

УДК 591.31:636.39

МОРФОЛОГІЧНИЙ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ СВІЙСЬКИХ КІЗ (*CAPRA HIRCUS*)

А.Б. ЗЮЗЮН

*Інститут розведення і генетики тварин НААН (Чубинське, Україна)
aza.zuzyun@yandex.ua*

*Наведено результати досліджень одержання ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) кіз, придатних до подальших біотехнологічних експериментів із застосуванням методу їхнього зажиттєвого оцінювання за станом кумулюсу та ооплазми. Встановлено, що в середньому з одного яєчника кози можна вилучити 35 ОКК, з яких придатні до культивування *in vitro* 77%. Результати цитогенетичного аналізу показали, що хроматин в усіх ОКК, вилучених з яєчників кіз, перебуває на стадії диплоте-ни профазы мейозу I.*

Ключові слова: яєчник, фолікули, ооцит-кумулясні комплекси кіз, морфологічний аналіз, цитогенетичний аналіз

Введення. Дослідження з клонування та отримання трансгенних тварин потребують великої кількості повноцінних ембріонів, одержаних *in vivo* та *in vitro*. Наразі у світі успішно проводяться роботи з отримання ембріонів кіз *in vivo* та їхнього кріоконсервування або трансплантації [21]. Так у Канаді в 2009–2010 рр. шляхом вимивання від кіз донорів отримано 516 ембріонів, із них якісних та придатних до наступних біотехнологічних маніпуляцій – 389. Для подальшої трансплантації було використано 208, кріоконсервовано 181, а

© А.Б. Зюзюн, 2013

20 ембріонів експортували [22]. Успішно виконуються роботи з отримання *in vivo* ембріонів кіз і в Румунії. У 2008–2009 рр. у цій країні отримано 217 ембріонів та здійснено 203 трансплантації [23].

Не зважаючи на значний прогрес у сфері біотехнології, сучасні *in vivo* та *in vitro* методи отримання ембріонів все ще мають істотні недоліки, а саме малий вихід повноцінних ембріонів доімплантаційних стадій. Однією з основних причин, які знижують відсоток розвитку ранніх ембріонів поза організмом до стадії імплантації, є незадовільна якість ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) [18, 15]. Тому дуже важливим є відбір повноцінних та придатних до подальшого розвитку ооцитів, здатних до відновлення мейозу в умовах *in vitro* та подальшого ембріонального розвитку після запліднення поза організмом [9, 17, 12]. Ця компетенція набувається впродовж фолікулогенезу під час росту яйцеклітини [10]. Досліджено багато чинників, які впливають на компетенцію до розвитку ооцитів поза організмом: розмір фолікула [13], його морфологічні порушення [7], статевий цикл самиці, гормональна стимуляція [7, 17], умови навколишнього середовища, сезон [6], годівля і вік самиці [16]. Нині популярним і зручним способом зажиттєвого оцінювання якості ооцитів на практиці є морфологічне оцінювання на основі товщини і компактності клітин кумулюсу та однорідності ооплазми [17].

Відпрацювання методичних підходів з одержання *in vitro* ембріонів кіз для їхнього подальшого генетичного модифікування потребує великої кількості якісного вихідного біологічного матеріалу у вигляді ооцит-кумулясних комплексів [11, 20]. Практичне застосування методу одержання ембріонів *in vitro* неможливе без удосконалення й оптимізації методик вилучення, оцінювання та дозрівання ооцитів *in vitro*. Відомо, що у фізіологічно зрілої кози (12–18 міс.) загальна кількість фолікулів, отже, й ооцитів, становить близько 28,6 тис. [5]. Але оскільки кількість фолікулів, що вступили у фазу росту, і кількість антральних фолікулів дуже варіює, необхідно вивчити потенціал яєчників кози як джерела ооцит-кумулясних комплексів для подальшого культивування та одержання ембріонів.

Кози привертають все більшу увагу в зв'язку з реальною можливістю їхнього використання як біореакторів лікарських білків нового покоління. Наприклад, генетично модифіковані кози здатні продукувати молоко з білком лактоферином, функція якого полягає в захисті новонародженої дитини від кишкових хвороб до становлення в неї власного механізму захисту [11]. Також кози є більш зручним видом сільськогосподарських тварин для відпрацювання поточних біотехнологічних та генетичних методик, ніж велика рогата худоба, завдяки меншій вибагливості до кормів і меншим затратам на утримання. Саме тому цей вид тварин ми використали в своїх дослідженнях та визначили аналіз результатів морфологічного і цитогенетичного дослідження ооцит-кумулясних комплексів кіз для їхнього подальшого ефективного застосування у біотехнологічних розробках.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження були виконані в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин НААН. В експериментах

використано шість яєчників та 70 ооцит-кумулясних комплексів кіз. ОКК кіз вилучали з фолікулів яєчників здорових тварин, які досягли статевої зрілості.

Видалення ОКК з антральних фолікулів яєчників здійснювалось шляхом розсічення фолікулів лезом безпечної бритви в середовищі Дюльбеко із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату. Для дослідження стану хроматину із ооцитів готували сухоповітряні препарати за модифікованим методом Тарковського [19]. ОКК переносили в 0,26%-й гіпотонічний розчин 3-заміщеного цитрату натрію на 10–15 хв, механічно звільняли їх від клітин кумулюсу і фіксували на сухому знежиреному склі сумішшю метанол-оцтової кислоти (2:1). Фарбування препаратів проводили з використанням 2%-го розчину барвника Гімза. Аналіз одержаних препаратів здійснювали під світловим мікроскопом МБД-15 (об. 10 х, 90 х м. ім., 100 х м. ім., ок. 10 х). Для фотографування застосовували світловий мікроскоп «2ПЗ Відео».

Статистичні гіпотези перевірено за допомогою критерію χ^2 на рівні значущості 0,05 [4].

Результати досліджень, їхнє обговорення. При відборі ОКК для отримання ембріонів *in vitro* одним із критеріїв компетенції до дозрівання *in vitro* слугує структура кумулюсу, який оточує незрілі ооцити [2], адже встановлено, що зовнішній вигляд кумулюсних клітин та структура ооплазми мають вплив на здатність ооцитів до дозрівання *in vitro* [8].

З метою відбору найбільш придатних гамет для повноцінного дозрівання поза організмом та оцінюванням якості незрілих ооцитів ми розподіляли вилучені ОКК на чотири групи на підставі морфологічної оцінки (табл. 1): перша група – ОКК із щільним кумулюсом, неушкодженою прозорою оболонкою та гомогенною невакуолізованою ооплазмою правильної округлої форми; друга група – ОКК із розпушеним кумулюсом та однорідною ооплазмою; третя група – ОКК частково позбавлені клітин кумулюсу, але з однорідною ооплазмою без ознак атрезії; четверта група – атретичні ОКК (денудовані, або з малою кількістю кумулюсних клітин, ооплазма з ознаками дегенерації) (рис. 4).

1. Розподіл ооцитів на підставі морфологічної оцінки по групах

Яєчник кози	Загальна кількість вилучених ОКК, n	Кількість ОКК кози			
		перша група, n (%)	друга група, n (%)	третя група, n (%)	четверта група, n (%)
Правий	30	8 (26,7±8,0)	5 (16,7±6,8)	10 (33,3±8,6)	7 (23,3±7,7)
Лівий	40	12 (30,0±7,2)	6 (15,0±5,6)	13 (32,5±7,4)	9 (22,5±6,6)
Всього	70	20 (28,6±5,4)	11 (15,7±4,3)	23 (32,9±5,6)	16 (22,9±5,0)
χ^2	0,07	0,01	0,02	0,03	0,04
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примітка. n – кількість ОКК, p – рівень значущості, χ^2 – критерій Пірсона.

Гамети кіз першої, другої і третьої груп (рис. 1–3) придатні до подальших генетичних досліджень, оскільки, оточені клітинами кумулюсу, мають неушкоджену прозору оболонку і гомогенну ооплазми та без морфологічних ознак просунутої атрезії.

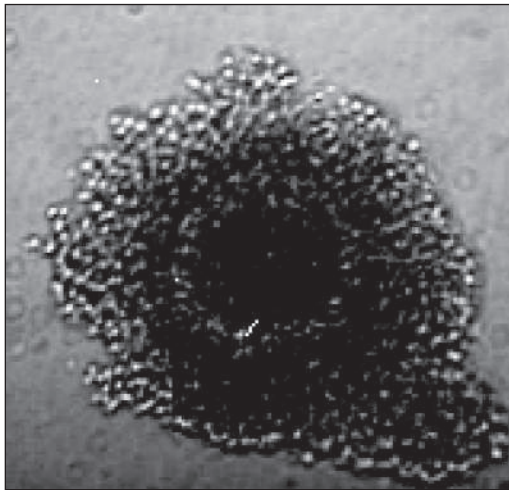


Рис. 1. Зажиттєве фото ОКК кози першої групи. Об.10 х, ок.10 х

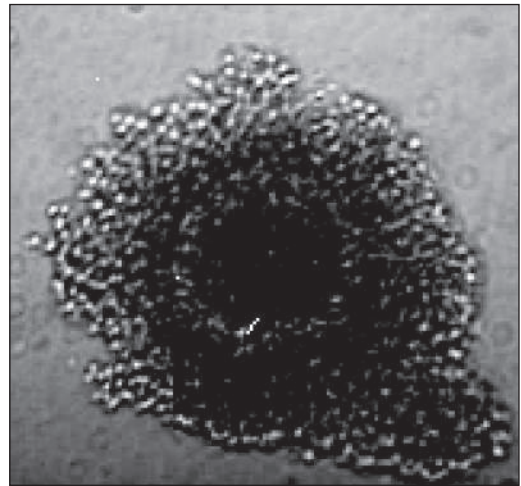


Рис. 2. Зажиттєве фото ОКК кози другої групи. Об.10 х, ок.10 х

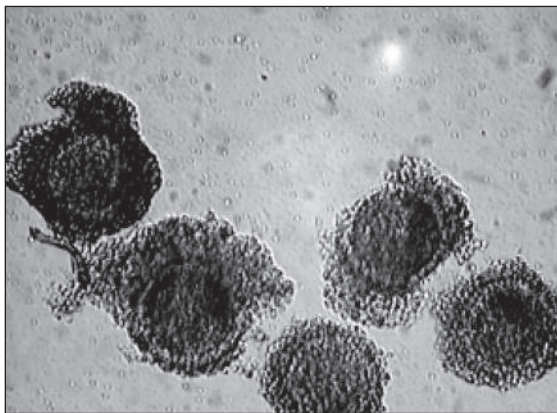


Рис. 3. Зажиттєве фото ОКК кози третьої групи. Об.10 х, ок.10 х

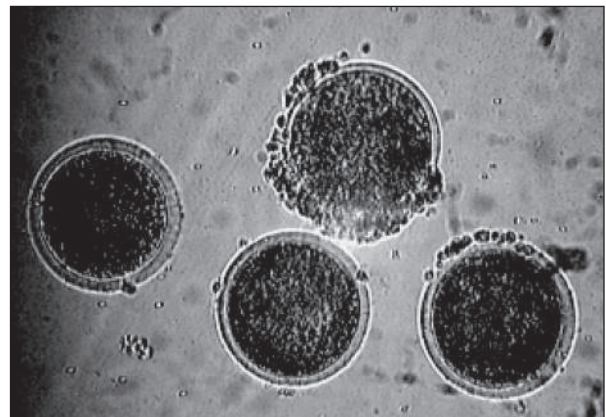


Рис. 4. Зажиттєве фото ОКК кози четвертої групи. Об.10 х, ок.10 х

Нами виявлено, що в середньому з одного яєчника кози можна вилучити 35 ОКК, з яких придатні до культивування *in vitro* 77 %. Дану морфологічну оцінку ооцитів, отриману на основі товщини і компактності клітин кумулюсу та однорідності ооплазми, повністю підтвердили результати цитогенетичного аналізу препаратів ооцитів.

Статистично значущої різниці між загальною кількістю ооцитів, вилучених із правого та лівого яєчників кіз, не виявлено (табл. 1). Також не встановлено статистично значущої різниці між кількістю компетентних до подальшого розвитку ооцитів, отриманих з лівого та правого яєчників (табл. 1).

Цитогенетичний аналіз визначив, що хроматин в усіх ОКК, вилучених з яєчників кіз, перебуває на стадії диплотени профазі мейозу I (табл. 2).

2. Цитогенетичний аналіз препаратів ооцитів, вилучених з яєчників кіз

Яєчник кози	Всього ооцитів, n	Хроматин на стадії мейозу – диплотена, n (%)			Дегенерація хроматину, n (%)
		дифузна	фібрилярна	видимі біваленти	
Правий	30	18 (60,0±8,9)	3 (10,0±5,5)	9 (30,0±8,4)	8 (26,7±8,0)
Лівий	40	21 (52,5±7,9)	14 (35,0±7,5)	5 (12,5±5,2)	7 (17,5±6,0)
Всього	70	39 (55,7±5,9)	17 (24,3±5,1)	14 (20,0±4,8)	15 (21,4±4,9)
χ^2	0,07	0,15	4,55	2,28	0,40
p	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05

Примітка. n – кількість ооцитів, p – рівень значущості, χ^2 – критерій Пірсона.

Не виявлено клітин на більш просунутих стадіях мейозу (діакінез, метафаза I), наявність яких свідчила б про початок дегенеративних змін хроматину гамет [1]. Найбільша кількість хроматину ооцитів кіз (56%) перебувала на стадії диплотени дифузної (рис. 6). Статистично значущу різницю виявлено лише між кількістю ооцитів з правого та лівого яєчників (табл. 2), хроматин яких знаходився у фібрилярному стані (рис. 5), але це не впливає на ефективність подальшого розвитку ооцитів *in vitro* через повноцінність хроматину на кожній із стадій диплотени профазі I мейозу. Клітин на більш просунутих стадіях мейозу (діакінез, метафаза I), наявність яких свідчила б про початок дегенеративних змін хроматину гамет, не виявлено [1, 3].

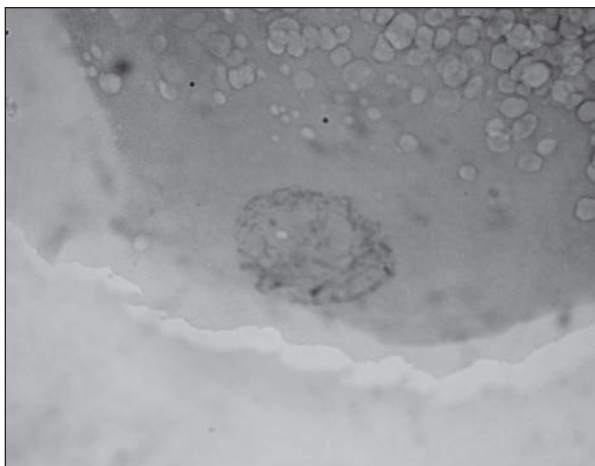


Рис. 5. Стадія фібрилярної диплотени профазі I мейозу ооциту кози. Зб. $\times 900$ разів

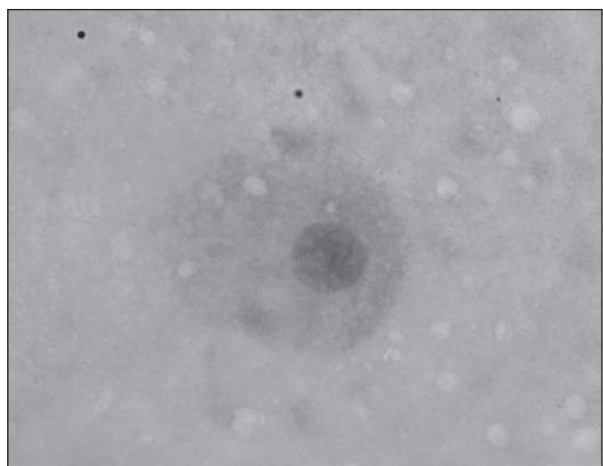


Рис. 6. Стадія дифузної диплотени профазі I мейозу ооциту кози. Зб. $\times 900$ разів

Висновки. Впроваджено метод зажиттєвого розподілу ооцит-кумулюсних комплексів, отриманих із яєчників кіз, за станом кумулюсу та ооплазми.

Хроматин усіх ооцит-кумуляюсних комплексів, вилучених з яєчників кіз, перебуває на стадії диплотени профазі мейозу I, а найбільша кількість хроматину ооцитів перебувала на стадії диплотени дифузної.

Доведено перспективність ембріологічних і генетичних досліджень свійських кіз (*Capra hircus*) для подальшого збереження та раціонального використання генофонду цього виду сільськогосподарських тварин.

1. Графодатский А.С. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих / А.С. Графодатский, С.И. Раджабли // Атлас. – Н.: Наука, 1988. – 128 с.

2. Ковтун С.І. Перспективи використання наукових розробок з біотехнології в селекційній роботі / Ковтун С.І. // Перспективи використання досягнень генетики і біотехнології у практичній селекції тварин: матеріали творч. дискусії. – К. : Аграрна наука, 2006. – С. 17–31.

3. 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 : наук. зб. – К.: Аграрна наука, 2005. – С. 191–200.

4. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биологич. спец. вузов. – 3-е изд., перераб. и доп. / Лакин Г.Ф. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.

5. Яблонський В.А. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В.А. Яблонський, С.П. Хомин, Г.М. Калиновський. – Вінниця, 2006. – 592 с.

6. Al-Katanani Y.M. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows / Y. M. Al-Katanani, F.F. Paula-Lopes. – Journal of Dairy Science. – 2002. – № 85. – P. 390–396.

7. Blondin P.B. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes / P.B. Blondin, M.A. Sirard // Molecular Reproduction and Development. – 1995. – № 41. – P. 54–62.

8. Chin R.C. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro* / R.C. Chin, K. Niwa, M.A. Sirard // Theriogenology. – 1994. – V. 41. – P. 1499–1509.

9. Crozet N.B. Ultrastructure of *in vivo* fertilization in the goat / N.B. Crozet, M.C. Theron, P.E. Chemineua / Gamete Res. – 1987. – № 18. – P. 191–199.

10. Eppig J.J. Oocyte–somatic cell communication in the ovarian follicles of mammals / Eppig J.J. – Semin. Dev. Biol. – 1994. – № 5. – P. 51–59.

11. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency / F. Gandolfi [et al.] // Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. – 2005. – № 24 (1). – P. 413–423.

12. Krisher R.L. The effect of oocyte quality on development / Krisher R.L. // Journal of Animal Science. – 2004. – № 82. – P. 14–23.

13. Song H.B. Iritani A. In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium / H.B. Song, A.B. Iritani. – AAAP Anim Sci Cong, Seoul, Korea. – 1985. – № 1. – P. 463.

14. *Loneragan P.C.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro* / P. C. Lonergan, P. H. Monaghan, D.F. Rizos // *Molecular Reproduction and Development*. – 1994. – № 37. – P. 48–53.

15. *Lucy M.C.* Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement / M.C. Lucy // *Reproduction Supplements*. – 2007. – № 64. – P. 237–254.

16. *Consequences* of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality / D.F. Rizos [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 2002. – № 61. – P. 234–248.

17. *Contribution* of the oocyte to embryo quality / M.A. Sirard [et al.] // *Theriogenology*. – 2006. – № 65. – P. 126–136.

18. *Effect* of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows / S.M. Snijders [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – № 53. – P. 981–989.

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

20. *Wassarman M.P.* The mammalian ovum / Wassarman M.P. // *In the Physiology of Reproduction*. – New York: Raven Press. – 1988. – P. 69–102.

21. www.iets.org Міжнародне товариство ембріотрансплантації (IETS).

22. www.ceta/acte Канадська асоціація ембріотрансплантації (CETA).

23. www.tours.inra.fr Європейська асоціація ембріотрансплантації (AETE).

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДОМАШНИХ КОЗ (*CAPRA HIRCUS*)

А.Б. Зюзюн

Институт разведения и генетики животных НААН (Чубинское, Украина)

*Представлены результаты исследований получения ооцит-кумулясных комплексов коз (ОКК) с помощью метода их прижизненной оценки по состоянию кумулюса и ооплазмы, пригодных к дальнейшему использованию в биотехнологических экспериментах. Установлено, что из одного яичника козы можно получить в среднем 35 ОКК, из которых 77% будут пригодными для культивирования *in vitro*. Результаты цитогенетического анализа показали, что хроматин всех ОКК, полученных из яичников коз, находится на стадии диплотены профазы мейоза I.*

Ключевые слова: яичник, фолликулы, ооцит-кумулясные комплексы коз, морфологический анализ, цитогенетический анализ

MORPHOLOGICAL AND CYTOGENETICAL ANALYSIS OF GOATS' OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES (*CAPRA HIRCUS*)

A.B. Zuyzuyun

Institute of Animal Breeding and Genetics NAAS (Chubinskoe, Ukraine)

The results of study of the possibility of obtaining of goats' oocyte-cumulus complexes (OCC) suitable for further use in biotechnological experiments with applying the methodology of their lifetime assessment for the state of cumulus and ooplasm were given. It is proved that in average out of one goats' ovary can be obtained 35 OCC, from which 77% are suitable for cultivation in vitro. Results of cytogenetic analysis showed that chromatin in all OCC, obtained from the goats' ovaries was on the diplotene prophase of I stage of meiosis.

Key words: ovary, follicles, oocyte-cumulus complexes of goats, morphological analysis, cytogenetic analysis



УДК 57.089.3:636.2.082:615.3

ЛІПІДНИЙ ПРОФІЛЬ У КРОВІ КОРІВ-ДОНОРІВ ЗА СТИМУЛЯЦІЇ СУПЕРОВУЛЯЦІЇ ГОНАДОТРОПІНОМ СЖК СПІЛЬНО З НЕЙРОТРОПНО-МЕТАБОЛІЧНИМ ПРЕПАРАТОМ

В.І. ШЕРЕМЕТА, О.П. ВЕРГЕЛЕС

*Національний університет біоресурсів та природокористування України (Київ, Україна)
sheremetavi@ukr.net*

Установлено, що у крові корів-донорів під час росту на яєчниках фолікулів, індукованого введенням 3000 МО екзогенного гонадотропіну сироватки жеребної кобили (СЖК) «Folligon®», спостерігається зменшення концентрації холестеролу, ХЛВЩ, ХЛНЩ та збільшення вмісту триацилгліцеролу та ХЛДНЩ. Нейротропно-метаболический препарат «Стимулін Вет», введений донорам під час стимуляції гонадотропіном СЖК супер-овуляції, інтенсифікує процеси зменшення вмісту холестеролу, ХЛВЩ та ХЛНЩ, не зумовлюючи змін у концентрації ХЛДНЩ. У донорів через 48 год (12-й день статевого циклу) після введення гонадотропіну СЖК між вмістом холестеролу та холестеролу ліпопротеїдів високої щільності спостерігається прямий зв'язок ($r = 0,827$).

© В.І. Шеремета, О.П. Вергелес, 2013

Розведення і генетика тварин. 2013. № 47