

REFERENCES

1. Zubets', M. V., V. P. Burkat, Yu. F. Mel'nyk, [et al.]. 2007. *Metodolohichni aspekty zberezhennya henofondu sil's'kohospodars'kykh tvaryn - Methodological aspects of gene pool preservation of farm animals*. Nauk. red. I. V. Huzyev. Kyiv, Ahrarna nauka, 120 (in Ukrainian).
2. Kruhlyak, A. P. 2001. Yakist' zamorozhenoyi spermy, shcho zberihalasya ponad 40 rokiv – The quality of frozen semen that was stored for over 40 years. *Rozvedennya i henetyka tvaryn - Animal Breeding and Genetics*. Kyiv, Ahrarna nauka, 34: 66–67 (in Ukrainian).
3. Kurbatov, A. D., and E. M. Platov 1998. *Kriokonservatsiya spermy sel'skokhozyaystvennykh zhyvotnykh – Cryopreservation of sperm of farm animals*. Leningrad, Agropromizdat, 186 (in Russian).
4. Lyashenko, A. O. 2014. Vplyv terminiv zberihannya spermy buhayiv ridkisnykh i lokal'nykh porid na morfolohichni i morfometrychni pokaznyky. Effect of long-term storage the semen of bull rare and local breeds on morphological and morphometric parameters. Instytut roslynnytstva im. V. Ya. Yur'yeva NAAN. *Visnyk Tsentru naukovoho zabezpechennya APV Kharkivs'koyi oblasti: naukovo-vyrobnychyy zbirnyk - Bulletin of the Center for scientific support agricultural production of Kharkiv region*. Kharkiv, 17: 237–246 (in Ukrainian).
5. Nauk, V. A. 1991. *Struktura i funkcii spermiev sel'skohozyajstvennykh zhyvotnykh pri kriokonservatsii – Structure and function of sperm cryopreservation in farm animals*. Kyiv, Shtiinca. 199 (in Russian).
6. Ostashko, F. I. 1978. *Glubokoe zamorazhivanie i dlitel'noe hranenie spermy proizvoditelej – Deep freezing and long-term storage of semen producers*. Kyiv, Urozhaj, 256 (in Russian).
7. Prohrama zberezhennya lokal'nykh ta znykayuchykh porid sil's'kohospodars'kykh tvaryn v Ukrayini (z-hidno vymohamy FAO). «Zberezhennya henofondu»: 2013. *Program of preservation the local and endangered breeds of farm animals in Ukraine (according to the requirements of FAO). "Conservation of the gene pool."* Instytut rozvedennya i henetyky tvaryn NAAN - Institute of Animal Breeding and Genetics NAAS. Chubynske, 24 (in Ukrainian).
8. Gravance, C. G., R. Vishwanath, C. Pitt, D. L. Garner, P. J. Casey. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Andrology*. 19 (6): 704–709.
9. Mortimer, S. T. 2000. CASA – practical aspects. *J. Andrology*. 21 (4): 515–524.
10. Sundararaman, M. N, J. Kalatharan, and K. Thilak, Pon Jawahar. 2007. Analyses of morphological and morphometrical deviations of bull spermatozoa by computer assisted semen analysis technique. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2: 196–204.

УДК 636.2.034.612:602

РОЛЬ СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА В СОСТАВЕ СРЕД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ *IN VITRO*

**В. П. СИМОНЕНКО, А. И. ГАНДЖА, Л. Л. ЛЕТКЕВИЧ, И. В. КИРИЛЛОВА,
О. П. КУРАК, Н. В. ЖУРИНА, М. А. КОВАЛЬЧУК**

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» (Жодино, Беларусь)
belniig@tut.by

Усовершенствованный состав питательных сред для созревания ооцитов и культивирования ранних зародышей с использованием соматотропного гормона обеспечивает повышение уровня созревания яйцеклеток до стадии метафаза II до 89,2–

©В.П. Симоненко, А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич,
И. В. Кириллова, О. П. Курак,
Н. В. Журина, М. А. Ковальчук, 2015

91,8 %, при этом уровень дробления составляет 55,4–57,6 %, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке 25,7–27,1 %.

Ключевые слова: ооцит-кумулясный комплекс, вне организма, соматотропный гормон, созревание, оплодотворение, эмбрион

ROLE OF THE SOMATOTROPNY HORMONE AS A PART OF MATURING FOR RECEIVING IN VITRO EMBRYOS

V. P. Simonenko, A. I. Gandzha, L. L. Letkevich, I. V. Kirilova, O. P. Kyrak, N. V. Zhyrina, M. A. Kovalchuk

Republican unitary enterprise «Scientific and Practical Center of National Academy of Sciences of Belarus for Animal Husbandry» (Zhodino, Belarus)

Belniig@tut.by

The advanced structure of nutrient mediums for maturing of oocytes and cultivation of early germs with use of a somatotropny hormone, provides increase of level of maturing of ova to a stage a metaphase II to 89,2-91,8%, thus the level of crushing makes 55,4-57,6%, and an exit of the embryos suitable for change of 25,7-27,1%.

Key words: an oocyte-kumulyusny a complex, in vitro, a somatotropy hormone, maturing, fertilization, an embryo

РОЛЬ СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНУ В СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНІВ IN VITRO

В. П. Симоненко, А. І. Ганджа, Л. Л. Леткевич, І. В. Кирилова, О. П. Курак, Н. В. Журина, М. А. Ковальчук

Республіканське унітарне підприємство «Науково-практичний центр Національної академії наук Білорусі з тваринництва» (Жодино, Білорусь)

Belniig@tut.by

Удосконалений склад поживних середовищ для дозрівання ооцитів і культивування ранніх зародків з використанням соматотропного гормону забезпечує зростання рівня дозрівання яйцеклітин до стадії метафази II до 89,2–91,8 %, при цьому рівень дроблення складає 55,4–57,6 %, а вихід ембріонів, придатних до пересадки 25,7–27,1 %.

Ключові слова: ооцит-кумулясний комплекс, поза організмом, соматотропний гормон, дозрівання, запліднення, ембріон.

Многие страны мира стремятся к достижению лидерства в области биотехнологии и это является главным и приоритетным заданием их экономической политики. Биотехнология в животноводстве использует биологические процессы для получения необходимых продуктов и особей определенного генотипа нетрадиционными способами.

Одним из нерешенных вопросов в настоящее время является состав питательных сред для культивирования гамет и эмбрионов крупного рогатого скота в системе *in vitro*.

Фолликуло- и оогенез – строго координированный процесс взаимодействия гипофизарных и стероидных гормонов, обеспечивающий нормальное созревание яйцеклетки в окружении фолликулярных элементов. Если механизм и характер действия гонадотропных гормонов (ФСГ и ЛГ) достаточно хорошо известен, то процесс вовлечения в сложную систему гормональной регуляции такого гормона, как соматотропин (СТГ), изучен недостаточно. Выявлены *in vitro* многочисленные эффекты СТГ, ИФР (инсулиноподобный фактор роста) и инсулина на стероидогенез, пролиферацию и жизнеспособность клеток овариальных фолликулов коров и наличие у последних специфических рецепторов к этим гормонам. Кроме того, у животных с повышенной концентрацией в крови СТГ, сопряженной с резистентностью клеток печени к стимулирующему воздействию этого гормона на синтез

ИФР I, наблюдается повышение активности яичников, что свидетельствует о самостоятельной роли СТГ в регуляции фолликулогенеза коров.

После извлечения клеток из организма и помещения их в искусственные условия культуральная среда должна обеспечивать все внешние условия, которые клетки имели *in vivo*. Это обеспечивает выживание клеток, их пролиферацию и дифференцировку. Внеклеточная среда должна обеспечивать клетки питательными и гормональными факторами, т.е. обладать всем необходимым для роста и выживания клеток. Клетки животных предъявляют определенные требования к жидкой (питательная среда) и газообразной (концентрация газов) фазе. Успех в культивировании биообъектов зависит от правильного выбора питательной среды и тщательности её приготовления. Питательная среда представляет собой раствор определенного состава, к которому добавляются компоненты биологического происхождения (добавки плазмы, сыворотки крови, тканевые экстракты и т.д.).

Созревание фолликулов и ооцитов в яичниках млекопитающих находится под контролем многочисленных факторов, поступающих из кровеносной системы или синтезируемых локально. Как известно, гонадотропные гормоны являются главными регуляторами овариальной функции. В последние годы было установлено, что два других гормона гипофиза – пролактин и СТГ – также участвуют в регуляции роста и развития овариальных фолликулов [1]. Кроме того, ряд имеющихся данных свидетельствует о влиянии этих гормонов на оогенез у различных видов млекопитающих. В частности, было установлено, что у мышей с инактивированным геном для лактогенного или соматотропного рецептора нарушается или ослабляется репродуктивная функция, в том числе нормальный процесс созревания ооцитов [2]. У женщин с пониженным содержанием СТГ в крови и фолликулярной жидкости наблюдалось снижение оплодотворяемости и качества ооцитов, а также жизнеспособности полученных *in vitro* эмбрионов [3]. Обработка овец СТГ во время суперовуляции приводила к повышению оплодотворяемости яйцеклеток *in vivo* и последующего качества эмбрионов [4]. При этом у различных видов млекопитающих в ооцитах и окружающих их кумулюсных клетках обнаружено наличие соматотропных и лактогенных рецепторов или их РНК [5].

Но хотя сам метод существует уже довольно давно, потребности культивируемых клеток и оптимальные условия для их развития *in vitro* окончательно не определены. Поэтому актуальным остаются поиск и создание определенных питательных сред для культивирования клеток крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований Исследования выполнены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Яичники получали на Минском, Борисовском мясокомбинатах и убойном цехе ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области после убоя животного путем отсекания от матки с помощью ножниц. Доставляли материал в лабораторию в стерильном солевом растворе Хенкса с добавлением 200 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина в бытовом термосе. Перед извлечением яйцеклеток из яичников их дважды промывали раствором Хенкса с добавлением антибиотиков. Извлечение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичников лезвием безопасной бритвы в растворе Хенкса в чашке Петри с добавлением 10 ед./мл гентамицина, 1 ед./мл гепарина и 1 % инактивированной фетальной сыворотки. После выделения ооцитов их поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумулясных комплексов осуществляли по разработанной нами 5-бальной шкале под бинокулярным микроскопом МБС-10 при 16- и 56- кратном увеличении.

Ооцит-кумулясные комплексы помещали в лунки планшета со средой для созревания на основе ТС-199 [Sigma] с добавлением соматотропина в дозах 5 нг/мл (I группа), 10 нг/мл (II группа) и 15 нг/мл (III группа) в CO₂-инкубатор на 24 часа. В качестве контроля использовали среду ТС-199 с добавлением 15 % фетальной сыворотки теленка (IV и VIII группы). Часть созревших ооцитов через 8, 16 и 24 часа очищали от клеток кумулюса с

помощью микропипетки в 0,25%-м растворе трипсина (2,5 мг трипсина на 1 мл физиологического раствора (0,9 г хлорида натрия на 100 мл бидистиллированной воды). Затем помещали очищенные ооциты на обезжиренное предметное стекло в 1%-й раствор цитрата натрия (100 мг цитрата натрия на 9,9 мл бидистиллированной воды) на 5-10 минут. После этого с помощью микропипетки убирали излишки цитрата натрия, выстраивали в ряд и наносили охлажденный до 4-5°C фиксатор (3 мл метанола + 1 мл ледяной уксусной кислоты), высушивали на воздухе и добавляли краску. Через 15 минут готовые препараты помещали для промывки под проточную воду. Оставшуюся часть созревших ооцитов оплодотворяли замороженно-оттаянной спермой, которую помещали в пробирку с 1 мл питательной среды и оставляли в термостате на 1 час. В качестве питательных сред для капацитации использовали разработанную нами питательную среду на основе Тироде [Sigma]. Надосадочную жидкость удаляли, помещали в другую пробирку, добавляли 1 мл среды для капацитации и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Верхний слой жидкости удаляли, осадок дважды отмывали средой для капацитации методом центрифугирования при 3000 об/мин, причем при втором отмывании в среду добавляли гепарин. Затем сперму отмывали дважды в среде для оплодотворения и в количестве 1×10^6 сперматозоидов в 1 мл добавляли к ооцитам, находящимся к этому времени в этой же среде. Помещали в CO₂-инкубатор на 18 часов для оплодотворения.

После процесса оплодотворения ооцит-кумулюсные комплексы отмывали от среды для оплодотворения и помещали в среду для культивирования ранних зародышей, куда вводили соматотропный гормон в следующих режимах:

– 10 нг/мл СТГ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей после оплодотворения (V группа);

– 10 нг/мл СТГ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей на 8-16 клеточной стадии развития (VI группа);

– 5 нг/мл СТГ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей после оплодотворения и 5 нг/мл на 8-16 клеточной стадии развития (VII группа).

Эффективность созревания и оплодотворения ооцит-кумулюсных комплексов определяли по количеству и качеству созревших ооцитов, уровню дробления и выходу морул-бластоцист (Mo-BI).

Анализ полученных цитогенетических препаратов проводили под бинокулярным микроскопом «Jenaval» при 900-кратном увеличении.

Результаты исследований. Известно, что гормон роста необходим для роста и развития организма, он также вовлекается в процесс половой дифференциации и полового созревания, в частности в процессы стероидогенеза гонад, гаметогенеза и овуляции. Так, у коров гормон роста увеличивает число малых фолликулов, в позднем фолликулогенезе стимулирует стадии фолликулогенеза и предотвращает атрезию больших фолликулов. Таким образом, соматотропин играет важную роль в фолликулярной секреции, в механизмах образования доминантного фолликула, созреванию в нем биологически полноценной яйцеклетки.

В связи с этим на начальном этапе исследований нами были рассмотрены дозы внесения соматотропного гормона в среду для созревания ооцитов.

В результате проведенных исследований установлено (табл. 1), что добавление в среду для культивирования ооцитов соматотропного гормона привело к увеличению в сравнении с контролем созревших до стадии метафаза II яйцеклеток на 5,7–8,0 %. Аналогичная зависимость наблюдалась и в развитии клеток после оплодотворения. Уровень дробления вырос по сравнению с контролем на 9,9–13,8 % и составил 53,7 % при введении в культуральную среду 5 нг/мл соматотропина, 54,3 % при концентрации соматотропина 15 нг/мл и 57,6 % при введении 10 нг/мл. Из 95 клеток, поставленных на созревание, при использовании 5 нг/мл СТГ 23 (24,2 %) достигли стадии морула-бластоциста ($p < 0,01$). При увеличении дозы соматотропина до 15 нг/мл выход жизнеспособных эмбрионов составил 25,7 % ($p < 0,01$). Введение соматотропина в дозе 10 нг/мл позволило получить 23

преимплантационных эмбриона ($p < 0,001$), что составило 27,1 % от количества ооцитов, поставленных на культивирование.

Этот показатель превышает аналогичный в контроле на 13,3 %, в группе с 5 нг/мл СТГ на 2,9 % и в группе с 15 нг/мл СТГ на 1,4 %. Наши данные подтверждают тот факт, что эффект рекомбинантного бычьего соматотропного гормона на мейоз ооцитов коров носит дозозависимый характер.

1. Созревание ооцитов и выход преимплантационных эмбрионов под влиянием соматотропина

группа	Среда для созревания ооцитов	Поставлено на культивирование, n	Созрело до метафазы II, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
I	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ	95	85-89,5	51-53,7	23-24,2**
II	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ	85	78-91,8	49-57,6	23-27,1***
III	ТС-199 + 15 нг/мл СТГ	70	64-91,4	38-54,3	18-25,7**
IV	ТС-199 (контроль)	80	67-83,8	35-43,8	11-13,8

Таким образом, использование среды для созревания ооцитов с добавлением соматотропного гормона в оптимальной дозе 10 нг/мл позволяет повысить уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II до 91,8 %, при этом уровень дробления составляет 57,6 %, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке не менее 27,1 %.

Проведенный цитогенетический анализ стадий мейоза (табл. 2) свидетельствует о том, что ооциты обладают неодинаковым потенциалом к дальнейшему развитию. Так, после 8-ми часового культивирования в I–III опытных группах на стадии мейоза метафаза II находилось 4,3, 1,6, и 4,5 % ооцитов соответственно, при этом уровень дегенерированных ооцитов составлял 10,6, 6,4 и 11,4 %. На других стадиях развития находилось от 84,1 % в III группе до 92,1 % во II группе культивируемых ооцитов.

2. Цитогенетический анализ созревания ооцитов

Группа	Среда для созревания ооцитов	Поставлено на культивирование, n	Время культивирования, ч	Стадия развития, n-%		Дегенерированные, n-%
				метафаза II	другие стадии	
I	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ	47	8	2-4,3	40-85,1	5-10,6
			16	4-8,5	35-74,5	8-17,0
			24	20-42,6	15-31,9	12-25,5
II	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ	63	8	1-1,6	58-92,1	4-6,4
			16	5-7,9	54-85,7	4-6,4
			24	45-71,4	13-20,6	5-7,9
III	ТС-199 + 15 нг/мл СТГ	44	8	2-4,5	37-84,1	5-11,4
			16	7-15,9	31-70,5	6-13,6
			24	24-54,5	12-27,3	8-18,2
IV	ТС-199 (контроль)	54	8	2-3,7	46-85,2	6-11,1
			16	5-9,3	44-81,5	5-9,3
			24	35-64,8	14-25,9	5-9,3

Наиболее высокая интенсивность созревания через последующие 8 часов наблюдалась в III группе и составляла 11,4 %, а наиболее низкая в I группе – 4,2 %. В контроле этот показатель находился на уровне 5,6 %. В I группе также возросло количество дегенерированных ооцитов и составило 17,0 %, что на 6,4 % больше по отношению к 8-ми часовому культивированию. Самая высокая динамика развития отмечена в промежутке культивирования ооцитов от 16 до 24 часов. Так, до стадии метафаза II во второй группе развилось 71,4 % ооцитов, что составило 63,5 % по отношению к 16-часовому контролю. Интенсивность созревания в I и III группах находилась практически на одном уровне и

составляла 34,1 и 38,6 % соответственно. В контрольной группе этот показатель составлял 55,5 %.

Таким образом, наибольшей потенцией к инициации мейоза обладают ооциты в среду для культивирования которых было включено 10 нг/мл СТГ. Стадии метафаза II через 8, 16 и 24 часа достигли 1,6, 7,9 и 71,4 % клеток соответственно. При этом количество дегенерированных ооцитов через 24 часа культивирования находилось на уровне 7,9 %.

На следующем этапе исследований нами был рассмотрен вопрос о целесообразности введения соматотропного гормона в среду для культивирования ранних зародышей. Без создания оптимальных условий культивирования ранних зародышей их развитие блокируется на стадии 8–16 кл., после чего наступает их дегенерация и гибель. Блок является природным видовым фактором. Возможно, что его наличие обусловлено генетическими особенностями яйцеклетки и определяется активностью материнских генов еще в овогенезе. Возможно, это связано с запасом РНК, различной активностью ряда ферментов, структурой и особенностями функций митохондрий, и различиями в проницаемости плазматической мембраны, обеспечивающих развитие эмбриона до более поздних стадий. Остановка в развитии при культивировании *in vitro* может быть также обусловлена неадекватностью условий для ооцитов в культуральной среде.

По результатам исследований установлено (табл. 3), что добавление в среду для культивирования соматотропного гормона в концентрации 10 нг/мл сразу после оплодотворения позволило получить 48,2 % дробящихся зародышей. При двухразовом добавлении СТГ по 5 нг/мл после оплодотворения и на 8-16 клеточной стадии развития эмбрионов уровень дробления составил 47,1 %. Введение соматотропина только на стадии дробления 8-16 клеток в концентрации 10 нг/мл привело к получению 46,1 % дробящихся зародышей, что на 1,0 % меньше, чем при двукратном добавлении и на 2,1 % меньше чем при добавлении после оплодотворения, но на 2,9 % больше контроля. По выходу жизнеспособных эмбрионов на стадии дробления морула-бластоциста наблюдалась аналогичная картина. Так, этот показатель при использовании СТГ после оплодотворения составил 19,3 %, что на 3,1 % превышает контроль.

3. Влияние соматотропина на выход жизнеспособных зародышей

группа	Среда для культивирования ранних эмбрионов	Поставлено на культивирование, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-ВІ, n-%
VI	ТС-199+10 нг/мл СТГ (после оплодотворения)	83	40-48,2	16-19,3
VI	ТС-199+10 нг/мл СТГ (на стадии 8-16 кл.)	91	42-46,1	15-16,5
VII	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ (после оплодотворения) + 5 нг/мл СТГ (на стадии 8-16 кл.)	87	41-47,1	16-18,4
VIII	ТС-199 (контроль)	74	32-43,2	12-16,2

Использование соматотропина в 2 этапа позволило получить 18,4 % морул-бластоцист, что на 2,2 % больше контрольного показателя. Выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста при введении соматотропного гормона только на стадии блока 8-16 клеток находился практически на уровне контроля (+0,3 %) и составил 16,5 %. Таким образом, оптимальным режимом ввода соматотропного гормона в среду для культивирования ранних зародышей является введение его сразу после процесса оплодотворения. В результате чего выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста составляет 19,3 %, а уровень дробления 48,2 %.

На заключительном этапе исследований нами был проведен сравнительный анализ режимов введения соматотропного гормона в среды для созревания ооцитов и культивирования ранних зародышей (табл. 4), при проведении которого были выявлены

наилучшие результаты при добавлении соматотропина в среду для созревания ооцитов в концентрации 10 нг/мл.

Так, до стадии метафаза II созрело 89,2 % ооцит-кумулюсных комплексов, что на 3,7 % больше, чем при концентрации 15 нг/мл, на 6,9 % больше, чем при введении соматотропного гормона в концентрации 5 нг/мл и на 7,7 % больше в сравнении с контролем.

Введение соматотропного гормона в концентрации 10 нг/мл в среду для созревания ооцитов показало также лучшие результаты в сравнении с введением соматотропина в среду для культивирования ранних зародышей. Так, уровень созревания до стадии метафаза II при введении соматотропина в концентрации 10 нг/мл сразу после оплодотворения в среду для культивирования ранних зародышей был на 10,5 % ниже, чем при введении соматотропина в аналогичной концентрации в среду для созревания ооцитов и на 6,7 %, 10,0 % соответственно ниже при добавлении соматотропного гормона в концентрации 10 нг/мл на стадии дробления 8–16 клеток и в концентрации 5 нг/мл сразу после процесса оплодотворения и на стадии 8–16 клеточного дробления соответственно.

Аналогичная тенденция наблюдалась по уровню дробления и выходу преимплантационных эмбрионов. Так, уровень дробления во II группе превышал на 1,8 % этот показатель в III группе, на 3,0 % – в V группе, на 3,8 % – в I группе, на 4,0 % – в VII группе, на 9,4 % – в VI группе и на 10,8 % – в IV группе. Выход полноценных эмбрионов на стадии морула-бластоциста при введении соматотропного гормона в концентрации 10 нг/мл в среду для созревания ооцитов составил 25,7 %. При использовании соматотропина в концентрации 15 нг/мл этот показатель составил 23,2 % (-2,5 %), при 5 нг/мл – 20,3 % (-5,4 %), в контроле – 16,9 % (-8,8 %). Выход жизнеспособных эмбрионов в V группе был ниже, чем во второй на 4,4 %, в VI группе – на 9,8 % и в VII группе – на 4,9 %.

Таким образом, целесообразно использовать соматотропный гормон в концентрации 10 нг/мл для введения его в состав среды для культивирования ооцит-кумулюсных комплексов. При использовании такого режима созревает до стадии метафаза II 89,2 % ооцитов, выход жизнеспособных эмбрионов составляет 25,7 % при уровне дробления 55,4 %.

4. Режимы введения соматотропного гормона в питательные среды

Показатели	Среда							
	для созревания ооцитов				для культивирования ранних зародышей			
	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ	ТС-199 + 15 нг/мл СТГ	ТС-199 (контроль)	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ (после оплод.)	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ (на стадии 8-16 кл.)	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ (после оплод.) + 5 нг/мл СТГ (на стадии 8-16 кл.)	ТС-199 (контроль)
I группа	II группа	III группа	IV группа	V группа	VI группа	VII группа	VIII группа	
Поставлено на культивирование, n	64	74	69	65	61	63	72	66
Созрело до метафазы II, n-%	52-82,3	66-89,2	59-85,5	53-81,5	48-78,7	52-82,5	57-79,2	54-81,8
Уровень дробления, n-%	33-51,6	41-55,4	37-53,6	29-44,6	32-52,4	29-46,0	37-51,4	29-43,9
Выход Мо-В1, n-%	13-20,3	19-25,7	16-23,2	11-16,9	13-21,3	10-15,9	15-20,8	9-13,6

Выводы. 1. Использование среды для созревания ооцитов с добавлением соматотропного гормона в оптимальной дозе 10 нг/мл позволяет повысить уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II до 89,2–91,8 %, при этом уровень дробления составляет 55,4–57,6 %, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке 25,7–27,1 %.

2. Наибольшей потенцией к инициации мейоза обладают ооциты, в среду для культивирования которых было включено 10 нг/мл соматотропного гормона. Стадии метафаза II через 8, 16 и 24 часа достигли 1,6, 7,9 и 71,4 % клеток соответственно. При этом количество дегенерированных ооцитов через 24 часа культивирования находилось на уровне 7,9 %.

3. Оптимальным режимом ввода соматотропного гормона в среду для культивирования ранних зародышей является введение его сразу после процесса оплодотворения. В результате чего выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста составляет 19,3 %, при уровне дробления 48,2 %.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Hull, K. L. Growth hormone: roles in female reproduction / K. L. Hull, S. Harvey // *J. Endocrinol.* – 2001. – Vol. 168. – P. 1–23.

2. Bartke, A. Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction. What are we learning from transgenic and knock-out animals? / A. Dartke // *Steroids.* – 1999. – Vol. 64. – P. 598–604.

3. Effect of transitory hyperprolactinemia on in vitro fertilization of human oocytes / M. C. Mendes [et al.] // *J. Reprod. Med.* – 2001. – Vol. 46. – P. 444–450.

4. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes / J. Folch [et al.] // *Theriogenology.* – 2001. – Vol. 55. – P. 1777–1785.

5. Cellular localization and changes in expression of prolactin receptor isoform in sheep ovary throughout the estrous cycle / R. A. Picazo [et al.] // *Reproduction.* – 2004. – Vol. 128. – P. 545–553.

REFERENCES

1. Hull, K. L., and S. Harvey. 2001. Growth hormone: roles in female reproduction. *J. Endocrinol.* 168: 1–23.

2. Bartke, A. 1999. Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction. What are we learning from transgenic and knock-out animals? *Steroids.* 64: 598–604.

3. Mendes, M. C. 2001. Effect of transitory hyperprolactinemia on in vitro fertilization of human oocytes. *J. Reprod. Med.* 46: 444–450.

4. Folch, J. 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology.* 55: 1777–1785.

5. Picazo, R. A. 2004. Cellular localization and changes in expression of prolactin receptor isoform in sheep ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction.* 128: 545–553.



УДК 639.3.034.2

ОЦІНКА ЕФЕКТУ КРІОСЕЛЕКЦІЇ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ГЛІКОПРОТЕЇНУ-АНТИФРИЗУ ВЕЛИКОГО БОРОШНЯНОГО ХРУЩАКА (ТЕНЕВРІО МОЛІТОР) В ЯКОСТІ КРІОПРОТЕКТОРА ДЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ КОРОПА

В. О. ЧЕРЕПНІН

*Інститут рибного господарства НААН (Київ, Україна)
diglador@ukr.net*

Метою цього дослідження була оцінка ефекту кріоселекції сперматозоїдів коропа залежно від якості розмороженої сперми після модифікації кріозахисного середовища, що застосовується для розведення нативної сперми перед заморожуванням. Наведені