

УДК 636.92:[576.31:591.465]

ЦИТОМОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ОЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КРОЛИЦЬ, ОДЕРЖАНИХ ІЗ ЯЄЧНИКІВ НА РІЗНИХ ФАЗАХ ЕСТРАЛЬНОГО ЦИКЛУ

А. Б. ЗЮЗЮН

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

aza.zyuzyun@yandex.ua

На основі аналізу результатів досліджень встановлено, що найбільшу кількість (86,4%) ооцитів, придатних до подальшого розвитку поза організмом, можна одержати із яєчників на фазі фолікулярного росту. Слід відмітити, що спостерігалась статистично достовірна різниця між групами ОКК кролиць, одержаних із яєчників на різних фазах естрального циклу за кількістю ооцитів непридатних для подальшого культивування. Так, із яєчників на фазі фолікулярного росту таких гамет було одержано лише 13,6%, а із яєчників з ознаками овуляції і на лютеїновій фазі 35,4% і 31,4% відповідно.

При порівнянні результатів аналізу цитогенетичних препаратів ооцитів, вилучених із яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу, встановлено, що незалежно від фази естрального циклу яєчника переважно більша кількість ооцитів перебувала на стадії дипломени. Найбільшу кількість гамет із хроматином на стадії дифузної дипломени (37,3%) отримано із яєчників на стадії фолікулярного росту. На стадії фібрилярної дипломени перебувала більша кількість гамет, вилучених із яєчників на лютеїновій фазі естрального циклу. На стадії дипломени видимих бівалентів вірогідно більше перебувало гамет, отриманих із яєчників на стадії фолікулярного росту (18,1%, $p < 0,05$). Найвищий відсоток ооцитів з дегенерованим хроматином спостерігався в групі вилученій із яєчників кролиць на лютеальній фазі (21,6%).

Ключові слова: ооцит-кумулясні комплекси (ОКК), кролі, яєчники, фолікули, хроматин

CYTOMORPHOLOGICAL RESEARCH OTSYT-CUMULUS COMPLEXES RABBIT FROM WITH OVARIAN AT DIFFERENT STAGES OF THE ESTROUS CYCLE

A. B. Zyuzyun

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

The analysis of the research results revealed that the largest number (86.4%) of oocytes suitable for further development outside the body can be obtained with ovarian follicular phase of growth. It should be noted that statistically significant difference was observed between the groups OCC rabbit derived from ovaries at different phases of the estrous cycle by the number oocytes unsuitable for further cultivation. Thus, the phase of the ovarian follicular growth of gametes was obtained only 13.6% of ovarian and with signs of ovulation and the luteal phase, 35.4% and 31.4% respectively.

When comparing the results of the analysis of cytogenetic preparations oocytes from ovaries removed rabbit at different stages of the estrous cycle, found that regardless of the phase of the estrous cycle Yachnik mostly larger number of oocytes were under dyploteny. The largest number of gametes with diffuse chromatin at the stage dyploteny (37.3%) received from the stage ovarian fol

licular growth. At the stage of fibrillar dyploteny increasing number of gametes was removed from ovarian luteal phase of the estrous cycle. In step dyploteny visible bivalent were more likely gametes obtained from stage ovarian follicular growth (18,1%, $p < 0,05$). The highest percentage of oocytes degeneration chromatin was observed in the group removed from the ovaries to the rabbit luteal phase (21,6%).

Key words: oocyte-cumulus complexes (OCC), rabbits, ovaries, follicles, chromatin

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КРОЛИКОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЯИЧНИКОВ НА РАЗНЫХ ФАЗАХ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

А.Б. Зюзюн

Институт разведения и генетики животных имени М.В.Зубця НААН (Чубинское, Киев)

На основе анализа результатов исследований установлено, что наибольшее количество (86,4%) ооцитов, пригодных к дальнейшему развитию вне организма, можно получить из яичников на фазе фолликулярного роста. Следует отметить, что наблюдалась статистически достоверная разница между группами ОКК, полученных из яичников крольчих на разных фазах эстрального цикла по количеству ооцитов непригодных для дальнейшего культивирования. Так, с яичников на фазе фолликулярного роста таких гамет было получено лишь 13,6%, а с яичников с признаками овуляции и на лютеиновой фазе 35,4% и 31,4% соответственно.

При сравнении результатов анализа цитогенетических препаратов ооцитов, полученных из яичников крольчих на разных фазах эстрального цикла, установлено, что независимо от фазы эстрального цикла яичников, основное количество ооцитов находилась на стадии диплотены. Наибольшее количество гамет с хроматином на стадии диффузной диплотены (37,3%) получено из яичников на стадии фолликулярного роста. На стадии фибриллярной диплотены находилась большее количество гамет, изъятых из яичников на лютеиновой фазе эстрального цикла. На стадии видимых бивалентов достоверно больше находилось ооцитов, полученных из яичников на стадии фолликулярного роста (18,1%, $p < 0,05$). Самый высокий процент ооцитов с дегенерированным хроматином наблюдался в группе, полученной с яичников крольчих на лютеиновой фазе (21,6%).

Ключевые слова: ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), кролики, яичники, фолликулы, хроматин

Вступ. При народженні у корі яєчників самок ссавців містяться сотні клітин на різних стадіях розвитку. Вони різняться за розміром, типом і кількістю клітин гранульози. Їх розвиток залежить від рівня гонадотропних гормонів. Максимальна кількість жіночих статевих клітин досягається в момент переходу від мітозу до мейозу. У деяких видів ссавців (корови, вівці, кози) фолікулогенез починається ще до народження, в інших (миші, щури, хом'яки) після народження. До цього часу всі ооцити в яєчниках є первинними ооцитами, які залишаються на цьому етапі до настання статевої зрілості, коли під час кожного циклу обрані фолікули переходять до овуляції [5, 6]. Кількість преантральних фолікулів у яєчниках дуже варіює у різних видів і за різними оцінками складає: у великої рогатої худоби 89 577, у буйволів – 19 819, у овець – 75 642, кіз – 37 646, у людини – 402 000, у котів – 37 853, у свиней – 210 000 і в собак – 47 900 [1].

Важливою передумовою успішного проведення досліджень в репродуктивній біотехнології є отримання достатньої кількості повноцінних ооцит-кумулюсних комплексів. [7]. Зручним біологічним об'єктом є кролі, які мають короткий репродуктивний період і овуляція в яких викликається спарюванням, що дозволяє регулювати статеві цикли при проведенні експериментів [2].

Мета – цитоморфологічні дослідження популяцій ооцит-кумулюсних комплексів, одержаних із яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу.

Матеріали і методи досліджень. Для одержання ооцит-кумулюсних комплексів відбирали яєчники від забитих здорових кролиць на різних стадіях статевого циклу. Після забою

тварини обережно вилучали яєчники. Щоб зберегти ооцити, які містяться в фолікулах яєчників життєздатними, яєчники поміщали в підготовлений термос. Яєчники доставляли в лабораторію в термосі за температури +30 - +33°C протягом 1,5 – 6 годин [3]. Після доставки в лабораторію яєчники промивали 4 рази у теплому (+37-+38°C) стерильному фосфатно-сольовому розчині Дюльбеко (PBS, Sigma, D 8662) із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату [4].

Вилучення ОКК із антральних фолікулів яєчників здійснювали шляхом розсічення фолікулів лезом безпечної бритви в середовищі PBS із 0,075 мг/мл канаміцину сульфату. Пошук ОКК та їх оцінку здійснювали під світловим мікроскопом МБС-9 при збільшенні в 12-24 рази. Вилучені ОКК 6-разово відмивали в середовищі 199, яке містить 25 мМ буфера Нерес (Sigma, M 2520), 10 % сироватки крові великої рогатої худоби власного приготування і одно-разово промивали в середовищі для дозрівання. Відбір та відмивання ОКК здійснювали на нагрівальному столику за температури +37°C.

Для виявлення хромосомних порушень протягом дозрівання ооцитів *in vitro* частину гамет використовували для приготування сухоповітряних препаратів за модифікованим методом Тарковського [10].

Результати досліджень. Ооцит кумулюсні комплекси кролиць вилучали із яєчників на наступних фазах: на фазі фолікулярного росту (n=6, рис. 1), з яєчників з ознаками овуляції (n=4, рис. 2) та лютеальної фази (n=4, рис. 3).

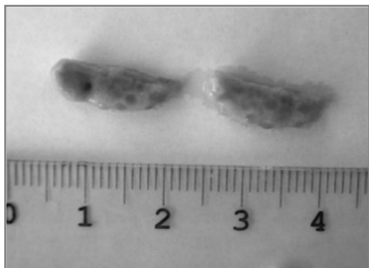


Рис. 1. Яєчники кролиці на фазі фолікулярного росту.

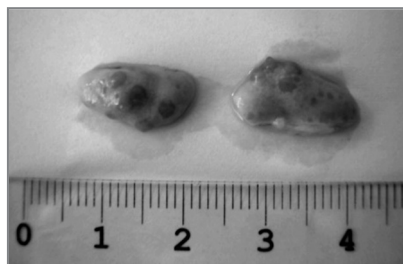


Рис. 2. Яєчники кролиці з ознаками овуляції.



Рис. 3. Яєчники кролиці на лютеїнової фази.

Вилучені із 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 [9, 11].

За кількістю ооцитів I групи, вилучених із яєчників на різних стадіях естрального циклу різниці не виявлено, хоча дещо більша їх кількість отримана із яєчників з ознаками овуляції (35,4%).

Найбільшу кількість ооцитів II групи отримано з яєчників на фолікулярній фазі розвитку (36,4%). Аналіз ооцитів III групи виявив статистично достовірну різницю ($p < 0,05$) між кількістю клітин одержаних з яєчників на фолікулярній фазі (17,3%) та фазі з ознаками овуляції (4,2%). Також спостерігалась статистично достовірна різниця за кількістю ооцитів IV групи, непридатних для подальшого культивування. Так, із яєчників на фазі фолікулярного росту таких гамет було одержано лише 13,6%, а із яєчників з ознаками овуляції і на лютеїнової фази 35,4% і 31,4% відповідно (табл. 1).

В отриманих на різних фазах естрального циклу ооцит-кумулюсних комплексах дослідили також стан хроматину шляхом аналізу виготовлених цитогенетичних препаратів [9].

Результати досліджень показали, що в ооцит-кумулюсних комплексах кролиць, вилучених із яєчників на фолікулярній фазі більша частина гамет перебувала на стадії диплотени дифузної (37,3 %; рис. 4) та диплотени фібрилярної (29,1%; рис. 5). Клітин з дегенерованим хроматином виявлено лише 10 % (табл. 2).

1. Аналіз ооцит-кумулясних комплексів вилучених із яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу

Фази естрального циклу	Загальна кількість ОКК, n	ОКК придатні до подальшого розвитку поза організмом			ОКК не придатні до подальшого розвитку поза організмом
		I група, n (%)	II група, n (%)	III група, n (%)	IV група, n (%)
фолікулярна	110	36 ^a (32,7 ±4,5)	40 ^b (36,4±4,6)	19 ^c (17,3±3,6)	15 ^f (13,6±3,3)
овуляції	48	17 ^a (35,4±6,9)	12 ^b (25±6,3)	2 ^{dc} (4,2±2,9)	17 ^{gh} (35,4±6,9)
лютеїнова	51	16 ^a (31,4±6,5)	15 ^b (29,4±6,4)	4 ^{ec} (7,8±3,8)	16 ^h (31,4±6,5)

Примітки: c:d, f:g – p < 0,01; f:h – p < 0,05, критерій Ст'юдента. В цій та наступних таблицях різні су-перскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

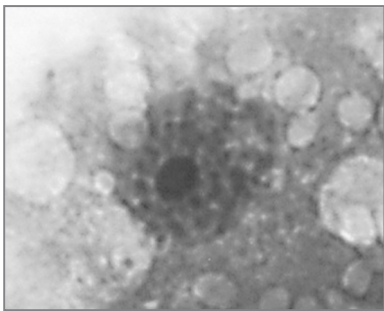


Рис. 4. Стадія дифузної диплотени профазі I мейозу ооциту кролиці.
Зб. об.100x ок.10x.

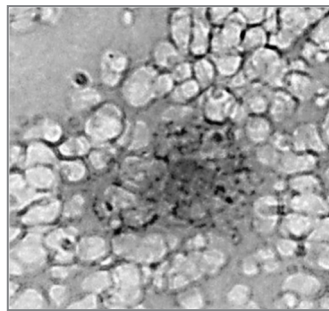


Рис. 5. Стадія диплотени фібрилярної профазі I мейозу ооциту кролиці.
Зб. об.100x ок.10x.

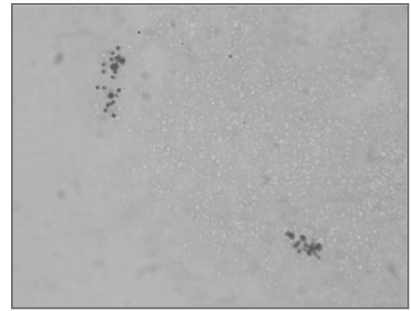


Рис. 6. Стадія M I мейозу ооциту кролиці.
Зб. об.100x ок.10x

За результатами аналізу цитогенетичних препаратів ооцитів, вилучених із яєчників з ознаками овуляції встановлено, що переважна більшість гамет всіх груп також знаходилась на стадії диплотени. Найбільша кількість ооцитів (35,4%) перебувала на стадії диплотени дифузної, а найменша на стадії діакінезу (2,1%). Зміна структури хроматину на фібрилярну відбулась у 27% ооцитів. Ооцитів з ознаками дегенерації хроматину в виявлено в два рази більше ніж у попередній групі – 20,8%.

2. Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених з яєчників кролиць на фазі фолікулярного росту

Фази естрального циклу	Загальна кількість ОКК, n	Кількість ооцитів на стадії мейозу					Дегенерація хроматину, n (%)	
		диплотена			діакінез, n (%)	метафаза I, n (%)		метафаза II, n (%)
		дифузної, n (%)	фібрилярної, n (%)	видимих бівалентів, n (%)				
фолікулярна	110	41 ^a (37,3±4,6)	32 ^b (29,1±4,3)	20 ^c (18,1±3,7)	1 ^e (0,9±0,9)	2 ^f (1,8±1,3)	3 ^g (2,8±2,9)	11 ^h (10,0±2,8)
овуляції	48	17 ^a (35,4±6,9)	13 ^b (27,0±6,4)	2 ^d (4,2±2,9)	1 ^e (2,1±2,0)	2 ^f (4,2±2,9)	3 ^g (6,3±2,9)	10 ^{hi} (20,8±5,6)
лютеїнова	51	16 ^a (31,4±6,4)	15 ^b (29,4±6,4)	3 ^d (5,9±3,3)	0 ^e	3 ^f (9,8±4,2)	1 ^{g h} (1,9±1,9)	13 ⁱ (25,5±6,1)

Примітки: c:d; h:i, – p < 0,05, критерій Ст'юдента.

Аналізом цитогенетичних препаратів ооцитів, вилучених із яєчників кролів на лютеальній фазі встановлено, що найбільша кількість гамет перебувала на стадії диплотени профазі мейозу – 66,7%. Слід відмітити, що в у переважній кількості гамет зафіксовано хроматин у дегеноерованому стані (25,5%; p<0,01).

Порівнянням результатів цитогенетичного аналізу ооцитів, вилучених із яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу, встановлено, що незалежно від стану яєчника найбільша кількість ооцитів перебувала на стадії диплотени. Хоча вірогідної різниці не встановлено, найбільшу кількість гамет із хроматином на стадії дифузної диплотени (37,3%) отримано із яєчників на стадії фолікулярного росту. На стадії фібрилярної диплотени перебувала найбільша кількість ооцитів, вилучених із яєчників на лютеїновій фазі естрального циклу. На стадії диплотени видимих бівалентів вірогідно більше вилучено клітин із яєчників на стадії фолікулярного росту (18,1%, $p < 0,05$).

Найбільший відсоток ооцитів з дегенерованим хроматином спостерігався в пулі ооцитів із яєчників кролиць на лютеальній фазі (утворення жовтого тіла) (21,6 %). На нашу думку це пояснюється тим, що жовте тіло продукує гормон прогестерон, який пригнічує ріст фолікулів і розвиток ооцитів у них [1, 8]. Найменша кількість ооцитів з дегенерованим хроматином виявлена в групі клітин із яєчників на стадії фолікулярного росту (10 %).

Висновки. За результатами морфологічного аналізу ОКК кролиць встановлено, що найбільшу кількість ооцитів I, II і III груп, придатних до подальшого розвитку поза організмом, можна одержати із яєчників на фазі фолікулярного росту.

Встановлено, що в ооцит-кумуляюсних комплексах кролиць, вилучених із яєчників на фолікулярній фазі найбільша частина гамет перебувала на стадії диплотени (84,5 %) тобто є придатними для культивування *in vitro*. А клітин з дегенерованим хроматином виявлено найменше лише 10 %.

Отже, в біотехнологічних дослідженнях для отримання більшої кількості придатних до культивування *in vitro* ооцитів найбільш ефективним є використання яєчників на стадії фолікулярного росту, з яких можна отримати більшу кількість (86,4%) повноцінних ооцит-кумуляюсних комплексів.

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. Kitajima, S. E. Rabbit Biotechnology rabbit genomics, transgenesis, cloning and models / S. E. Kitajima, J. Liu // World Rabbit Science. – 2009. – V. 5, № 6. – P. 37–48.
3. Live, L. B. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes / L. B. Live, Y. H. Choi, C. C. Love // Theriogenology. – 2003. – V. 59. – P. 765–774.
4. Notarianni, E. Reinterpretation of evidence advanced for neo-oogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve / E. Notarianni // J. Ovarian Research. – 2011. – V. 4. – P. 1–20.
5. Peters, H. K. The Ovary: A Correlation of Structure and Function in Mammals. In Morphology of the ovary / H. K. Peters, K. P. Natty // 1st edition. Great Britain: Granada Publishing. – 1980. – P. 12–35.
6. Peters, H. K. The development of the mouse ovary from birth to maturity / H. K. Peters // Acta Endocrinologica. – 1969. – V. 62. – P. 98–116.
7. Shiomi, M. A. Rabbit as a model for the study of human diseases / M. A. Shiomi // World Rabbit Science. – 2009. – V. 7, № 1. – P. 49–53.
8. Svensson, E. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation / E. Svensson, E. Markstrom, R. Shao // Reproduction. – 2002. – V. 123 (1). – P. 23–30.
9. Tao, Y. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation / Y. Tao, C. Cao, M. Zhang // Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. – 2008. – V. 92, № 4. – P. 438–447.
10. Tarkowski, A. K. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. – 1966. – Vol. 5, № 3. – P. 394–400.
11. 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'kyy, V. A., Khomun, S. P., Kalynovs'kyy, H. M., Kharuta, G. G., Kharenko M. I., Zavrivukha, V. Y., Lubetsky, V. Y. 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. Kitajima, S. E., Liu J. 2009. Rabbit Biotechnology rabbit genomics, transgenesis, cloning and models / S. E. Kitajima, J. Liu // *World Rabbit Science.* 5(6): 37–48.
3. Live L. B., Choi Y. H., Love C. C. 2003. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *J. Theriogenology.* 59(3-4): 765–774.
4. Notarianni, E. 2011. Reinterpretation of evidence advanced for neo-oogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve. *J. Ovarian Research.* 4: 1–20.
5. Peters, H. K., Natty K. P. 1980. The Ovary: A Correlation of Structure and Function in Mammals. In *Morphology of the ovary. 1st edition. Great Britain: Granada Publishing,* 12–35.
6. Peters, H. K. 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity *Journal of Acta Endocrinologica.* 62: 98–116.
7. Shiomі, M. A. 2009. Rabbit as a model for the study of human diseases. *World Rabbit Science.* 7(1): 49–53.
8. Svensson, E., Markstrom E., Shao R. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Journal of Reproduction.* 123 (1): 23–30.
9. Tao, Y., Cao C., Zhang M. 2008. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 92(4): 438–447.
10. Tarkowski, A. K. 1966. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *J. Cytogenetic.* 5(3): 394–400.
11. Watson, A. J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science.* 85: 11–13.

УДК 620.3:57.089.3:576.31]:636.4

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА НА МОРФОЛОГИЮ И ИНТРАЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ ЛОКАЛИЗАЦИЮ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ В ООЦИТАХ СВИНЕЙ

Д. А. НОВИЧКОВА¹, Т. И. КУЗЬМИНА¹, О. В. ЩЕРБАК², Н. П. ГАЛАГАН³,
О. А. ЕПИШКО⁴

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных» (Санкт-Петербург – Пушкин, Российская Федерация) prof.kouzmina@mail.ru

²Институт разведения и генетики животных имени М.В.Зубца НААН (Чубинское, Украина) ov19792006i@yandex.ru

³Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН (Киев, Украина)

⁴УО «Гродненский государственный аграрный университет» (Гродно, Республика Беларусь) dnateh@mail.ru

На основе визуализации флуоресцентным зондом (Nile Red) интрацеллюлярных липидов в ооцитах свиней, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro*, охарактеризованы морфология и типы распределения липидных гранул в ооцитах до и после культивирования с наночастицами высокодисперсного кремнезема (0,001% ВДК). При культивировании ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo*, с ВДК возрастает доля ооцитов с липидными каплями в виде гранул и диффузным типом распределения по сравнению с выше обозначенными показателями у ооцитов других исследованных групп. Результаты экспериментов позволяют интерпретировать полученные данные о форме липидов в виде

© Д. А. НОВИЧКОВА, Т. И. КУЗЬМИНА, О. В. ЩЕРБАК,
Н. П. ГАЛАГАН, О. А. ЕПИШКО, 2017