

Висновки. Вірогідно доведено ($p < 0,05$), що найбільш швидко та легко умовний статевий рефлекс формується у кнурців з сильним жвавим ТНД та з сильним неврівноваженим ТНД.

У віковому аспекті, найкраще починати формувати умовний статевий рефлекс у кнурців з п'ятимісячного віку. Це дозволить у молодшому віці закінчити оцінку кнурів за якістю нащадків, що в свою чергу дає змогу вибраковувати кнурів-погіршувачів та зменшити витрати на утримання.

Бібліографічний список

- 1.Беликов А.А. Искусственное осеменение – основной метод воспроизводства свиней //Сборник научных трудов. Вып. 37.– Харьков. – 1994 .- С.24.
- 2.Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990, с.113-122.
- 3.Методические рекомендации по организации и технике искусственного осеменения свиней. – Харьков. - 1987.
- 4.Сердюк С.И. Организация и технология воспроизводства свиней. – М.: Колос, 1978.- С.140.

В статье приводятся результаты исследований формирования условного полового рефлекса у хрячков с разным типом нервной деятельности и разным возрастом.

The article investigation of develop conditioned sex reflex from young boars has been studies with different type nervous activity and different age's are reported.

УДК 636.32/.38:591.31

ЗМІНА ВІДНОСНИХ ПОКАЗНИКІВ ПЛОЩІ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ РАННІХ ЗАРОДКІВ ОВЕЦЬ В ПРОЦЕСІ ЇХ РОЗВИТКУ

І.В.Лобачова

Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф.Іванова "Асканія-Нова"
Національний науковий селекційно-генетичний центр з вівчарства

Встановлено, що загальна площа плазматичної мембрани бластомерів пізніх морул овець збільшується майже в 2,5 раза у порівнянні з аналогічним показником вихідних незрілих ооцитів. Проте це збільшення менше теоретично розрахованого, що пояснюється зменшенням загального об'єму бластомерів.

ооцит, бластомер, плазматична мембрана

У розвитку ранніх зародків, як *in vitro*, так і *in vivo*, існує дві критичні фази: перша – перехід зародків від 8 до 16-ти клітин, друга – трансформація морул в бластоцисти. В організмі перша фаза долається при просуванні зародка із яйцепроводу у порожнину рогу матки, *in vitro* – додаванням до культурального середовища соматичних клітин статевих органів, або сироватки крові. Подолання другого критичного етапу пов'язано з компактизацією морули. При цьому має місце утворення максимально тісних зв'язків між

зовнішніми бластомерами зародка, що супроводжується набуттям внутрішньоклітинною масою ембріона кулькоподібної форми.

Візуальні спостереження над зародками, одержаними *in vitro* і *in vivo*, свідчать про відсутність тісних зв'язків між бластомерами 2-16-клітинних ембріонів. Це підтверджується порівняно легкою дисоціацією таких зародків на окремі бластомери у безкальцієвому середовищі. З розвитком зародків процес дисоціації ускладнюється, що свідчить про формування тісніших між-бластомерних зв'язків. Разом з тим, за нашими спостереженнями, збільшення вмісту сироватки у культуральному середовищі може викликати компактизацію бластомерів навіть 2-клітинних зародків овець з наступною зупинкою їх розвитку. Це свідчить, що частина структур, які формують міжклітинні контакти ранніх зародків, можуть створюватись ще під час мейотичного дозрівання ооцитів. Так, за даними Barron et al. [1], майже весь пул протеїну Sx32, який є однією з складових частин компонентів контактів з щільною, у передімплантаційних зародках миші має материнське походження. Разом з тим, існують дані про активізацію транскрипції генів, які кодують синтез окремих протеїнів мембранних комплексів, вже на 2-4-клітинних стадіях [2]. Тому питання природи і часу формування структур, які зумовлюють міжклітинні контакти ранніх зародків, потребує додаткового вивчення.

Метою нашої роботи було дослідження співвідношення загальної площі плазматичної мембрани бластомерів зародків овець до площі плазматичної мембрани початкових ооцитів для відповіді - за якою закономірністю змінюється щільність мембранних структур міжклітинних контактів материнського походження в процесі розвитку зародка.

Матеріали та методи досліджень. У дослідженнях використано фотографії ранніх зародків овець, які одержували власноруч, а також взяті із статей різних авторів [3, 4, 5]. До обробки брали зародки незалежно від їх породної належності, але з точно визначеною стадією розвитку і які за морфологією були оцінені авторами як відмінні та добрі. Використовували метод математичного моделювання розвитку зародкових клітин, який наближували до закономірності розвитку ембріонів в організмі, і статистичні методи вимірювання показників загальної площі поверхні плазматичних мембран і об'єму бластомерів реальних зародків. Об'єм і площу поверхні об'єктів, за формою наближених до кулі, обраховували за формулами (1) і (2), об'єктів, за формою наближеною до стиснутого еліпсоїду оберту, за формулами (3) і (4):

$$S_{\text{поверхні}} = 4\pi(R_{\text{об'єкта}})^2 \quad (1); \quad V_{\text{об'єкта}} = \frac{4\pi(R_{\text{об'єкта}})^3}{3} \quad (2);$$

$$S_{\text{поверхні}} = 2\pi R_1 \left(R_1 + \frac{R_2^2}{2c} \ln \frac{R_1 + c}{R_1 - c} \right) \quad (3); \quad V_{\text{об'єкта}} = \frac{4}{3} \pi R_1^2 R_2 \quad (4),$$

де R_1 - радіус великої осі еліпса, R_2 - радіус малої осі еліпса, а $c = \sqrt{R_1^2 - R_2^2}$ [6].

Результати вимірювань опрацьовували статистично з обчисленням середніх показників, відхилень від середніх і коефіцієнтів варіації C_v .

Результати досліджень. Першим етапом досліджень було створення моделі розвитку зародка від стадії незрілого ооциту до стадії 64-клітинної морули. Питанням, яке при цьому вивчали, було з'ясування закономірності зміни співвідношення загальної площі поверхні усіх бластомерів до площі початкового ооцита. При створенні моделі попередньо постулювали такі положення: 1) усі новоутворені бластомери приймають кульоподібну форму; 2) загальний об'єм усіх бластомерів зародка в процесі розвитку залишається незмінним і дорівнює об'єму початкового ооцита; 3) поділ окремого бластомера веде до формування двох однакових за розміром бластомерів; 4) в одному зародку можливе одночасне існування бластомерів лише двох різних розмірів.

На рисунку 1 наведено схему розвитку теоретичного ооцита до 6-клітинної стадії, яка наближена до реальної.

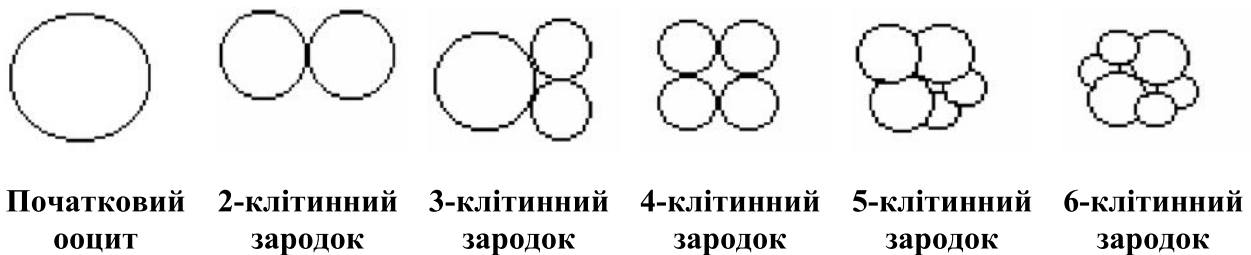


Рис. 1. Схема розвитку теоретичного ооцита до 6-клітинної стадії

Зміну співвідношення площин поверхні k вимірювали як співвідношення площі загальної поверхні всіх бластомерів зародка до площі поверхні початкового ооцита,

$$k = \frac{S_{\text{ооцита}}}{S_{\text{зародка}}}.$$

Площу ооцита вимірювали за формулою (1), а загальну площу усіх бластомерів зародка за формулою:

$$S_{\text{зародка}} = n4\pi(R_{\text{бластомера}i})^2 + m4\pi(R_{\text{бластомера}i+1})^2,$$

де n - кількість бластомерів радіусом R_i ,

m - кількість бластомерів радіусом R_{i+1} .

При цьому завжди $R_i > R_{i+1}$. Радіус $R_{\text{бластомера}i}$ окремого бластомера знаходили за формулою:

$$R_{\text{бластомера}i} = \sqrt[3]{\frac{3V_{\text{ооцита}}}{4\pi b_i}},$$

де b_i - одне з чисел сукупності $\{1, 2, 4, 8, 16, 32, 64\}$.

У таблиці 1 наведено значення перемінних n , m і b_i для теоретичних зародків різних стадій розвитку.

1.Значення перемінних n , m і b_i для теоретичних зародків різних стадій розвитку

Пере- мінна	Загальна кількість бластомерів у зародку, шт										
	ооцит	2	3	4	5	6	7	8	16	32	64
n	1	2	1	4	3	2	1	8	16	32	64
m	0	0	2	0	2	4	6	0	0	0	0
b_i	1	2	2	4	4	4	4	8	16	32	64

Тоді, знаходили $k_{теор}$ як функцію від n , m і b :

$$k_{теор} = \frac{4\pi(R_{ооцита})^2}{4\pi n(\frac{3V_{ооцита}}{4\pi b_i})^{2/3} + 4\pi m(\frac{3V_{ооцита}}{4\pi b_{i+1}})^{2/3}},$$

де $b_{i+1}=2b_i$. Після скорочення одержали:

$$k_{теор} = \frac{1}{n(\frac{1}{b_i})^{2/3} + m(\frac{1}{b_{i+1}})^{2/3}}, \quad \text{або} \quad k_{теор} = \frac{b_i^{2/3}}{n + \frac{m}{2^{2/3}}}.$$

Наступним етапом роботи було безпосереднє вимірювання коефіцієнта k для реальних зародків. Загальну площу поверхні і об'єм бластомерів вимірювали як суму площин і об'ємів окремих бластомерів. Для 2-х і 4-х-клітинних зародків до загальної суми додавали також показники S і V полярних тіл. Основною формою бластомерів наближено вважали кулю або еліпсоїд оберту.

Площу плазматичної мембрани і об'єм початкового ооцита розраховували, виходячи із 2-х положень: 1) внутрішній діаметр зони пелюцида у процесі розвитку зародка від стадії незрілого ооцита до стадії 64-клітинної морули не змінюється; 2) радіус внутрішньоклітинної маси початкового ооцита дорівнює внутрішньому радіусу ($R_{взн}$) зони пелюцида досліджуваного зародка.

Як видно з таблиці 2, загальна площа плазматичної мембрани всіх бластомерів теоретичного зародка в процесі його розвитку збільшується. По досягненні ним стадії 64-клітинної морули їх загальна площа в чотири рази перевищує площу плазматичної мембрани початкового ооцита. У такій самій пропорції має зменшуватись і щільність міжклітинних контактів, які локалізовані на цитоплазматичній мембрані бластомерів і мають материнське походження, за умови їх рівномірного розподілу по поверхні.

Вимірний показник k для реальних зародків з їх просуванням до більш розвинутих стадій, у цілому, також зменшується, хоча це зниження і має свої особливості. Так, на стадії 2-х бластомерів загальна площа плазматичних мембран менша за площу мембрани початкового ооцита. Ще відчутніше зниження загальної площі плазматичної мембрани має місце при попередньому відокремленні полярного тіла і формуванні перівітелінового простору (стадія метафаза2 розвитку ооцита).

2. Виміряні показники $k_{теор}$ і $k_{реал}$ для зародкових клітин овець різних стадій розвитку

Стадія розвитку	$k_{теор}$	Експериментальні показники				
		N	$k_{реал}$		$V_{ооцита}/V_{зародка}$	
			$M \pm m$	Cv	$M \pm m$	Cv
Ооцит 2-го порядку на стадії зародкового пухирця	1	-	1	-	1	-
Ооцит на стадії метафаза 2	-	2	1,155±0,061	5,305	1,268±0,066	5,146
2 бластомеру	0,7937	3	1,065±0,082	10,85	1,647±0,222	19,06
3 бластомеру	0,7024	-	-	-	-	-
4 бластомеру	0,62996	2	0,719±0,021	2,95	1,192±0,111	9,29
5 бластомерів	0,5915	-	-	-	-	-
6 бластомерів	0,5575	1	0,703	-	1,495	-
7 бластомерів	0,5272	-	-	-	-	-
8 бластомерів	0,5	5	0,708±0,041	11,46	1,687±0,14	16,65
16 бластомерів	0,3969	2	0,654±0,057	8,74	2,119±0,277	13,09
32 бластомеру	0,31498	1	0,44	-	1,644	-
64 бластомеру	0,25	5	0,418±0,021	10,23	2,143±0,138	12,83

З просуванням зародків до більш розвинутих стадій загальна площа бластомерів зростає, а показник $k_{реал}$ зменшується, але для всіх досліджених стадій він перевищує контрольний $k_{теор}$. Ця відмінність між $k_{теор}$ і $k_{реал}$ обумовлена спостереженим зменшенням загального об'єму бластомерів зародка $V_{зародка}$ в процесі розвитку. Показник $V_{ооцита}/V_{зародка}$ для реальних зародків змінювався неадекватно. Можна припустити, що суттєвими факторами, які впливають на результати вимірювань, можуть бути як осмотичність розчину, який різні автори застосовували при вилученні зародків, так і індивідуальні особливості тварин, що слугували джерелом ембріонів. Проте такий характер зміни $V_{ооцита}/V_{зародка}$, на нашу думку, може відображувати й особливості живлення зародкових клітин. Так, саме на 2-4-клітинній стадії відбувається слабка експресія власних генів зародків [7], що може зумовити збільшення надходження поживних речовин і води всередину бластомерів і, як наслідок, збільшення їх розміру. У подальшому, зі збільшенням рівня дисиміляційних процесів загальний об'єм внутрішньоклітинної маси зародка послідовно зменшується, сягаючи найнижчого показника на стадії пізньої морули.

Таким чином, в процесі розвитку зародка від незрілого ооцита до стадії пізньої морули загальна площа поверхні його бластомерів збільшується майже у 2,5 рази. У такій самій пропорції має зменшуватись і щільність мембранних структур міжклітинних контактів, які мають материнське походження. Проте, напевно, на перших стадіях розвитку кількість їх залишається достатньою. Саме вони можуть ініціювати спостережену нами компактизацію 2-клітинних зародків овець під впливом сироватки в культурі *in vitro*. Сила цих зв'язків достатня, щоб викликати зупинку розвитку зародків.

Як показали дослідження, компактизація морул є необхідним етапом для формування бластоцист. Так, інжекція антизмістової РНК [8], або обробка компактизованих морул миші антитілами до структурних компонентів міжклітинних контактів [9] веде до декомпактизації бластомерів і порушень розвитку. Можна припустити, що при компактизації утворюється своєрідне середовище, ізольоване від дії зовнішніх факторів хімічної природи, яке і спонукає перехід внутрішніх бластомерів у нетотіпотентний стан, тобто до формування ембріобласту.

Існують три типи міжклітинних контактів: щільні контакти (*tight junctions*), у вигляді стрічкових і крапкових десмосом (*desmosomes*) і контакти з щілиною (*gap junctions*). Два останніх формують крапкові контакти, а перші два у змозі створювати лінійні структури, які продовжуються на значну відстань [10]. Роль контактів із щілиною полягає, в основному, в забезпеченні можливості обміну клітин між собою низькомолекулярними речовинами, роль десмосом – в утворенні механічних контактів клітин одна з одною. Проте найменша відстань між клітинами, яку вони можуть забезпечити, сягає 15-20 нм, що майже у 50 разів більше за радіус, наприклад, іону Ca^{2+} . І лише щільні контакти (*tight junctions*) у змозі створити більш-менш хімічну ізоляцію міжклітинних просторів від контактів з зовнішнім середовищем.

Електронно-мікроскопічними дослідженнями щільних контактів встановлено, що вони утворюються шляхом своєрідного “злипання” глобул інтегрованих білків плазматичних мембран сусідніх клітин з тісним переплетенням їх протеїнових ланцюгів [10]. У літературі відсутні дані про тип будови і розподіл по поверхні бластомерів структурних компонентів щільних контактів у ранніх зародках тварин. Головна увага зосереджена, в основному, на вивченні контактів з щілиною. При цьому, беруть до уваги їх роль у адгезії клітин, прикріпленні клітин до субстратів. Багато даних свідчить про ініціюючу роль контактів з щілинами у компактизації морул. Разом з тим дослідженнями Wrenzicky et. al. [11] виявлено відсутність експресії гену, що кодує коннексин43 (Cx43), одного з складових частин білкового комплексу контактів з щілиною, у бластоцистах корів, одержаних *in vitro*. Проте формування бластоцист відбувалось, тобто, попередня компактизація морул мала місце.

На нашу думку, структурні елементи контактів з щілиною, внаслідок присутнього на них електричного потенціалу, можуть ініціювати зближення плазматичних мембран бластомерів, створюючи таким чином передумови для формування тісніших контактів. Як свідчать наші розрахунки, такі стартові умови може забезпечити пул структурних елементів міжклітинних контактів материнського походження, щільність яких, хоча і зменшується у процесі розвитку зародка, але все ж таки має залишатися достатньою. Такий погляд цілком узгоджується з результатами багатьох досліджень про важливу роль кон-

тактів з щільною в компактизації морул і одночасну відсутність експресії генів, які кодують структурні компоненти таких контактів [11]. Разом з тим, для остаточного ствердження до уваги слід брати також можливість пластичності плазматичних мембран, тобто, можливості переходу інтегрованих і полуінтегрованих протеїнів у цитоплазму клітини під впливом факторів зовнішнього середовища, що може зменшувати кількість структур міжклітинних контактів материнського походження на мембранах бластомерів. Цілком ймовірно, що цей процес іноді може набути значних обсягів, приводячи до майже повного зникнення структурних елементів міжклітинних контактів материнського походження на плазматичних мембранах бластомерів. За умови відсутності синтезу власних білків таких контактів розвиток зародків за таким сценарієм зупиниться на стадії пізньої морули, що часто спостерігається при культивуванні ооцитів поза організмом. Проте для остаточного ствердження потрібні додаткові поглиблені дослідження.

Саме здатністю сироватки крові ініціювати створення міжбластомерних контактів можна пояснити демонстрований нею біфазовий ефект впливу на розвиток ранніх зародків *in vitro*: гальмування розвитку 2-8-клітинних ембріонів і підвищення виходу розширених бластоцист [12].

Бібліографічний список

1. Barron B.J., Valdemarsson G., Paul D.L., Kidder G.M. Connexin 32, a gap junction protein, is persistent oogenetic product through preimplantation development of the mouse. // *Developmental Genetics*. – 1989. – V.10. – P. 318-323.
2. Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J.W., Niemann H. Expression from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. // *J. of Repr. and Fert.* - 1998. - V. 112. - P. 387-398.
3. Шинкаренко И.С. Физиологические особенности размножения каракульских овец асканийского многоплодного типа: Дисс....канд. биол. наук.: 06.02.01/ Аскания-Нова, 1973. – 24 с.
4. Питкянен И.Г. Об оплодотворении и первых стадиях развития зародышей овец // *Известия АН СССР. Сер. биол.* – 1958. - №3. – С. 291-298.
5. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. – М.: Из-во с.-х. лит-ры, 1962. – 696 с.
6. Каплан И.А. Практические занятия по высшей математике: Учебное пособие. – Харьков, 1970. – 576 с.
7. Viu St.D., Avery B., Greve T., King W.A., Hyttel P. Transcriptional activity in *in vitro* produced bovine two- and four-cell embryos. // *Mol. Repr. and Dev.* – 1996. – V. 43, №2. – P. 171-179.
8. Bevilacqua A., Loch-Caruso R., Erickson R.P. Abnormal development and dye coupling produced by antisense RNA to gap junction protein in mouse

preimplantation embryos. // Proceeding of National Academy of Sciences USA. – 1989. – V. 86. – P. 5444-5448.

9. Lee S., Bilula N.B., Warner A.E. Gap junction assembly in the preimplantation mouse conceptus is independent of microtubules, microfilaments, cell flattening, and cytokinesis. // Cell. – 1987. – V. 51. – P. 851-860.

10. Заварзин А.А., Харазова А.Д. Основы общей цитологии: Учебное пособие. – Л.: Из-во Ленингр. ун-та. – 1982. – 240 с.

11. Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J.W., Niemann H. Expression of gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. // J. of Repr. and Fert. – 1996. – V. 108. – P. 17-24.

12. Pinyopummintr T., Bavister B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effect of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. // Theriogenology. – 1994. – V. 41. – P. 1241-1249.

Общая площадь плазматической мембраны бластомеров поздних морул овец увеличивается почти в 2,5 раза в сравнении с аналогичным показателем исходных незрелых ооцитов. Это увеличение, однако, меньше теоретически рассчитанного, что объясняется уменьшением общего объема бластомеров.

The total area of plasmatic membranes of blastomeres in sheep late morulae had been increased approximately in 2,5 times in comparison with similar indices for beginning unmaturred oocytes. This increasing, however, is less from theoretically calculated one that is explained by decreasing of total blastomeres size.

УДК 636.932.3

РЕАКЦІЇ ПОВЕДІНКИ ТА ФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАН НУТРІЙ ПРИ РІЗНИХ РЕЖИМАХ УТРИМАННЯ

Ю.М. Марков, І.А. Помітун, А.В. Лещенко

Інститут тваринництва УААН

У статті представлені результати зоотехнічних, етологічних та фізіологічних досліджень при порівняльній оцінці різних режимів утримання молодняку нутрій: в загонах без басейну для купання, з басейном для купання, з використанням душевих установок.

нутрія, режим утримання

Для ефективного розведення, вирощування та використання нутрій як для одержання цінного хутра, так і дієтичного м'яса необхідно провести уточнення та обґрунтування цілого ряду важливих зоотехнічних та технологічних нормативів їх утримання. Наукою і практикою поки що не вирішене питання, як краще утримувати нутрій: з доступом до води для купання, без доступу до води, чи, можливо, необхідно застосовувати альтернативну систему утримання.

Методика досліджень. Нами проведено зоотехнічні, етологічні та фізіологічні дослідження при порівняльній оцінці різних режимів утримання молодняку нутрій від 2 до 7-місячного віку. Для цього були сформовані 3 групи