

УДК 57.085.23:636.4

## РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ КУЛЬТИВУВАННЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ *IN VITRO* ЗА ОСЦИЛЯЦІЇ рН І ТЕМПЕРАТУРИ СЕРЕДОВИЩА ЇХ ДОЗРІВАННЯ

Корчан Н.О., <sup>1</sup>Галкін О.Ю.

*Полтавський національний педагогічний університет ім. В.Г. Короленка  
36000, Україна, Полтава, вул. Остроградського, 2*

<sup>1</sup> *Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»  
03056, Україна, Київ, просп. Перемоги, 37*

nataly.korchan@gmail.com

Усі ланки біотехнологічного процесу отримання ембріонів *in vitro* поступаються ефективністю перед такими, що мають місце *in vivo*. Аналіз літературних даних переконливо свідчить про те, що біотехнологію отримання ембріонів *in vitro* можна значно покращити, якщо хоча б деякі умови середовища культивування ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) і ембріонів, які повсюдно надмірно стабілізують, замінити на примусово осцилюючі з відомими біоритмами. Щодо середовища культивування ОКК *in vitro* нами застосовано осциляцію рН з добовим біоритмом та розроблено й використано осциляцію температури з приблизно одногодинним біоритмом. Уперше у світовій практиці показано, що застосування біоритмічно осцилюючих параметрів культивування ОКК *in vitro* не зменшує приріст їхнього діаметра порівняно з використанням постійних умов. Це – лише перший крок на шляху перспективного упровадження біоритмічно осцилюючих параметрів культивування біологічних мікрооб'єктів у біотехнології.

*Ключові слова: біотехнологія, осциляція, рН, температура, ооцит-кумулясний комплекс (ОКК), in vitro, парадигма постійності.*

Корчан Н.А., Галкин А.Ю.<sup>1</sup>РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ *IN VITRO* ПРИ ОСЦИЛЛЯЦИИ рН И ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ ИХ ДОЗРЕВАНИЯ / Полтавский национальный педагогический университет им. В.Г. Короленко, 36000, Украина, Полтава, ул. Остроградского 2, <sup>1</sup>Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», 03056, Украина, Киев, просп. Победы, 37

Все звеня биотехнологического процесса получения эмбрионов *in vitro* уступают в эффективности тем, что имеют место *in vivo*. Анализ литературных данных убедительно свидетельствует о том, что биотехнологию получения эмбрионов *in vitro* можно значительно улучшить, если хотя бы некоторые условия среды культивирования ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) и эмбрионов, которые всюду чрезмерно стабилизируют, заменить на принудительно осциллирующие с известными биоритмами. Относительно среды культивирования ОКК *in vitro* нами применена осцилляція рН с суточным биоритмом, а также разработана и использовалась осцилляція температуры с приблизительно одночасовым биоритмом. Впервые в мировой практике показано, что использование биоритмично осциллирующих параметров культивирования ОКК *in vitro* не уменьшает прирост их диаметра сравнительно с использованием стабильных условий. Это лишь первый шаг на пути перспективного внедрения биоритмично осциллирующих параметров культивирования биологических микрообъектов в биотехнологии.

*Ключевые слова: биотехнология, осцилляція, рН, температура, ооцит-кумулясний комплекс (ОКК), in vitro, парадигма постоянства.*

Korchan N.O., Galkin O.Yu.<sup>1</sup> CREATION CUMULUS OOCYTE COMPLEXES CULTURE TECHNOLOGY *IN VITRO* UNDER OSCILLATION рН AND TEMPERATURE OF THEIR MATURATION MEDIUM / Poltava National Pedagogic University named after V.G. Korolenko, Ukraine, 36000 Poltava, Ostrogradskii st., 2, <sup>1</sup> National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”, Ukraine, 03056 Kyiv, Peremohy av., 37

Working out of technology for obtaining preimplantation embryos *in vitro* is an important scientific task. This problem is resolving by many scientists all over the world. Impressing results are achieved on this way. Nevertheless, every step of biotechnology process for embryo obtaining *in vitro* is less effective than those is in vivo. Literature data analysis convincingly indicate biotechnology for embryo obtaining

may be significantly improved if some culture conditions for cumulus oocyte complexes (COCs) and embryos, which are everywhere over stabilized, were forced to be oscillating with familiar biorhythms. Development of biological object is not only programmed but also is determined by influences of environmental changes. There are not constant or stable conditions in nature, particularly – in mammalian organism. Physiological processes are principally nonlinear. Values of many organism parameters change with several biorhythms. Important role of biorhythmic changes in values of an organism parameters is in favoring transition between its opposite states and processes, for example – between anabolism and catabolism. Theory and practice of biology and medicine indicate an action of specific factors for development of an organism and cells can be substituted to some extent and added by nonspecific ones, particularly by temperature and concentration of different ions. Concerning medium for COCs culture *in vitro*, we developed and applied method of pH oscillation with circadian period, and method of temperature oscillation with circadian period. For the first time in world practice, we have shown applying biorhythmically oscillation parameters for COCs culture *in vitro* does not decrease diameter gain when compared with use of constant conditions. This is only the first step on the way of perspective introduction biorhythmically oscillation parameters for culture of biological microobjects in biotechnology. Results of our work are following. It is developed technology of COCs *in vitro* culture in medium temperature of which is forced to be oscillating in the range from 37 to 39 °C with circadian period. It is developed technology of COCs *in vitro* culture in medium pH of which is forced to be oscillating in the range from 7.2 to 8.1 units with circadian period. There is not significant difference between rates of COCs diameter gain at oscillating versus constant temperature and at oscillating versus constant pH. Principal cause of this is likely short term of COCs culture – only 24 hours. Though we have shown oscillatory culture conditions to be not worse than constant ones literature data and our theoretical ground convincingly give evidence about great perspectives namely oscillatory culture conditions as nonspecific factors stimulating growth and development of COCs *in vitro*. So, paradigm of stability is limited, and homeostasis is not only stable but oscillating too. Taken into account perspectives of the further investigations, it seems to be necessary to study the impact of using oscillatory temperature and oscillatory pH on *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro* and on *in vitro* culture of the embryos obtained in this way. Because, the longer the culture continues at oscillating both temperature and pH the bigger would be difference between results of culture at constant conditions versus oscillating ones with advantage of latter's.

*Key words: biotechnology, oscillation, pH, temperature, cumulus oocyte complexes (COCs), in vitro, paradigm of constancy*

## ВСТУП

Розробка технології отримання доімплантаційних ембріонів *in vitro* – важливе наукове завдання, над яким працюють науковці усього світу. На цьому шляху досягнуто вражаючих результатів. Тим не менше, усі ланки біотехнологічного процесу отримання ембріонів *in vitro* поступаються ефективністю перед такими, що мають місце *in vivo*. Покращення розвитку ооцит-кумуляусних комплексів (ОКК) *in vitro* теж залишається не вирішеною проблемою.

Фізіологічні процеси принципово нелінійні. Перехід клітин з одного крайнього фізіологічного стану, у якому переважають анаболічні процеси, в інший, у якому переважають катаболічні процеси, подібний до коливання механічного маятника, осциляції. Результат розвитку біологічного об'єкта-процесу не лише запрограмований, а визначається й впливом зовнішніх умов середовища. З усіх відомих способів використання зовнішніх умов середовища для покращення росту й розвитку клітин і ембріонів найбільш адекватним їхній природі є спосіб застосування та підтримання біоритмічної осциляції величин параметрів цих умов. Найвідоміша й найзрозуміліша теоретична підстава для розширення застосування осциляції умов середовища розвитку гамет, клітин і ембріонів – природна біоритмічна осциляція величин їхніх параметрів і зовнішнього оточення. Найзагальніша теоретична підстава – сприяння взаємопереходу протилежних властивостей біооб'єктів в їх кількісних і якісних змінах.

Теорія й практика біології та медицини свідчать про те, що дію специфічних факторів росту й розвитку живого можна деякою мірою замінити та доповнити дією неспецифічних факторів [1, 2, 3, 11], зокрема, зміною температури та концентрацій різних іонів, особливо катіонів водню [9, 10, 19, 20]. Та разом із тим є дослідження, які наштовхують на думку

про шкідливість будь-якого маніпулювання з температурою середовища культивування, окрім підтримання її постійною [21, 22]. Але інші факти свідчать про те, що парадигма постійності (стабільності) є обмеженою. Так, показано, що запліднення ооцитів ссавців *in vitro* породжує в них осциляцію [18]. І хоча в зиготах миші така осциляція триває зовсім недовго, порівняно з тривалістю культури доімплантаційних ембріонів *in vitro* [14], якщо її підтримувати й далі, розвиток ембріонів значно покращується [15, 16].

А тому можна сподіватися на успішне застосування біоритмічної осциляції рН і температури як факторів, що стимулюють ріст і розвиток ОКК. У зв'язку з цим метою роботи стала розробка технологій створення осциляції рН і температури *in vitro* для культивування ОКК за цих умов. Розробка цієї біотехнології включала створення таких технологій і систем біоритмічної осциляції рН і температури *in vitro*, які дозволили б культивувати в таких умовах ОКК, а в майбутньому – і доімплантаційні ембріони.

### МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

ОКК отримували з яєчників свині, привезених з м'ясокомбінату. Яєчники транспортували в термосі при температурі, не нижчій ніж 20°C. Час від узяття першого яєчника до початку виділення ОКК – від 2 год до 3 год. У лабораторії, в універсальній настільній бактерицидній камері УНБК-1, в яку вмонтовано бінокулярний мікроскоп, яєчник обмивали стерильним фізіологічним розчином з температурою від 25° С до 39° С. ОКК разом з фолікулярною рідиною (ФР) вилучали з фолікулів піпеткою з металевою голкою.

Використовували фолікули з діаметром, не меншим за 2 мм. Відсмоктану піпеткою ФР з ОКК виприскували у флакончик об'ємом 20 мл. Зібраній у такий спосіб ФР з ОКК давали відстоятися 5 хв, щоб останні осіли на дно. ФР відбирали, залишаючи ОКК на дні флакона, й центрифугували її 5 хв за 3 тис. об./хв. Центрифуговану ФР додавали в кількості 10 або 20% до середовища дозрівання ОКК. Залишок ФР з ОКК знову збовтували й виливали в чашку Петрі, у якій ОКК відшукували й переносили в середовище дозрівання. Деякі елементи цієї й наступних методик викладені в роботах [12, 13].

ОКК розсаджували наздогад у дослідні та контрольні скляні чашки з поживним середовищем. Скляні чашки культивування власноручно виготовляли з флаконів з-під інсуліну. Діаметр чашки – 15 мм, висота – 10 мм.

Температуру й рН контрольного середовища дозрівання підтримували постійними. Температуру й рН дослідного середовища дозрівання примушували осцилювати. Перед постановкою ОКК на культуру вимірювали їхній діаметр.

Чашки з ОКК вкладали в газові камери, у яких їх продували газовою сумішшю з CO<sub>2</sub> й повітря. Флакони вкладали в термостат та термоосцилятор.

Для дозрівання ОКК використовували середовище NCSU, яке готували самостійно за літературним прописом [17]. Його склад такий: хлорид натрію – 108,7 мМ, хлорид калію – 4,78 мМ, лактат кальцію п'ятиводний – 1,71 мМ, калій фосфорнокислий однозаміщений – 1,19 мМ, сульфат магнію семиводний – 1,19 мМ, глутамін – 1,0 мМ, глюкоза – 5,55 мМ, таурин – 7,0 мМ, гіпотаурин – 5,0 мМ, піруват натрію – 0,33 мМ, гідрокарбонат натрію – 25,07 мМ, гентаміцину сульфат – 20 мкг/мл, цистеамін – 0,57 мМ. Отримане середовище стерилізували фільтруванням за допомогою власноручно зібраної установки. Вакуум створювали вакуумним компресором. Приготоване середовище продували газовою сумішшю, що давала рН від 7,3 од. до 7,4 од., й зберігали в холодильнику. Напередодні культивування середовище розливали по скляних камерах, по 0,7 мл й нашаровували на нього вазелінову олію, теж по 0,7 мл. Скляні камери з середовищем вкладали в газові

камери, або витягували з них за допомогою спеціального пінцета. Стерильне середовище доповнювали 10% або 20% ФР, 10 МО/мл хоріонічного гонадотропіну людини та 10 МО/мл хоріонічного гонадотропіну коня, гормонами, які повсюдно додаються до середовища культивування ОКК свині [10].

Через 24 год. культивування ОКК їхній діаметр вимірювали повторно й визначали процент його відносного приросту за формулою Броді [8]:

$$\text{процент відносного приросту} = 2 \times 100 \times [(M2 - M1)] / [(M2 + M1)],$$

де M1 – діаметр ОКК до культивування, M2 – діаметр ОКК через добу культивування.

Осциляцію рН середовища культивування з добовим періодом створювали за методом Денисюка [4, 5] за новим призначенням [7]. Для цього використовували спеціально сконструйовані газові камери – алюмінієві бокси з напівпроникними для газів трубками із силіконової гуми [5]. ОКК переносили в скляні камери з середовищем дозрівання, на яке попередньо нашаровували вазелінову олію. Ці камери вкладали в газові камери. Останні продували сумішшю CO<sub>2</sub> з повітрям, яка надавала середовищу мінімальний рН у 7,2 од. й уставляли в термостат або термоосцилятор залежно від того, який варіант культивування здійснювали – лише осциляцію рН, чи й осциляцію температури. Через добу рН середовища ставав значно лужним завдяки виходу CO<sub>2</sub> із середовища у простір газової камери, а потім із нього – в повітряний простір термостата чи термоосцилятора за градієнтом його концентрації. У цей час, за умов досягнення максимального рН середовища, скляні камери витягували з газових, розглядали ОКК й вимірювали їхній діаметр. Вимірювали також діапазон осциляції рН.

Осциляцію температури з 40-хвилинним періодом у термостаті ТС-80 створювали в такий спосіб укладали в термостат закриті пляшки з водою [6].

Термостат приєднували до електричної мережі через декілька послідовно з'єднаних таймерів фірм «Vrilux» та «Feron», розробивши графік почергового, через кожні 20 хв, увімкнення-вимкнення термостата, й відповідно запрограмували на умикання-вимикання таймери.

Амплітуду осциляції температури регулювали шляхом зміни в термостаті об'єму води. Чим менший об'єм води містився в термостаті, тим більшою була амплітуда осциляції температури. Робота термостата в такому режимі перетворює його в термоосцилятор. Температуру в камері культивування вимірювали ртутним термометром.

На рис. 1 наведено графік синусоїдальної зміни температури середовища культивування з 40-хвилинним періодом у термоосциляторі. Величину амплітуди осциляції температури вимірювали вранці.

Як газову фазу середовища культивування використовували суміш 5% CO<sub>2</sub> з повітрям. Суміш CO<sub>2</sub> з повітрям створювали шляхом змішування потоків CO<sub>2</sub>, з балона, і повітря, яке подавали за допомогою акваріумного компресора. Змішування потоків газів проводили в колбі Боброва, заповненій бідистильованою водою. Потрібної для культивування величини постійного рН досягали шляхом збільшення чи зменшення одного з газових потоків за безперервного контролю цього показника середовища культивування рН-метром [2, 4, 5].

Усього було досліджено 22 культури. Усі дослідження проведені в лабораторії фізіології Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН України.



Рис. 1. Графік зміни температури середовища культивування ОКК з 40-хвилинним періодом її осциляції в термоосциляторі.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розроблено технологію культивування ОКК *in vitro* із застосуванням біоритмічної осциляції рН і температури як факторів стимуляції їх росту й розвитку.

Порівняння процента приросту діаметра ОКК за постійної та осцилюючої температури, незалежно від інших умов культивування (табл. 1), показує відсутність достовірних відмінностей між цими величинами.

Таблиця 1 – Приріст діаметра ОКК за постійної та осцилюючої температури

	Температура культивування					
	постійна, n = 395			осцилююча, n = 393		
	діаметр, од.		приріст, %	діаметр, од.		приріст, %
	початковий	кінцевий		початковий	кінцевий	
M± m	15,21±0,17	23,32±0,43	43,75±3,68	14,57±0,18	23,18±0,48	44,61±3,13

Примітка. Відмінність між відповідними значеннями приросту не достовірною.

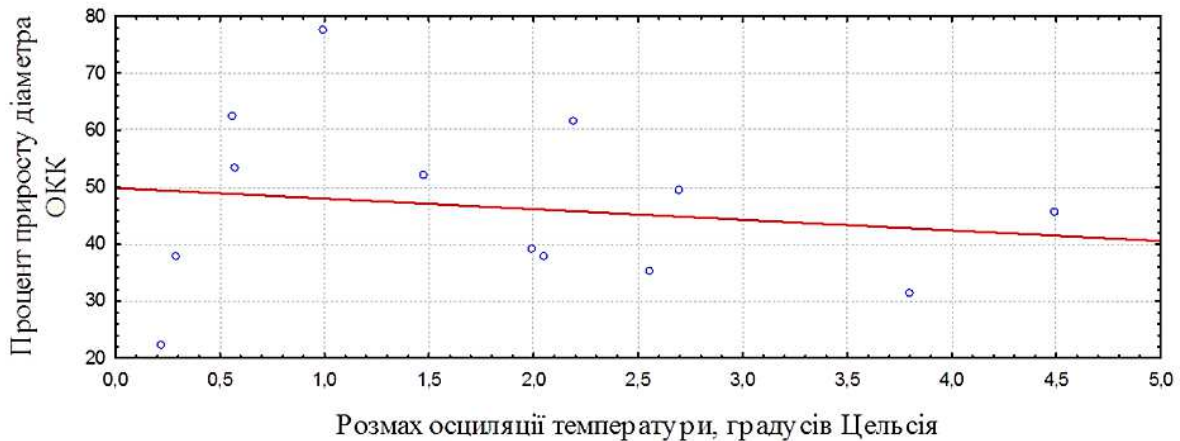
Так само, відсутня достовірною різниця й між процентом приросту діаметра ОКК за постійного та осцилюючого рН, не залежно від інших умов культивування (табл. 2). В обох випадках її можна пояснити недостатньою тривалістю культивування. Можна припустити, що якщо процес культивування подовжити до запліднення ооцитів і культивування ембріонів до стадії бластоцисти, відмінність у впливові постійного й осцилюючого факторів на ці біологічні об'єкти стане достовірною. Потрібно також віднайти найкращий діапазон осциляції рН і температури.

Виявлена слабка й недостовірною кореляція між приростом діаметра ОКК і величиною розмаху осциляції температури (рис. 2).

Таблиця 2 – Приріст діаметра ОКК за постійного та осцилюючого рН

	рН культивування					
	постійний, n = 293			осцилюючий, n = 268		
	діаметр, од.		приріст,%	діаметр, од.		приріст,%
	початковий	кінцевий		початковий	кінцевий	
M±m	15,51±0,19	25,16±0,51	47,04±3,69	14,82±0,19	23,29±0,47	43,12±2,90

Примітка. Відмінність між відповідними значеннями приросту не достовірна.

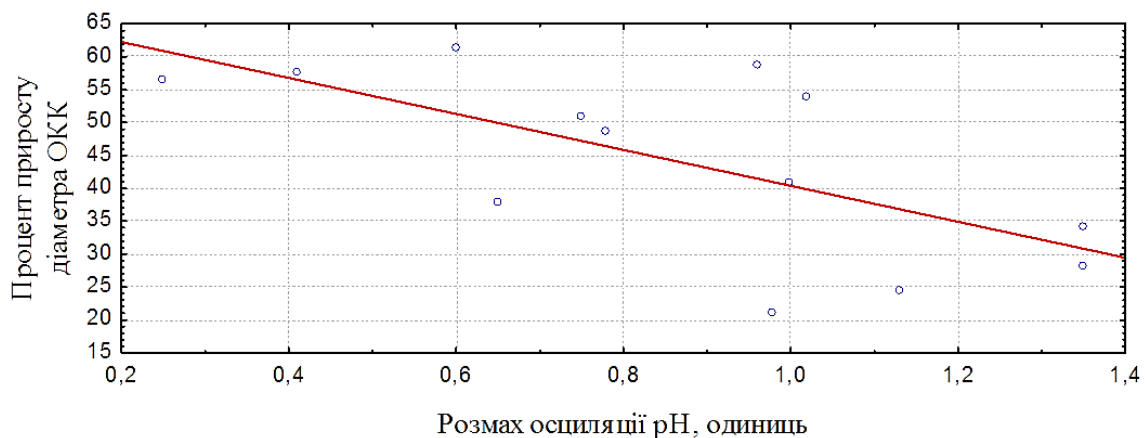


Процент приросту діаметра ОКК за осцилюючої температури:  $y = 49,8723 - 1,8613x$ ;  $r = -0,1671$ ;  $p = 0,5854$ ;  $r^2 = 0,0279$

Рис. 2. Залежність процента приросту величини середнього діаметра ОКК від величини розмаху осциляції температури ( $r$  – коефіцієнт кореляції;  $r^2$  – коефіцієнт регресії)

На підставі цих даних можна припустити, що розмах осциляції, менший за  $0,5$  °С, активує слабо, а розмах осциляції, що перевищує  $2,2$  °С, починає пригнічувати розростання все більшої кількості ОКК.

Процент приросту діаметра ОКК за осцилюючого рН середовища культивування негативно з середньою силою достовірно корелював з величиною розмаху осциляції рН (рис. 3).



Процент приросту діаметра ОКК за осцилюючого рН:  $y = 67,7381 - 27,3505x$ ;  $r = -0,6521$ ;  $p = 0,0157$ ;  $r^2 = 0,4252$

Рис. 3. Залежність процента приросту величини середнього діаметра ОКК від величини розмаху осциляції рН ( $r$  – коефіцієнт кореляції;  $r^2$  – коефіцієнт регресії)

Якщо зважати на всю картину цієї залежності, можна дійти висновку, що рис. 3 вказує на шкідливість застосування осциляції рН. Але потрібно зважити на такі обставини. Точки на графіку цієї залежності, які відповідають розмаху рН в 1,35 од., отримані за відносно малої величини початкового середнього діаметра ОКК, – 10-те й 12-те місце в ранжованому ряду від більшої величини до меншої серед 13-ти величин, відповідно до 13-ти культур. Точка на графіку цієї залежності, яка відповідає розмаху рН в 1,13 од., отримана за найменшої величини початкового середнього діаметра ОКК, – 13-те місце в цьому ранжованому ряду. Як бачимо, розмір початкового середнього діаметра дуже впливає на цю закономірність. Точка на графіку цієї залежності, яка відповідає розмаху рН в 0,98 од., отримана за величини початкового середнього діаметра ОКК, яка займає 2-ге місце в цьому ранжованому ряду. Вона фактично випадає з множини результатів, отриманих за осцилюючого рН. Адже результат виявився найгіршим в ранжованому ряду, – 13-те місце з-поміж 13-ти результатів. А розмах осциляції рН в 0,96 та 1,02 од. дав хороші результати. Щоб бути обережним, слід припустити, що розмах осциляції рН, більший за 1,0 од., може бути тим шкідливішим, чим він більший за 1,0 од. Виходячи з того, що середній розмах осцилюючого рН по 13-ти культурам –  $0,86 \pm 0,1$  од., рН можна піддавати осциляції в діапазоні від 7,2 од. до  $8,06 \pm 0,1$  од. (до 7,96-8,16 од.). Не слід забувати й про можливу нелінійність залежності процента приросту діаметра ОКК від величини розмаху осциляції рН середовища їх дозрівання. Припускаємо, що в подальшому можливе точніше визначення величини оптимального розмаху осциляції рН із метою отримання оптимального приросту діаметра ОКК за їх дозрівання *in vitro*.

### ВИСНОВКИ

Розроблено технологію культивування *in vitro* ОКК у середовищі, температуру якого піддають осциляції в діапазоні від 37 °С до 39 °С з 40-хвилинним періодом. Розроблено технологію культивування *in vitro* ОКК у середовищі, рН якого піддають осциляції в діапазоні від 7,2 од. до 8,1 од. з періодом в одну добу. Було показано, що немає достовірної відмінності між процентами приросту діаметра ОКК за постійної та осцилюючої температури. Доведено, що немає достовірної відмінності між процентами приросту діаметра ОКК за постійного та осцилюючого рН. Хоча експериментально нами показано, що осцилюючі умови культивування не гірші за постійні, наведені літературні дані, й наше відповідне обґрунтування, беззаперечно свідчать про перспективність використання саме осцилюючих умов як неспецифічних факторів, що стимулюють ріст і розвиток ОКК *in vitro*.

Враховуючи перспективи подальших досліджень, вважаємо, що потрібно дослідити вплив застосування осцилюючих рН і температури на запліднення *in vitro* дозрілих *in vitro* ооцитів та на подальший розвиток отриманих у такий спосіб ембріонів. Адже чим довше продовжуватиметься культура за осцилюючих рН і температури, тем більшою буде імовірність того, що збільшиться відмінність між результатами культивування за постійних умов, з одного боку, та за осцилюючих, з іншого, імовірно, – на користь осцилюючих умов.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Денисюк П.В. Принципиально новый метод культивирования доимплантационных эмбрионов млекопитающих / П. В. Денисюк, Н. А. Мартыненко // Доповіді НАН України. – 1995. – № 11. – С. 148-149.
2. Денисюк П. В. Вплив рН середовища на розвиток *in vitro* доімплантаційних ембріонів свині: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.13. «Фізіологія людини і тварин» / П. В. Денисюк. – Х., 1997. – 25 с.

3. Денисюк П. В. Теоретичні та експериментальні основи осциляторного способу утримання птахів і ссавців / П.В. Денисюк, О.Г. Чирков // Наук. вісн. ЛНАВМ ім. С. З. Гжицького. – 2004. – Т. 6, № 3, Ч. 3. – С. 42–52.
4. Пат.10067 А, Україна, клас 5 С12 N5/00 Спосіб культивування доімплантаційних ембріонів ссавців поза організмом / Денисюк П.В.; заявник і патентоутримувач Інститут свинарства УААН. – № 93111621; заявл. 23.04.1993; опубл. 30.09.1996, Бюл. № 3.
5. Пат. 46186 А, Україна, клас 6 А61М1/14, С/12N5/06. Спосіб примусової осциляції рН середовища культивування біологічних мікрооб'єктів / Денисюк П.В.; заявник і власник патенту Інститут свинарства УААН. – № 98094883; заявл. 17.09.1998; опубл. 15.05.2002, Бюл. № 5.
6. Пат. 62419 Україна, МПК (2011.01) А01 63/00. Спосіб культивування поза організмом ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) за температури, осцилюючої з одноденним періодом / Корчан Н.О., Денисюк П.В.; заявник і власник патенту Інститут свинарства ім. О. В. Квасницького НААН України. – № u201101851; заявл. 17/02/2011; опубл. 25.08.2011. Бюл. № 16.
7. Пат. 68013 Україна, МПК (2012.01), С12N 5/00, А61М 1/00. Застосування примусової біоритмічної осциляції рН середовища культивування поза організмом як способу, призначеного для збільшення міри розростання ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) / Корчан Н.О., Денисюк П.В.; заявник і власник патенту Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН України. – № u 2011 10439; заявл. 29.08.2011; опубл. 12.03.2012, Бюл. № 5.
8. Brody S. Bioenergetics and growth. With special reference to the efficiency complex in domestic animals / Brody S. – N.Y. : Hafner, 1945. – 1023 p.
9. Cooke S. Objective assessment of temperature maintenance using *in vitro* culture techniques / S. Cooke, J.P.P. Tyler, G. Driscoll // J. of Assisted Reprod. and Genetics. – 2002. – Vol. 19, № 8. – P. 368-375.
10. Ju J. C.Nuclear and cytoskeletal alterations of *in vitro* matured porcine oocytes under hyperthermia / J.C. Ju, J.K. Tseng // Mol. Reprod. and Dev. – 2004. – Vol. 68, Is. 1. – P. 125-133.
11. Koike T. *In vitro* culture with a tilting device in chemically defined media during meiotic maturation and early development improves the quality of blastocysts derived from *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes / T. Koike, K. Matsuura, K. Naruse, H. Funahashi // J. Reprod. Dev. – 2010. – Vol. 56, № 5. – P. 552 – 557.
12. Effects of *in vitro* fertilization conditions on preimplantation development and quality of pig embryos / D.B. Koo, Y.J. Kim, I. Yu et al. // Anim. Reprod. Sci. – 2005. – Vol. 90, Is. 12. – P. 101-110.
13. Krisher R. L. Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals / Krisher R. L. – John Wiley & Sons, 2013. – 248 c.
14. Marangos P. Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei / P. Marangos, G. Fitzharris, J. Carroll // Development. – 2003. – Vol. 130. – P. 1461-1472.
15. Ozil J. P. Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach / J.P. Ozil // Biophys. Chem. – 1998. – Vol. 72, № 1–2. – P. 141-152.



16. Ozil J. P. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signal in the mouse / J. P. Ozil, S. Markoulaki, S. Toth et al. // *Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 282. – P. 39-54.
17. Petters R. M. Culture of pig embryos / R. M. Petters, K. D. Wells // *J. Reprod. Fertil.* – 1993. – Suppl. 48. – P. 61-73.
18. Saunders C.M. PLC zeta: a sperm – specific trigger of  $Ca^{2+}$  oscillations in eggs and embryo development / C.M. Saunders, M.G. Larman, J. Parrington et al. // *Development.* – 2002. – Vol. 129, N. 15. – P. 3533-3544.
19. Shi D. S. Effects of temperature gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes / D. S. Shi, B. Avery, T. Greve // *Theriogenology.* – 1998. – Vol. 50, № 4. – P. – 667-674.
20. Suzuki H. Influence of incubation temperature on meiotic progression of porcine oocytes matured *in vitro* / H. Suzuki, Y. Takashima, K. Toyokawa // *J. Mamm. Ova Res.* – 2001. – Vol. 18. – P. 8-13.
21. Tseng J.K. *In vitro* thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine / J.K. Tseng, P.C. Tang, J.C. Ju // *Theriogenology.* – 2006. – Vol. 66(5). – P. 1073-1082.
22. Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes *in vitro* / Y. Yuan, Z. D. Hao, J. Liu et al. // *Theriogenology.* – 2008. – Vol. 70. – Is. 2. – P. 168 - 178.

#### REFERENCES

1. Denisjuk P.V. Principial'no novyj metod kul'tivirovanija doimplantacionnyh jembrionov mlekopitajushhih / P.V. Denisjuk, N.A. Martynenko // *Dopovidi NAN Ukraini.* – 1995. – № 11. – S. 148 149.
2. Denisjuk P.V. Vpliv pH seredovishha na rozvitok *in vitro* doimplantacijnih embrioniv svini : avtoref. dis. na zdobuttja nauk. stupenja kand. biol. nauk : spec. 03.00.13. «Fiziologija ljudini i tvarin» / P. V. Denisjuk. – H., 1997. – 25 s.
3. Denisjuk P.V. Teoretichni ta eksperimental'ni osnovi osciljatornogo sposobu utrimannja ptahiv i ssavciv / P.V Denisjuk, O.G. Chirkov // *Nauk. visn. LNAVIM im. S. Z. Izhic'kogo.* – 2004. – T. 6., № 3, Ch. 3. – S. 42–52.
4. Pat. 10067 A, Ukraina, klas 5 S12 N5/00 Sposib kul'tivuvannja doimplantacijnih embrioniv ssavciv poza organizmom / Denisjuk P.V.; zajavnik i patentoutrimuvach Institut svinarstva UAAN. – № 93111621; zajavl. 23.04.1993; opubl. 30.09.1996, Bjul. № 3.
5. Pat. 46186 A, Ukraina, klas 6 A61M1/14, S/12N5/06. Sposib primusovoi osciljacii pH seredovishha kul'tivuvannja biologichnih mikroob'yektiv / Denisjuk P.V.; zajavnik i vlasnik patentu Institut svinarstva UAAN. – № 98094883; zajavl. 17.09.1998; opubl. 15.05.2002, Bjul. № 5.
6. Pat. 62419 Ukraina, MPK (2011.01) A01 63/00. Sposib kul'tivuvannja poza organizmom oocit-kumuljuszni kompleksiv (OKK) za temperaturi, osciljujuchoi z odnogodinnim periodom / Korchan N.O., Denisjuk P. V.; zajavnik i vlasnik patentu Institut svinarstva im. O.V. Kvasnic'kogo NAAN Ukraini. – № u201101851; zajavl. 17/02/2011; opubl. 25.08.2011. Bjul. № 16.
7. Pat. 68013 Ukraina, MPK (2012.01), S12N 5/00, A61M 1/00. Zastosuvannja primusovoi bioritmichnoi osciljacii pH seredovishha kul'tivuvannja poza organizmom jak sposobu, priznachenogo dlja zbil'shennja miri rozrostanja oocit-kumuljuszni kompleksiv (OKK) / Korchan N.O., Denisjuk P. V.; zajavnik i vlasnik patentu Institut svinarstva i agropromislovogo virobnictva NAAN Ukraini. – № u2011 10439; zajavl. 29.08.2011; opubl. 12.03.2012, Bjul. № 5.
8. Brody S. Bioenergetics and growth. With special reference to the efficiency complex in domestic animals / Brody S. – N.Y. : Hafner, 1945. – 1023 p.
9. Cooke S. Objective assessment of temperature maintenance using *in vitro* culture techniques / S. Cooke, J.P. P. Tyler, G. Driscoll // *J. of Assisted Reprod. and Genetics.* – 2002. – Vol. 19, № 8. – P. 368-375.
10. Ju J. C. Nuclear and cytoskeletal alterations of *in vitro* matured porcine oocytes under hyperthermia / J.C. Ju, J.K. Tseng // *Mol. Reprod. and Dev.* – 2004. – Vol. 68, Is. 1. – P. 125-133.

11. Koike T. *In vitro* culture with a tilting device in chemically defined media during meiotic maturation and early development improves the quality of blastocysts derived from *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes / T. Koike, K. Matsuura, K. Naruse, H. Funahashi // *J. Reprod. Dev.* – 2010. – Vol. 56, №. 5. – P. 552 – 557.
12. Effects of *in vitro* fertilization conditions on preimplantation development and quality of pig embryos / D. B. Koo, Y.J. Kim, I. Yu et al. // *Anim. Reprod. Sci.* – 2005. – Vol. 90, Is. 12. – P. 101-110.
13. Krisher R. L. *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals* / Krisher R. L. – John Wiley & Sons, 2013. – 248 с.
14. Marangos P.  $Ca^{2+}$  oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei / P. Marangos, G. Fitzharris, J. Carroll // *Development.* – 2003. – Vol. 130. – P. 1461-1472.
15. Ozil J. P. Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach / J.P. Ozil // *Biophys. Chem.* – 1998. – Vol. 72, №. 1–2. – P. 141-152.
16. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained  $[Ca^{2+}]_{(cyt.)}$  signal in the mouse / J. P. Ozil, S. Markoulaki, S. Toth et al. // *Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 282. – P. 39-54.
17. Petters R. M. Culture of pig embryos / R. M. Petters, K. D. Wells // *J. Reprod. Fertil.* – 1993. – Suppl. 48. – P. 61-73.
18. Saunders C.M. PLC zeta: a sperm – specific trigger of  $Ca^{2+}$  oscillations in eggs and embryo development / C.M. Saunders, M.G. Larman, J. Parrington et al. // *Development.* – 2002. – Vol. 129, N. 15. – P. 3533-3544.
19. Shi D. S. Effects of temperature gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes / D.S. Shi, B. Avery, T. Greve // *Theriogenology.* – 1998. – Vol. 50, № 4. – P. 667-674.
20. Suzuki H. Influence of incubation temperature on meiotic progression of porcine oocytes matured *in vitro* / H. Suzuki, Y. Takashima, K. Toyokawa // *J. Mamm. Ova Res.* – 2001. – Vol. 18. – P. 8-13.
21. Tseng J.K. *In vitro* thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine / J. K. Tseng, P.C. Tang, J.C. Ju // *Theriogenology.* – 2006. – Vol. 66(5). – P. 1073-1082.
22. Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes *in vitro* / Y. Yuan, Z. D. Hao, J. Liu et al. // *Theriogenology.* – 2008. – Vol. 70. – Is. 2. – P. 168 - 178.

УДК 612:591.1(075.8)

## **ОСОБЛИВОСТІ ПОКАЗНИКІВ КАРДІОРЕСПІРАТОРНОГО БЛОКУ СТУДЕНТІВ, ЯКІ МЕШКАЮТЬ У СІЛЬСЬКІЙ МІСЦЕВОСТІ ТА В УМОВАХ МІСТА**

Кучковський О.М., Малько М.М., Занкова Г.А.

*Запорізький національний університет  
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

olegk181@gmail.com

Щорічно багато молодих людей із різних еколого-соціальних середовищ вступають до ВНЗ і стають студентами. При цьому змінюються не тільки умови навчання, але і, у випадку зі студентами з інших міст та сільської місцевості, умови проживання, людина стає більш самостійною. Усі ці зміни вимагають додаткових механізмів адаптації до нових умов. Були вивчені фізіологічні показники кардіореспіраторного блоку студентів, які мешкають у сільській місцевості та в умовах міста. У сільських дівчат спостерігається функціональна напруга в показниках серцево-судинної системи, що є результатом зміни звичної обстановки, а в міських дівчат відмічена напруга в показниках дихальної системи, що пояснюється низьким рівнем індивідуального здоров'я.

*Ключові слова: адаптація, кардіореспіраторний блок, першокурсники, навчальний процес.*