

го типу. Скляною мікроголкою робиться розріз прозорої оболонки клітин. Загострену мікропіпетку діаметром 25 мкм вводять через розріз у перивітелиновий простір ооцитів, не пошкоджуючи плазматичну мембрану і створюють від'ємний тиск. Перше полярне тільце і суміжна з ним ділянка цитоплазми з метафазною пластинкою всмоктуються в піпетку.

У наших попередніх дослідженнях цитогенетичний аналіз препаратів передбачуваних цитопластів, отриманих із ооцитів корів після дозрівання *in vitro* протягом 20—22 год., показав, що ефективність видалення хромосомного матеріалу ооцитів становить 66% (33/50).

Інститут розведення і генетики тварин УААН

УДК 636.2:591.453.5

О.Є. ГУЗЕВАТИЙ, П.А. ТРОЦЬКИЙ

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТІВ КОРІВ З РІЗНИМ КУМУЛЮСОМ

Наукові розробки І.В. Смирнова, якого фахівці по праву вважають піонером методу глибокого заморожування статевих клітин плідників сільськогосподарських тварин, дали не тільки можливість вирішити проблему глибокого заморожування сперми плідників сільськогосподарських тварин, а й стали підґрунтям для розробок нових методичних підходів кріоконсервування репродуктивних клітин і ембріонів ссавців. Перші спроби заморозити гамети самиць були проведені А.У. Smith у 1952 р., проте з 600 яйцеклітин кролиць лише декілька не мали порушень після розморожування. Нині впевнено можна констатувати лише про успішне заморожування ооцитів лабораторних тварин (мишей, хом'яків), але є певні здобутки й при заморожуванні ооцитів інших видів ссавців, а саме овець, великої рогатої худоби і людини.

© О.Є. Гузеватий, П.А. Троцький, 2001

Розведення і генетика тварин. 2001. Вип. 34

Причиною низької кріорезистентності гамет самиць ссавців (порівняно з гаметами самців) є їхні специфічні особливості: великий розмір (80—160 мкм), наявність прозорої оболонки, знижена проникність мембран до кріопротекторів, а також те, що ооцит-кумулюсний комплекс являє собою сукупність клітин, а не окрему клітину. Це дуже важливий аспект кріоконсервування гамет самиць, у тому числі й корів, враховуючи те, що для заморожування необхідно використовувати саме ооцит-кумулюсний комплекс, а не ооцит. Наявність кумулюсу після деконсервування є обов'язковим (при культивуванні він виконує роль живлення трофіка, ендокринного балансу та захисну дію), оскільки перед експериментатором стоїть завдання не тільки зберегти життєздатність даного біологічного матеріалу, а й щоб після розморожування і культивування гамет самиць дозрівали до метафази II мейозу. Враховуючи, що популяція ооцитів корів з антральних фолікулів гетерогенна за морфологічними ознаками і ця гетерогенність проявляється в особливостях структурованості ооплазми, наявності або відсутності клітин кумулюсу, різної їх оптичної щільності, метою наших досліджень було вивчення особливостей використання для заморожування ооцитів корів залежно від клітин кумулюсу, що їх оточують.

Ооцити корів з гомогенною, тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою залежно від характеристики оточуючих їх клітин кумулюсу розподіляли на 3 дослідні групи: А — ооцити із щільним багат шаровим кумулюсом. Частка таких за морфологічними ознаками клітин із загальної популяції ооцит-кумулюсних комплексів, придатних для культивування отриманих з 25 яєчників корів чорно-рябої породи методом надрізу видимих антральних фолікулів становила 144/740; 19,5%, кількість ооцитів, що були отримані з одного яєчника — від 2 до 12, в середньому — 5,8 — 2,2 клітин/яєчник; Б — ооцити з частково розпущеним кумулюсом і В — ооцити з декількома шарами щільного кумулюсу. Аналогічні показники для цих груп становили відповідно 241/740; 32,6% і 355/740; 47,9%, кількість клітин цих типів з одного

яєчника — від 5 до 16 та від 6 до 23, в середньому — 9,6 — 1,9 та 14,0 — 2,9 клітин/яєчник. Перед заморожуванням гамети корів переносили до еквілібраційного розчину, що складається з 10% гліцерину, 20% пропандіолу, 20% фетальної сироватки у фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко. Еквілібрацію клітин проводили протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Потім ооцит-кумулюсні комплекси переносили на 30 с у вітрифікаційний розчин (25% гліцерину, 25% пропандіолу, 20% фетальної сироватки у фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко), попередньо охолоджений до +4°C, вміщували у 0,25 мл пластикові пайєти і занурювали у рідкий азот. Показник дозрівання до метафази II мейозу після деконсервування і 27 год. культивування в групах А, Б, В становив відповідно 55,3; 45,3 і 43,9%, а кількість клітин з дегенерацією хромосом — 25,6; 30,2 і 35,1%. У контрольній групі клітини не заморожували і аналогічні показники мали значення відповідно 78,0 і 10,0 %. Запліднення *in vitro* деконсервованих яйцеклітин корів з різним кумулюсом і подальше 96-годинне культивування виявили дроблення клітин у дослідних групах А, Б, В відповідно у 15,4; 10,3 і 8,8% випадках.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать, що найбільш перспективними при використанні для заморожування є ооцити корів із щільним багат шаровим кумулюсом.

Інститут розведення і генетики тварин УААН