

be added to semen dilution in 0,35:2,5 mM proportion. This correlation procures semen viability, survival rate & fertilizing capacity. The technique is applied by the bull semen preparation for freezing.

Key words: bull, ejaculate, sperm, spermatozoon, physiological characteristics, antioxidants, fertilizing capacity.

УДК 636.4:578.083:591.162

ВПЛИВ ЧАСУ ДОЗРІВАННЯ ЯЙЦЕКЛІТИН СВИНЕЙ *IN VITRO* НА ЗДАТНІСТЬ ДО ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНОГО РОЗВИТКУ

Л.І. Остаповець¹

Інститут розведення і генетики тварин УААН

*У статті наведені результати вивчення впливу часу дозрівання *in vitro* ооцитів свиней на їх партеногенетичний розвиток. Встановлено, що збільшення часу культивування гамет до 48 год негативно впливає на їх дозрівання, що після активації проявляється зниженим рівнем формування партеногенонів.*

Ключові слова: свині, ооцит-кумулясні комплекси, *in vitro*, ядерне і цитоплазматичне дозрівання, партеногенез, ембріональний розвиток.

Встановлено, що після дозрівання *in vitro* або *in vivo* у більшості видів ссавців розвиток ооциту зупиняється на стадії метафази II мейозу. Цей процес регулюється цитоплазматичним фактором ініціації мейозу (MPF) та цитостатичним фактором (CSF) [0, 0]. При заплідненні активація ооциту індукується сперматозоїдом, проникнення якого ініціює коливання внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію. Збільшення в цитоплазмі іонів кальцію впливає на активність MPF та CSF, що призводить до реініціації мейозу на стадії метафази II мейозу [0]. Використання штучних активаторів (етанол, іонофор кальцію, електростимуляція) також призводить до збільшення цитоплазматичного рівня іонів кальцію та активування яйцеклітин [0].

На здатність активованих яйцеклітин свиней до ембріонального розвитку, крім активуючого фактору, впливає і біологічна повноцінність самих гамет [0, 0]. Мейотичне дозрівання ооцитів свиней, яке проявляється морфологічно за екструзією першого полярного тільца, спостерігається в яйцеклітинах свиней вже після 24 годин культивування *in vitro*. Встановлено, що ооцити свиней, які дозрівали протягом 36 годин, після запліднення *in vitro* мали нижчий потенціал ембріонального розвитку, ніж після 44-годинного культивування [0], або партеногенетичного активування після 42 або 48 годин культивування [0]. Тому лише після 40 годин дозрівання ооцити набувають повноцінного цитоплазматичного дозрівання [0]. Загалом період ядерного дозрівання ооцитів свиней довший порівняно з ооцитами великої рогатої худоби [0] та коней [0]. Встановлено, що збільшення часу культивування (перезрівання) ооцитів свиней, порівняно з ооцитами корів, після їх активування *in vitro* негативно впливало на подальший ембріональний розвиток [0]. Більш тривалий період дозрівання *in vitro* ооцитів свиней до стадії метафази II мейозу більше за все викликає деструктивні зміни компонентів цитоскелету [0]. Тому пошук оптимального періоду культивування *in*

¹ Науковий керівник – канд. біол. наук С.І.Ковтун

vitro ооцитів свиней дасть можливість підвищити рівень активування та подальшого розвитку партеногенетичних ембріонів. Метою наших досліджень було вивчити ефективність раннього ембріонального розвитку партеногенонів свиней в залежності від часу дозрівання ооцитів свиней *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень. Вилучення ооцит-кумулюсних комплексів (ООК) свиней з яєчників забитих на бойні тварин проводили шляхом розрізання фолікулів у середовищі 199 з 25 мМ Hepes (Sigma), яке містило 10 % сироватки крові корів. Відібрані ООК для дозрівання переносили в середовище ТС 199 на розчині Ерла (Sigma), яке містило 20 % еструсної сироватки корів і співкультивували протягом 44; 46 та 48 годин у присутності клітин гранульози ($3-5 \times 10^6$ клітин/мл) при температурі 38,8 °С в атмосфері повітря з 4 % CO₂. Через зазначений термін культивування проводили активування яйцеклітин свиней до партеногенетичного розвитку 7 %-вим розчином етанолу. Після проведення активування гамети культивували в середовищі 199 на розчині Ерла з додаванням 3 мг/мл БСА. Приготування сухоповітряних препаратів ембріонів проводили за допомогою модифікованого методу Тарковського. Цитогенетичний аналіз клітин, забарвлених 2%-вим розчином Гімза, проводили під мікроскопом МБД-15.

Результати досліджень. Встановлено, що після 44; 46 та 48 годин культивування ОКК свиней *in vitro* близько 95,0 % гамет були задовільного морфологічного стану. На основі одержаних раніше даних цитогенетичного аналізу з вивчення часових параметрів дозрівання ооцитів свиней *in vitro*, які свідчать про необхідність культивування ОКК не менше 44 годин, нами відмічено, що близько 60,5 % яйцеклітин мали виділене перше полярне тіло, яке свідчить про повноцінність ядерного дозрівання [0]. Після активування яйце-

клітин свиней етанолом до ембріонального розвитку (таблиця) встановлено, що 44-годинне культивування *in vitro* забезпечує формування найбільшої кількості ранніх ембріонів (рисунок).

Примітка: $a:b - P < 0,05$; $a:c - P < 0,001$.

Вплив часу активування *in vitro* ооцитів свиней на рівень отримання ранніх партеногенонів

Тривалість дозрівання ооцитів, годин	Кількість активованих ооцитів	Кількість (%) 2-4-клітинних зародків
44	46	21 ^a (45,7)
46	37	7 ^b (18,9)
48	73	11 ^c (15,1)

Після впливу активуючого агенту на яйцеклітини свиней, які дозрівали *in vitro* 46 і 48 годин, розвиток ембріонів був суттєво нижчий порівняно з більш повноцінними гаметами, які дозрівали 44 години. Це можна пояснити негативним впливом подовження часу культивування ооцит-кумулюсних комплексів *in vitro*, що

Рис. Триклітинні мейотичні партеногенетичні ембріони свиней, об.8х, ок.10х.



спричиняє зростання рівня хромосомних порушень гамет, які забезпечують зниження ефективності формування партеногенетичних ембріонів. Така гіпотеза підтверджується даними цитогенетичного аналізу яйцеклітин свиней після 44; 46 і 48 годин дозрівання *in vitro*, результати якого свідчать про суттєво вищу кількість (41,7 %) гамет зі хромосомними порушеннями після 48 годин культивування ОКК [0]. Проведений цитогенетичний аналіз 2-4-клітинних партеногенетичних ембріонів свиней виявив наявність інтерфазних морфологічно нормальних ядер, кількість яких відповідала кількості бластомерів.

Висновок. Подовження терміну дозрівання *in vitro* ооцитів свиней до 48 годин негативно впливає на біологічну повноцінність ооциту, що знаходить своє відображення у зниженому рівні отримання партеногенетичних ембріонів на ранніх стадіях розвитку.

Бібліографічний список

1. Кузнецова І.Б., Кузнецов В.Є., Лукашенко О.О. Активация ооцитів корів до партеногенетичного розвитку етанолом // Цитология и генетика. - 2000. - Т.34, №1. - С. 57-64.
2. Остаповець Л.І. Хромосомні перетворення ооцитів свиней під час дозрівання *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. - К: Аграрна наука. - 2003. - С. 433-438.
3. Grupen C.G., Nagashima H., Nottle M.B. Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured *in vitro*: a cause of polyspermic fertilization? // Reprod. Fertil. Dev. - 1997. - V. 9. - P. 187-191.
4. Kikuchi K., Izaike Y., Noguchi J., Furukawa T., Daen F.P., Naito K., Toyoda Y. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro* // Reprod. Fertil. - 1995. - V. 105. - P. 325-330.
5. Kubiak J.Z., Weber M., Pennart H., Winston N.J., Maro B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF // The EMBO Journal. - 1993. - V. 12. - P. 3773-3778.
6. Lechniak D. The incidence of polyploidy and mixoploidy in early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization // Genet. Sel. Evol. - 1996. - V. 28. - P. 321-328.
7. Nussbaum D.J., Prather R.S. Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation // Mol. Reprod. Dev. - 1995. - V. 41. - P. 70-75.
8. Prather R.S., Eichen P.A., Nicks D.K., Peters M.S. Artificial activation of porcine oocytes matured *in vitro* // Mol. Reprod. Dev. - 1991. - V. 28. - P. 405-409.
9. Sosnowski J., Lechniak D., Brzozowska M., Switonski M. Cytogenetic analysis of horse oocytes matured *in vitro* for different periods of time // Reprod. Nutr. Dev. - 1997. - V. 37. - P. 63-68.
10. Whitaker M. Control of meiotic arrest // Rev. Reprod. - 1996. - V. 1. - P. 127-135.
11. Yamauchi N., Sasada H., Sugawara S., Nagai T. Effect of culture conditions on artificial activation of porcine oocytes matured *in vitro* // Reprod. Fertil. Dev. - 1996. - V. 8. - P. 1153-1156.

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ СОЗРЕВАНИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК СВИНЕЙ *IN VITRO* НА ПОТЕНЦИАЛ К ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОМУ РАЗВИТИЮ

Л.И. Остаповец, Институт разведения и генетики животных УААН

В статье изложены результаты исследований по изучению влияния времени созревания *in vitro* ооцитов свиней на их партеногенетическое развитие. Показано, что увеличение времени культивирования гамет *in vitro* до 48 часов

отрицательно влияет на полноценность их созревания, что после активации проявляется в сниженном уровне формирования партеногенонов.

Ключевые слова: свиньи, ооцит-кумуляные комплексы, in vitro, ядерное и цитоплазматическое созревание, партеногенез, эмбриональное развитие.

IN-VITRO EGG CELL MATURATION TERM IMPACT ON PARTHENOGENETIC CAPACITY

L.Ostapovetz, the institute of breeding & genetics of the animals

This article highlights the experimental research results on in-vitro pig oocytes maturation term impact on parthenogenesis. 48hour gamete cultivation prolongation affects negatively maturation. Parthenogenone level decreases after activation.

Key words: swine, gene complexes, in-vitro, nucleus & cytoplasm ripening, parthenogenesis, embryonic development.

УДК 636.2.082.453.5

ИЗУЧЕНИЕ АНТИШОКОВОГО ДЕЙСТВИЯ И САНИТАРНЫХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ МОДИФИКАТОРОВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПРИ КОНСЕРВИРОВАНИИ СПЕРМЫ БЫКОВ

Л.Н. Павленко, Б.М. Павленко

Институт животноводства УААН

М.П. Павленко

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической
ветеринарной медицины»

Приведены данные изучения биохимических параметров, антишокового действия, санитарного состояния и биологической стабильности консервантов спермы, изготовленных на основе фитогидролизатов. Доказана возможность использования их в составе криосреды, взамен куриного желтка.

Ключевые слова: сперма, консервант, желток, антишоковый компонент, стерилизация, криорезистентность, выживаемость, оплодотворяемость.

Современная индустрия репродукции в молочном скотоводстве базируется на широком внедрении искусственного осеменения коров и тёлочек глубокозамороженной спермой. При консервировании спермы холодом, обязательным компонентом криопротекторной среды является нативный желток из-за обилия в нём фосфолипидов и липопопротеидов, которые, взаимодействуя с плазматическими мембранами спермиев, модифицируют их в направлении повышения прочности и стабильности. [3-5, 9]. Адсорбируясь липофильными и гидрофильными участками плазматических мембран, липоидные комплексы почти в три раза утолщают клеточную мембрану, что усиливает устойчивость гамет к повреждающим температурным, осмотическим, иммунным, физико-химическим и механическим факторам [5-9]. Поэтому желточные разбавители стали основой производственных технологий консервирования спермы животных [14]. Вместе с тем, вследствие ряда существенных недостатков, желток не является идеальным компонентом искусственных сред. Основным из них является его термолабильность, что лишает возможности надёжно стерилизовать желтоксодержащие среды общедоступными способами [11]. Доказано, что желток