

УДК 636.92:591.3:57.089.3

ЦИТОМОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ООЦИТІВ КРОЛИЦЬ В ПРОЦЕСІ ЕМБРІОГЕНЕЗУ *IN VITRO*

А. Б. ЗЮЗЮН

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)
aza.zyuzyun@yandex.ua

*На основі аналізу цитоморфологічних досліджень встановлено, що із яєчників кролиць в період статевого дозрівання можна отримати значно більшу кількість ($p < 0,05$) ооцит-кумулюсних комплексів, які придатні до культивування ніж із яєчників статевозрілих кролиць. Також встановлено, що рівень дозрівання ооцитів *in vitro* на 10% вищий в групі, вилученій із яєчників кролиць в період статевого дозрівання, порівняно з групою, отриманою із яєчників статевозрілих кролиць.*

*За результатами цитоморфологічних досліджень встановлено, що у групі ооцитів, отриманих від кролиць в період статевого дозрівання рівень формування 2–4-х клітинних ембріонів становив 68,1%, а в групі гамет від статевозрілих кролиць лише 46,8% ($p < 0,05$). До стадії морули *in vitro* розвинулись в середньому 22,2% ембріонів.*

Ключові слова: ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) кролиць, епідидимальні сперматозоїди, дозрівання та запліднення *in vitro*, ембріони кролів

CYTOMORPHOLOGICAL RESEARCH OOCYTE RABBIT IN THE PROCESS EMBRYOGENESIS IN VITRO

A. B. Zyuzyun

Institute of Animal Breeding and Genetics nd.a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

*Based on the analysis results cytomorphological studies found that a rabbit ovaries during puberty can be significantly more ($p < 0,05$) oocyte-cumulus complexes which are suitable for cultivation than from ovarian mature rabbit. Also found that the level of maturation of oocytes *in vitro* is 10% higher in the group removed from a rabbit ovary at puberty, compared with the group received from the ovaries mature rabbit.*

The results cytomorphological research found that in the group oocytes derived from rabbit puberty level 2–4 formation's cell embryos was 68,1%, and a group of mature gametes rabbit only 46,8% ($p < 0,05$). By morula stage evolved on average 22,2% embryos.

Keywords: rabbits oocyte-cumulus complexes (OCC), epididymal spermatozoa, *in vitro* maturation and fertilization, embryos rabbits

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ООЦИТОВ КРОЛИКОВ В ПРОЦЕССЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА *IN VITRO*

А. Б. Зюзюн

Інститут розведення і генетики животнох імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

*На основе анализа цитоморфологических исследований установлено, что с яичников крольчих в период полового созревания можно получить значительно большее ($p < 0,05$) ооцит-кумулюсных комплексов, пригодных к культивированию вне организма, чем с яичников половозрелых крольчих. Также установлено, что уровень созревания ооцитов *in vitro* на 10% выше в группе, полученной с яичников крольчих в период полового созревания, по сравнению с группой полученной с яичников половозрелых крольчих.*

По результатам цитоморфологических исследований установлено, что в группе ооцитов, от крольчих в период полового созревания уровень формирования 2–4-х клеточных эмбрионов составил 68,1%, а в группе гамет от половозрелых крольчих только 46,8% ($p < 0,05$). До стадии морулы развилось 22,2% эмбрионов.

Ключевые слова: ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) крольчих, эпидидимальни сперматозоиды, созревание и оплодотворение *in vitro*, эмбрионы кроликов

Вступ. Кролі вважаються зручною моделлю для вивчення репродуктивних, серцево-судинних захворювань людини, а також для дослідження регенеративних процесів через суттєву подібність біохімічних і фізіологічних процесів. Окрім того, використання генетичного потенціалу яєчників кролів та вивчення закономірностей проходження мейотичного дозрівання гамет самок в умовах *in vitro* є основою успіхів при клонуванні та створенні трансгенних тварин, що продукують біологічно активні речовини. Однак методи отримання дозрілих *in vitro* гамет кролів нині недостатньо ефективні і існує необхідність в поглибленому вивченні цитоморфологічних характеристик ооцитів в процесі ембріогенезу поза організмом [8]. Тому мета роботи – цитоморфологічні дослідження ооцитів в процесі ембріогенезу *in vitro*, отриманих із яєчників статевозрілих кролиць та до початку статевого циклу.

Матеріали і методи досліджень. Для проведення досліджень були відібрані яєчники від кролиць ($n=8$) віком 4 місяці і кролиць віком 11 місяців, які приходили в охоту ($n=10$). Яєчники, вилучені із самок, знаходились на стадії фолікулярного росту. Яєчники доставляли в лабораторію в термосі за температури $+30 - +33^{\circ}\text{C}$ протягом 1,5 – 6 годин. Після доставки в лабораторію яєчники промивали 4 рази у теплому ($+37-+38^{\circ}\text{C}$) стерильному фосфатно-сольовому розчині Дюльбекко (PBS, Sigma, D 8662) із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату.

Вилучення та постановку на дозрівання, запліднення і подальше культивування здійснювали у стерильних умовах боксу Вилучення ооцит-кумулясні комплекси із фолікулів яєчників здійснювали шляхом розсічення фолікулів лезом безпечної бритви в середовищі PBS із 0,075 мг/мл канаміцину сульфату. Пошук ОКК та їх оцінку проводили під світловим мікроскопом МБС-9 при збільшенні в 12-24 рази. Вилучені ОКК 6-разово відмивали в середовищі 199, яке містить 25 мМ буфера Непес (Sigma, M 2520), 10% сироватки крові великої рогатої худоби власного приготування і одноразово промивали в середовищі для дозрівання. Відбір та відмивання ОКК здійснювали на нагрівальному столику за температури $+37^{\circ}\text{C}$. Відібрані ОКК кролів культивували *in vitro* 24 години в пластикових чашках Петрі (по 25 – 30 ООК у 1мл) у середовищі для дозрівання – 199 на розчині Ерла (Sigma, M 5017), яке доповнювали 20% інактивованої нагріванням (56°C , 30 хв.) еструсної сироватки корів власного приготування, 0,068 мг/мл канаміцин сульфату, 0,11 мг/мл пірувату натрію і 0,1 мг/мл глутаміну [2]. До середовища для культивування обов'язково додавали клітини гранульози у кількості $3-5 \times 10^6$ на 1 мл, які вилучали із антральних фолікулів без ознак атрезії. Запліднювали отримані яйцеклітин, свіжовилученими епидидимальними сперматозоїдами кроля. Підготовку та відбір життєздатних сперматозоїдів проводили методом "swim-up".

Для виявлення хромосомних порушень ооцитів та ембріонів виготовляли сухоповітряні препарати за допомогою модифікованого методу Тарковського [9].

Результати досліджень. Дозрівання ооцитів включає в себе цілий ряд процесів, які відіграють важливу роль в наступному розвитку ембріона. Так, під час дозрівання відбувається ооплазматична сегрегація, формується і переміщається до поверхні ооциту мейотичне веретено, виділяються полярні тільця, змінюються фізичні та біологічні властивості цитоплазми, кортекс ооциту набуває властивості до скорочення та виділення вмісту кортикальних гранул, взаємодії зі спермієм та перебудовою після активації або запліднення [6]. Повноцінне дозрівання ооцитів *in vitro* до стадії, на якій в природніх умовах відбувається їх овуляція (метафаза II) залежить від багатьох чинників. Ооцити в середовищі для дозрівання *in vitro* перебувають під впливом різних фізичних, хімічних та інших паратипових факторів [10]. Рівень до-

зрівняння ооцитів, значно впливає на ефективність методів отримання ембріонів поза організмом, що пов'язано з рівнем запліднення, поліспермним заплідненням, низькою якістю ембріонів [7]. Встановлено також значений вплив віку тварин-донорів на кількість ооцитів та їх якість. В статевозрілих самок поява домінуючих фолікулів гальмує ріст та дозрівання інших фолікулів. Крім того, значна частина фолікулів під час статевих циклів взагалі піддається атрезії. [1]. В наших дослідженнях в результаті вилучення ооцитів з усіх досліджуваних яєчників (n=18) одержано 245 ОКК, при цьому з восьми яєчників кролиць до початку статевого циклу отримали 115 ОКК, а з 10-ти яєчників статевозрілих кролиць – 130 ОКК.

Вилучені ОКК, залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляли на чотири групи: I група – ооцити, оточені щільним багат шаровим кумулюсом, із однорідною невакуолізованою ооплазмою; II група – ооцити, оточені розпушеним шаром кумулюса та однорідною невакуолізованою ооплазмою; III група – ооцити, які частково втратили кумулюс, але з невакуолізованою однорідною ооплазмою; IV група – атретичні, денудовані, з вакуолізованою ооплазмою, тобто ооцити, які непридатні до подальшого розвитку [4]. Морфологічною оцінкою встановлено, що із яєчників кролиць в період статевого дозрівання отримано ОКК (I-ї – III-ї груп) 88,6%, а із яєчників статевозрілих кролиць 79,2% ОКК (табл. 1).

1. Морфологічний аналіз популяції ооцит-кумулясних комплексів кролиць

Група кролиць	Загальна кількість ОКК, n	ОКК придатні до подальшого розвитку <i>in vitro</i> , n (%)			ОКК не придатні до розвитку <i>in vitro</i> , n (%)
		I група	II група	III група	
період статевого дозрівання	115	59 ^a (51,3±4,6)	35 ^c (30,4±4,2)	8 ^d (6,9±2,3)	13 ^e (11,3±2,9)
статевозрілі	130	48 ^b (36,9±4,2)	42 ^c (32,3±4,1)	13 ^d (10,0±2,6)	27 ^f (20,8±3,5)

Примітка. a,b; e,f – p < 0,05 критерій Ст'юдента

За результатами морфологічної оцінки встановлено, що з яєчників кролиць в період статевого дозрівання отримано значно більшу кількість (p < 0,05) ОКК, які належать до I-ї групи. А клітин IV-ї групи, які є непридатними до культивування *in vitro* з вірогідною різницею (p < 0,05), отримано більше із яєчників статевозрілих кролиць (рис. 1).

З отриманих популяцій гамет для подальшого культивування поза організмом використали 55 ОКК із яєчників кролиць в період статевого дозрівання та 82 ОКК із яєчників статевозрілих кролиць.

Решту ооцитів використали для виготовлення цитогенетичних препаратів. В результаті проведеного аналізу цитогенетичних препаратів встановлено, що основна кількість ооцитів з обох груп перебувала на стадії диплотени дифузної мейозу (табл. 2).

2. Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених із яєчників кролиць в період статевого дозрівання та статевозрілих

Група кролиць	Загальна кількість ОКК, n	Кількість ооцитів на стадії диплотени, n (%)			Метафази II, n (%)	Дегенерація хроматину, n (%)
		дифузної	фібрилярної	видимих бівалентів		
період статевого дозрівання	60	27 ^a (45,0±6,4)	17 ^b (28,3±5,8)	2 ^c (3,3±2,3)	1 ^d (1,7±1,6)	13 ^e (21,7±5,3)
статевозрілі	48	15 ^a (31,2±6,7)	12 ^b (25,0±6,3)	0 ^c	2 ^d (4,2±2,8)	19 ^f (39,6±7,0)

Примітка. e,f – p < 0,05 критерій Ст'юдента

Встановлено вірогідну різницю (p < 0,05) між кількістю клітин з ознаками дегенерації хроматину, отриманих від кролиць в період статевого дозрівання і статевозрілих самок. Так в групі клітин, вилучених із яєчників статевозрілих кролиць їх було на 17,9% більше, ніж серед отриманих із яєчників кролиць, в яких ще не розпочався статевий цикл.

Після культивування в умовах *in vitro* 85,5% (47 із 55) ОКК вилучених із яєчників кролиць в період статевого дозрівання та 75,6% (62 із 82) ОКК із яєчників статевозрілих кролиць, досягли МІІ мейозу. Таким чином рівень дозрівання на 10% вищий в групі ОКК вилучених із

яєчників кролиць в період статевого дозрівання. Рівень дозрівання визначався на основі морфологічної оцінки за наявністю полярних тілець (рис. 2) та аналізом цитогенетичних препаратів.

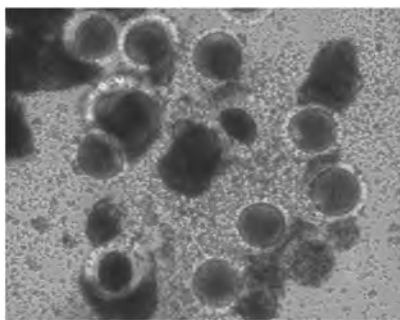


Рис. 1. Ооцит- кумулюсні комплекси кролиці. Об.10х, ок. 10х

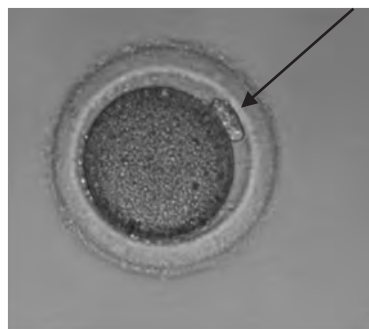


Рис. 2. Яйцеклітина кролиці після культивування *in vitro*. Ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка). Об.10х, ок. 10х

Наступним етапом досліджень було проаналізувати ефективність одержання ембріонів кролів *in vitro* з використанням ооцитів, отриманих із яєчників статевозрілих кролиць та в період статевого дозрівання. Дозрілі поза організмом ооцити, запліднювали в умовах *in vitro* свіжовилученими епідидимальними сперматозоїдами кроля. Ембріони розвинулись в обох досліджуваних групах, але із суттєвою різницею в рівні дроблення (табл. 3).

3. Рівень формування ембріонів кролів в умовах *in vitro*

Кролиці	Запліднених ооцитів, n	Кількість ембріонів		Нероздроблених зигот, n (%)
		2-4 клітинних, n (%)	ранніх морул, n (%)	
період статевого дозрівання	47	32 ^a (68,1±6,7)	11 ^c (23,4±6,1)	4 ^d (8,5±4,0)
статевозрілі	62	29 ^b (46,8±6,3)	13 ^c (20,9±5,1)	20 ^e (32,3±5,9)

Примітка. a:b – $p < 0,05$; d:e – $p < 0,001$, критерій Ст'юдента

Аналізом цитоморфологічних досліджень встановлено, що у групі ооцитів, отриманих від кролиць в період статевого дозрівання формування 2-4-х клітинних ембріонів становив 68,1%, а в групі гамет від статевозрілих кролиць лише 46,8% ($p < 0,05$) (рис. 3).

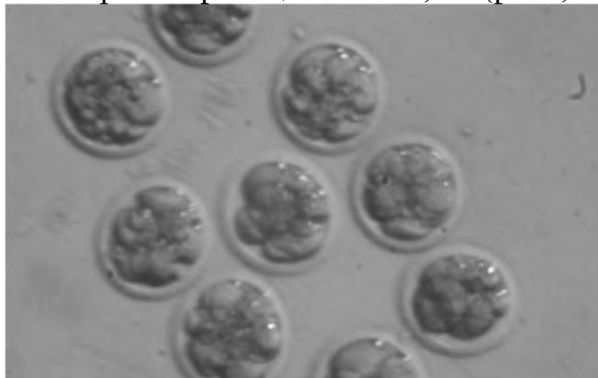


Рис. 3. Зажиттєве фото ембріонів кролів, сформованих *in vitro* на стадії морули. 3б. об.10х, ок. 10х.

За рівнем розвитку ембріонів до стадії ранньої морули вірогідної різниці між групами не виявлено, але більший відсоток ембріонів на доімплантаційній стадії отриманий в групі ОКК кролиць в період статевого дозрівання – 23,4% і 20,9%, відповідно. Відмічена вірогідна різниця між досліджуваними групами в кількості зигот, які не подолали блок дроблення ($p < 0,05$). У групі ооцитів, вилучених із яєчників статевозрілих кролиць нероздробленими залишилось на 23,8% більше зигот.

Висновки. Встановлено, що із яєчників кролиць в період статевого дозрівання отримано значно більшу кількість ($p < 0,05$) ОКК, які є найбільш придатними для культивування поза організмом ніж із яєчників статевозрілих кролиць. А ооцитів з ознаками дегенерації, які є непридатними до культивування *in vitro*, отримано більше ($p < 0,05$) із яєчників статевозрілих

кролиць. Рівень дозрівання також вищий на 10% в групі ОКК вилучених із яєчників кролиць в період статевого дозрівання.

Встановлено, що у групі ооцитів, вилучених із яєчників статевозрілих кролиць нероздробленими залишилось зигот на 23,8% більше порівняно із групою клітин отриманих від кролиць в період статевого дозрівання ($p < 0,05$).

Отже, для біотехнологічних досліджень в якості донорів ооцитів більш ефективним є використання кролиць в період статевого дозрівання, в яких ще не розпочався статевий цикл, оскільки із їх яєчників можна вилучити вірогідно більшу кількість ($p < 0,05$) повноцінних ооцит-кумулюсних комплексів, придатних до культивування поза організмом, що забезпечить значно більший відсоток доімплантаційних ембріонів.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології : підручник / В. А. Яблонський, С. П. Хомин., Г. М. Калиновський, Г. Г. Харута, М. І. Харенко, В. І. Завірюха, В. Й. Любецький – Вінниця : Нова книга, 2006. – 592 с.

2. Ковтун, С. І. Методика одержання доімплантаційних зародків великої рогатої худоби та свиней поза організмом / С. І. Ковтун, Д. М. Басовський, Ю. В. Куновський // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. – К., 2005. – С. 192-200.

3. Challah-Jacques, M. Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer / M. Challah-Jacques, P. Chesne, J. Renard // Cloning and stem cells. – 2003. – Vol. 5 (4). – P. 295-299.

4. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation / Y. Tao, C. Cao, M. Zhang, F. Fang, Y. Liu, Y. Zhang, J. Ding, X. Zhang // Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. – 2008. – Vol. 92, № 4. – P. 438-447.

5. Gordon, I. Large-scale production of cattle embryos by in vitro culture methods / I. Gordon // Ag. Biotech. News and Inform. – 1989. – Vol. 13. – P. 345-348.

6. In vitro fertilization: four decades of reflections and promises / Y. Zhao, P. Brezina, C. Hsu, J. Garcia, P. Brinsden, E. Wallach // J. Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – Vol. 94. – P. 843-852.

7. Kane, M. T. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology / M. T. Kane // Animal Reproduction Science. – 2003. – Vol. 79. – P. 171-190.

8. Kosenyuk, Y. Nuclear transfer in rabbit: the state of the art / Y. Kosenyuk // Ann. Anim. Sci. – 2006. – Suppl., Vol. 1. – P. 109-122.

9. Tarkowski, A. K. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. – 1966. – Vol. 5, № 3. – P. 394-400.

10. Watson, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence / A. J. Watson // Journal of Animal Science. – 2007. – Vol. 85. – P. 11-13.

REFERENCES

1. Yablons'kyi, V. A., S. P. Khomun, H. M. Kalynovs'kyi, G. G. Kharuta, M. I. Kharenko, V. Y. Zavirukha, and V. Y. Lubetskyi. 2006. *Veterynarnе akusherstvo, hіnekolohiya ta biotekhnolohiya vidtvorennya tvaryn z osnovamy androlohiyi : pidruchnyk. Vinnytsya : Nova knyha.* – *Veterinary obstetrics, gynecology and biotechnology of animal andrology with the basics.* Textbook, 592.

2. Kovtun, S. I., D. M. Basovs'kyi, and Yu. V. Kunovs'kyi. 2005. *Metodyka oderzhannya doimplantatsiynykh zarodkiv velykoyi rohatoyi khudoby ta svynei poza orhanizmom. Metodyky naukovykh doslidzhen' iz selektsiyi, henetyky ta biotekhnolohiyi u tvarynnytstvi : nauk. zb. – Methods of obtaining implant embryos in cattle and pigs outside the body. Research techniques of plant breeding, genetics and biotechnology in animal husbandry, sciences.* 192–200.

3. Challah-Jacques, M., P. Chesne, J. and Renard. 2003. Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer. *J. Renard Cloning and stem cells*. 5 (4):295–299.
4. Tao, Y., C. Cao, and M. Zhang. 2008. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation. *J. Of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92(4): 438–447.
5. Gordon, I. 1989. Large-scale production of cattle embryos by in vitro culture methods. *J. Ag. Biotech. News and Inform*. 13:345–348.
6. Zhao, Y., P. Brezina, and C. Hsu. 2011. In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *J. Biochimica et Biophysica Acta*. 1810:843–852.
7. Kane, M. T. 2003. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *J. Animal Reproduction Science*. 79:171–190.
8. Kosenyuk, Y. 2006. Nuclear transfer in rabbit: the state of the art. *Ann. Anim. Sci.* 1:109–122.
9. Tarkowski, A. K. 1966. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *J. Cytogenetic*. 5(3):394–400.
10. Watson, A. J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*. 85:11–13.



УДК 636.4.082:[620.3^591.463.1]

ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НАНОБІОМАТЕРІАЛІВ

С. І. КОВТУН¹, Н. П. ГАЛАГАН², О. В. ЩЕРБАК¹

¹Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

²Інститут хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН (Київ, Україна)

kovtun_si@i.ua

Застосовано нанобіоматеріали на основі високодисперсного кремнезему в системі біотехнологічних досліджень. Здійснено оцінку *in vitro* біологічної активності 0,001%-ї концентрації нанобіоматеріалів, синтезованих на основі високодисперсного кремнезему (ВДК, 1) та: 2) альбуміну сироватки крові великої рогатої худоби (БСА, ВДК/БСА); 3) N-ацетилнейрамінової кислоти (N-АНК, ВДК/N-АНК) і 4) ВДК, БСА і N-ацетилнейрамінової кислоти (ВДК/БСА/N-АНК). Показано, що стимулюючий ефект нанобіоматеріалів на життєздатність кріоконсервованих сперматозоїдів бугаїв голитинської породи залежить від природи їх поверхні. Встановлено, що після перебування сперматозоїдів із додаванням 0,001%-ї концентрації ВДК/БСА/N-АНК упродовж 30 хвилин відбулось зростання активності сперматозоїдів на 10,0%, порівняно з іншими групами. В статті відображена перспективність проведення подальших досліджень з використанням нанобіоматеріалів у системі збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин.

Ключові слова: бугаї, нанобіоматеріал, високодисперсний кремнезем, еякульовані сперматозоїди, збереження генофонду, кріоконсервація

EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF NANOBIO MATERIALS

S. I. Kovtun¹, N. P. Galagan², O. V. Shcherbak¹

¹Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

²O.O. Chuiko Institute of Surface Chemistry of NAS (Kyiv, Ukraine)

Applied nanobiomaterial on the basis of ultrafine silica in the system of biotechnology research. Evaluated *in vitro* the biological activity of 0.001% concentration nanobiomaterials, synthesized on the basis of ultrafine silica (UFS, 1) and: 2) albumin serum bovine (BSA, UFS/BSA); 3) N-acetylneuraminic acid (NANA, BDK/NANA) and 4) UFS, BSA and N-acetylneuraminic acid

© С. І. КОВТУН, Н. П. ГАЛАГАН, О. В. ЩЕРБАК, 2016