень кондиційного середовища (табл.5), яке одержали після 24-годинного культивування з початковою посівною концентрацією $1,2 \times 10^6$ клітин/мл виявлене, зростання вмісту загального білка в дослідній групі 1, до культурального середовища якої додавали інсулін, та в групі 2, з епідермальним чинником росту. Через 72 години культивування вміст загального білка в цих групах теж підвищився, але в меншій мірі.

5.Біохімічні показники у кондиційному середовищі деконсервованої культури клітин яйцепроводів, початкова посівна концентрація $1,2 \times 10^6$ кл/мл ($M \pm m$)

Групи (n=3)		Час культивування (години)							
		24			48		72		
		загальний білок, г/л	кальцій , ммоль/л	фосфор, ммоль/л	кальцій, ммоль/л	фосфор, ммоль/л	загальний білок, г/л	кальцій, ммоль/л	фосфор, ммоль/л
К		9,4	2,25	1,60	2,00	1,34	9,4	2,25	1,60
К'		10,0	2,47	1,50	2,48	2,27	14,3	2,33	0,91
Дослід на	1	12,4	3,09	2,69	2,44	2,22	14,2	2,34	0,84
	2	12,6	2,88	1,67	2,52	2,79	14,1	2,74	0,94
	3	10,7	3,01	2,74	2,52	2,49	13,7	2,51	1,03
	4	10,6	3,25	3,09	2,59	2,41	13,2	2,24	0,97

Вміст кальцію в кондиційному середовищі культур клітин усіх дослідних груп зростав в 1,5 раза після 24 годин культивування і був найвищий у групі, де до ОС додавали інсулін, та в групі, клітини якої обробляли ЕМП НВЧ. Вміст його зростав з 2,25 до 3,25 ммоль/л. Виявлене підвищення концентрації кальцію у кондиційному середовищі в усіх дослідних групах, у порівнянні з контрольною, вказує на підвищення проникливості клітинних мембран під впливом ростових чинників та ЕМП НВЧ і в результаті посиленого обміну речовин між культуральним середовищем та цитоплазмою клітин. Через 48 і 72 години культивування тенденція до збільшення концентрації кальцію в кондиційному середовищі дослідних груп продовжувалася, але в менш вираженій мірі.

Вміст фосфору в кондиційному середовищі клітин усіх дослідних груп після 24 годин культивування підвищився приблизно в 1,7 раза. Через 48 годин вміст фосфору продовжував зростати і був вищий в 1,5-2 ризи ніж у контролі. Найвищий рівень фосфору був у дослідній групі, з додаванням до середовища ЕФР, та у групі з комплексним додаванням інсуліну та ЕФР. Через 72 годин культивування спостерігали значне зниження концентрації фосфору в кондиційному середовищі, приблизно у 1,5-2 раза, що пов'язане з інтенсивним використанням його в енергетичному обміні клітин з високим проліферативним ростом.

Підвищення концентрації фосфору у 1, 3 та 4 дослідних групах після 24-годинного культивування та у всіх дослідних групах після 48-годинного культивування можна пов'язати з інтенсивним використанням енергії АТФ у обмінних процесах, тобто з АТФ-азною активністю. Зниження вмісту фосфору в кондиційному середовищі на 72 годину культивування, яке співпадає з найвищою проліферативною активністю культури, свідчить про використання клітинами фосфору як субстрату для синтезу АТФ при інтенсивному енергетичному обміні в активно проліферуючій розмороженій культурі клітин яйцепроводів корів.

Висновки:

1. Для стимуляції проліферативного росту культури клітин можна використовувати інсулін, який є відносно ЕФР дешевший і при початковій концентрації клітин $1,2 \times 10^6$ клітин/мл через 72 год культивування викликає максимальне підвищення кількості клітин до $21,4 \times 10^6$ /мл.

2. Застосування ЕМП НВЧ, позитивно впливає на інтенсивність росту клітин у культурі і може бути використане як джерело економічно вигідного засобу для підвищення проліферативного росту клітин у різних галузях ембріональної біотехнології.

3. Після розморожування культури клітин яйцепроводів корів вміст загального білка у кондиційному середовищі залишається незмінним, що свідчить про низькі процеси клітинного розпаду і високу життєздатність клітин. Підвищення вмісту загального білка у кондиційному середовищі дослідних клітинних популяцій під впливом ростових факторів та ЕМП НВЧ показує, що в процесі інтенсивного проліферативного росту клітини синтезують та виділяють фактори білкової природи, і отже культура клітин є функціонально активною.

4. Виявлене підвищення вмісту кальцію в культуральному середовищі, в якому культивувались клітини, вказує на високий рівень обмінних процесів між цитоплазмою клітин та оточуючим середовищем. Значне зменшення вмісту фосфору у групах клітин з інтенсивним проліферативним ростом (додавання інсуліну з ЕФР або оброблених ЕМП НВЧ), очевидно, пов'язане з використанням фосфору для синтезу високоенергетичних сполук, зокрема АТФ.

Бібліографічний список

1. Губенко Р.Г., Гусев М.В., Киркин А.Ф. Клеточная инженерия. – Москва, Высшая школа. – 1987. – 127 с.

2. Одержання ембріонів шляхом запліднення *in vitro* кумулюсних комплексів з яєчників тільних корів/ Гузеватий О.Є., Ясінський В.В., Старостка В.В. та ін. // Вісник Аграрної Науки. - 1995. - №4. - С.59-61.

3. Жернокльов Г.В. Вплив естрадіолу-17 β та факторів росту на ядерне і цитоплазматичне дозрівання ооцитів великої рогатої худоби поза організмом // Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва УААН. – Харків. – 1998. - №75. – С.124-130.

4. Жернокльов Г.В. Вплив білкових добавок на розвиток ембріонів // Тваринництво України. – 1998. – №2. – С.10.

5. Кузнецов В.Є., Зубець М.В., Буркат В.П. Трансвагінальна пункція фолікулів яєчників корів і телиць під контролем ультразвуку - прижиттєвий метод отримання ооцитів генетично-цінних тварин // Вісник Аграрної науки. – 1998. - №4. - С.5-8.

6. Получение зародышей крупного рогатого скота методом оплодотворения *in vitro* / Кузнецова И.Б., Кузнецов В.Е., Ковтун С.И., Малешко Н.Я. // Вісник Аграрної науки. – 1999. - №10. - С.52-55.

7. Кузнецов В.С. Вплив клітин гранульози на дозрівання, запліднення та подальший розвиток яйцеклітин корів *in vitro* // Вісник проблем біології і медицини. – 1999. - Вип.13. - С.29-33.
8. Культура животных клеток. Методы //Под ред. Р.Фреони.-Москва, Мир, 1989. – 332 с.
9. Кусень С.И., Стойка Р.С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. – Москва, Наука. –1985. –236 с.
10. Вплив фідерних клітин яйцепроводів на дозрівання ембріонів овець до трансферабельних стадій / Мадіч А.В., Гевкан І.І., Штапенко О.В. та інш. // Науко-технічний бюлетень Інституту тваринництва. – Харків. - 2005. - №90. – С.92-97.
11. Никольский Н.Н., Сорокин А.Д., Сорокин А.В. Эпидермальный фактор роста. – Москва, 1995. – 305 с.
12. Стойка Р.С., Кусень С.Н. Полипептидные факторы роста в эмбриогенезе животных // Онтогенез. –1988. –Т.3, №19. – С.229-239.
13. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник; Под ред. В.В.Меньшикова. - Москва, Медицина, 1987. - С.219-221.
14. Кузнецов В.С. Вплив клітин гранульози на дозрівання, запліднення та подальший розвиток яйцеклітин корів *in vitro* // Вісник проблем біології і медицини. – 1999. - Вип.13. - С.29-33.
15. Adamson E.D. EGF receptors activities in mammalian development //Mol. Reprod. Dev. -1990. –N27. –P.16-22.
16. O'Brien J.K., Catt S.L., Ireland K.A., Maxwell M.C. and Evans G. In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep //Theriogenology. - 1996. -V.41, N1. - P. 1433-1443.
17. ДП України №36042. Спосіб вибору довжини хвилі електромагнітного випромінювання ЕМВ міліметрового діапазону при лікуванні. - Запорожан В.М., Беспоясна В.В., Бубнов В.В., Грушецька О.

ВЛИЯНИЕ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ СВЕРХВЫСОКИХ ЧАСТОТ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДОВ КОРОВ

И. И.Гевкан, Ю. И.Сливчук, Институт биологии животных УААН, Львов

Приведены данные о влиянии ростовых факторов и электромагнитного поля сверхвысоких частот на пролиферативную активность культуры клеток яйцеводов коров. Установлено, что разные посевные концентрации клеток по-разному влияют на интенсивность роста культуры. Создан непрерывно действующий биотехнологический цикл с использованием фидерной культуры яйцеводов для созревания ооцитов и регенерации дробления эмбрионов, разработаны методы ее криоконсервации. Исследована динамика пролиферативного роста культуры в процессе культивирования и содержания отдельных биохимических показателей в кондиционной среде.

Ключевые слова: коровы, культура эпителиальных клеток яйцеводов, ростові фактори, електромагнітне поле сверхвысоких частот, пролиферативный рост, биохимические показатели, кондиционная среда.

GROWTH PROMOTING FACTOR & ELECTROMAGNETIC FIELD OF ULTRAHIGH FREQUENCY IMPACT ON THE COW OVARIOLE CELL PROLIFERATION

I. Gevkan, Yu. Slivchuk, the Institute of animal biology, Lviv

This article presents the test data on growth promoting factor & electromagnetic field of ultrahigh frequency impact on the cow ovary cell proliferation. The various cultivated cell concentrations proved to produce variable effect on culture growth rate. The constant biological technical cycle was implemented by ovary cell cultivation. The above-mentioned cycle was elaborated for oocyte maturation & embryo division regeneration. The new freezing-and-thawing method was developed. Culture growth rate was defined. Biological & chemical characteristics of the culture in the growth-promoting medium were identified.

Key words: cows, epithelial ovary cell cultivation, growth-promoting factors, electrical field of ultrahigh frequency, proliferation, biological & chemical characteristics, growth-promoting medium.

УДК 636.2.082.4:636.2.082.26

КОНСТИТУЦИОНАЛЬНАЯ МИКРОЭВОЛЮЦИЯ ГОЛШТИНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АДАПТИВНОЙ И РЕПРОДУКТИВНОЙ НОРМЫ, А ТАКЖЕ ПУТИ ЕЕ КОРРЕКЦИИ

А.В.Говтвян*

Институт животноводства центральных районов УЛАН

В статье приведены результаты исследований конституциональной микроэволюции популяции голштинов разных классов нормированного распределения и пути ее коррекции в период акклиматизации. Установлено, что разведение голштинов с учетом класса нормированного распределения по типам конституции, позволяет вести оптимизирующую селекцию, состоящую в выявлении и подборе пар для получения «средних» по энергоемкости фенотипов, относящихся к адаптивной и репродуктивной норме и компромиссного сочетания умеренного направленного отбора, стабилизирующего приспособленность потомства к окружающей среде, со стабилизирующим отбором.

Ключевые слова: конституция, стабилизирующий отбор, микроэволюция, голштины, метаболизм, биоэнергетика, акклиматизация.

Продуктивность животных определяется их размерами, строением тела и конституцией, которая находится в функциональной зависимости с величиной интегрированных мерных признаков. Тип конституции охватывает все функциональные и морфологические особенности организма, в том числе его метаболизм и биоэнергетику, определяющую биологические и продуктивные качества пород и типов крупного рогатого скота [1-6, 8-9].

Цель исследований заключалась в изучении конституциональной микроэволюции, метаболизма, биоэнергетики и продуктивности коров голштинской породы разных классов нормированного распределения по типам

* Научный руководитель Барабаш В. И., доктор сельскохозяйственных