



THE MALE AGE EFFECT TO THE RATS GONADAL INCRETORY FUNCTION
Shcherbak O., Kharkiv State Academy of Animal Health

The article highlights the rats age effect to the incretory function of testes by testosterone concentration and it was defined that its level was hardly changed, no matter the minor variations on the physiological range, if the group of animals of reproductive life period (6 months) was taken as control. The fructose concentration was low increased with age, but the ratio of fructose / testosterone in all experimental animals, as the important indicator, was not changed.

Keywords: sperm, hormones, rats, age, fructose, testosterone.

УДК 636.92.4.082:591.3:57.089.3

**БІОТЕХНОЛОГІЧНА МОДЕЛЬ ВИКОРИСТАННЯ *IN VITRO*
РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРІАЛУ КРОЛІВ НА ОСНОВІ
МЕТОДІВ ЕМБРІОЛОГІЧНОЇ ГЕНЕТИКИ**

Щербак О. В., к. с.-г. н., Зюзюн А. Б., Осипчук О. С., асп.⁷
Інститут розведення і генетики тварин НААН

*Розроблено і практично застосовано біотехнологічну модель використання *in vitro* репродуктивного матеріалу кролів на основі методів ембріологічної генетики. Здійснено морфологічний та цитогенетичний аналіз з метою відбору найбільш придатних для повноцінного дозрівання *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів кролиць. Встановлено, що використання дозрілих *in vitro* ооцитів кролиць порід метелик та сірий велетень забезпечує формування ембріонів *in vitro* на рівні 51,2 %. Використання епідидимальних сперматозоїдів кролів для запліднення *in vitro* дозволяє додатково використовувати генетичний потенціал тварин і удосконалювати біотехнологічні методи.*

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

На сучасному етапі розвитку репродуктивної біотехнології на теренах Російської федерації та України дослідження з удосконалення методик клонування, трансгенезу та одержання ембріональних стовбурових клітин виконуються переважно з використанням гамет кролів. Цей вид тварин є зручним біологічним об'єктом внаслідок короткого репродуктивного циклу і багатоплідності, витрати на утримання суттєво нижче, порівняно з утриманням та годівлею великих тварин.

Завдяки розвитку методів ембріологічної та молекулярної генетики з'явилась реальна перспектива отримувати трансгенних тварин, які є носіями чужорідної генетичної інформації [2, 5, 13]. Такі тварини є модельними для виконання прикладних і фундаментальних біотехнологічних досліджень. Трансгенні тварини є новим джерелом отримання цінних фармацевтичних речовин (інтерлейкіни, антитрипсин, інсуліноподібний фактор росту, тощо) та донорами внутрішніх органів для ксенотрансплантації [8, 9, 12, 14]. Застосування молекулярно-генетичних технологій забезпечує отримання тварин-продуцентів біологіч-

⁷ Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, член-кореспондент НААН С.І. Ковтун



но активних рекомбінантних білків та тварин із заданими характеристиками продуктивності [11, 13].

Наразі одним із найпоширеніших методів отримання трансгенних тварин є мікроін'єкція розчину генних конструкцій у чоловічий пронуклеус зигот [10]. Методи сучасної біотехнології забезпечують відновлення поза організмом мейотичного дозрівання до метафази II у більшості ооцитів, які отримують із антральних фолікулів, та ефективний їх розвиток після запліднення *in vitro*. Ефективність переносу генів пов'язана із видовою належністю тварин та залишається на низькому рівні. Так за даними Брема Г. та колег одну трансгенну тварину ймовірно одержати з 40 ін'єкованих зигот миші, або 1500 зигот корови [1].

Подальші успіхи репродуктивної біотехнології потребують постійного накопичення наукових даних фундаментальних досліджень щодо процесів дозрівання ооцитів, запліднення яйцеклітин і культивування ембріонів на різних стадіях розвитку поза організмом, а також інформації про вплив різних факторів на їх розвиток.

Раціональне використання репродуктивного матеріалу неконкурентоздатних порід тварин відповідно до «Програми збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року» передбачає широке впровадження у збереження генофонду сільськогосподарських тварин біотехнологічних методів відтворення. Ефективність комплексу заходів щодо збереження генофонду через функціонування Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин НААН залежить від результативності складових елементів ембріотехнологічної системи репродукції сільськогосподарських тварин.

Метою нашої роботи було розробити і практично застосувати біотехнологічну модель використання *in vitro* репродуктивного матеріалу кролів на основі методів ембріологічної генетики.

Матеріали та методи досліджень. У дослідженнях використано репродуктивний матеріал від кролів порід сірий велетень та метелик, які наразі мають відносно нормальну чисельність та комерційний статус. Для проведення досліджень яєчники одержували від забитих клінічно здорових статевозрілих кролиць порід сірий велетень і метелик віком 5 – 7,5 міс. Ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Відібрані гамети дозрівали *in vitro* упродовж 24 години в середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 20 % еструсної сироватки корів і $3 - 5 \times 10^6$ клітин гранулози в 1 мл. Культивування проводили при температурі $+38,8^{\circ}\text{C}$ і 4 % CO_2 у повітрі. Ембріони отримували шляхом запліднення яйцеклітини свіжоотриманими сперматозоїдами, які вилучали зі хвостової частини придатка сім'яника (епідидиміс) кроля. Капацитовані поза організмом епідидимальні сперматозоїди (концентрація – $1,5 \times 10^6$ в 1 мл) та ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF упродовж 22 годин. Культивування ембріонів проводили у середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 10 % фетальної сироватки теляти (Sigma, F-9665). Для визначення стану хромосом ооцитів кролиць та хроматину ядер ембріонів готували сухоповітряні препарати за модифікованим методом А. Тарковського [3]. Препарати фарбували з використанням 2%-го розчину барвника Гімза і аналізували їх під світловим мікроскопом.

Результати досліджень. Відомо, що зовнішній вигляд кумулюсних клітин та структура ооплазми мають вплив на здатність ооцитів до дозрівання в умовах *in vitro* [4]. Упродовж відбору гамет для отримання ембріонів *in vitro* одним із критеріїв потенційної можливості дозрівання поза організмом слугує структура



кумулясу, який оточує незрілі ооцити [7]. З метою відбору найбільш придатних для повноцінного дозрівання *in vitro* та оцінки якості незрілих ооцитів ми здійснювали морфологічну та цитогенетичну оцінку незрілих ОКК кролиць двох порід. Ми розподіляли вилучені популяції ОКК на чотири групи (на основі морфологічної оцінки): 1 група – із щільним кумулюсом, неушкодженою прозорою оболонкою та гомогенною невакуолизованою ооплазмою правильної округлої форми (рис. 1); 2 група – із розпушеним кумулюсом та однорідною ооплазмою; 3 група – частково позбавлені клітини кумулюсу та однорідною ооплазмою; 4 група – атретичні ОКК (денудовані, або з малою кількістю кумулюсних клітин, ооплазма з ознаками дегенерації).

Встановлено, що в середньому з одного яєчника кролиць обох порід можна вилучити 14 ОКК різної якості, з них придатні до подальшого культивування – 10 ОКК. Всього із 22 яєчників було одержано 308 ОКК, з них 1-ї та 2-ї груп, тобто придатних до культивування *in vitro* – 67,2 % (табл. 1).

Таблиця 1

Морфологічна характеристика популяції ОКК кролиць

Порода	Кількість яєчників, шт.	Загальна кількість вилучених ОКК, n	Кількість ОКК			
			придатні до культивування <i>in vitro</i>		непридатні до культивування <i>in vitro</i>	
			1 група, n (%)	2 група, n (%)	3 група, n (%)	4 група, n (%)
Сірий велетень	10	148	66 ^a (44,6±4,0)	39 ^b (26,4±3,6)	24 ^d (16,2±3,0)	26 ^c (17,6±3,1)
Метелик	12	160	80 ^a (50,0±3,9)	22 ^c (13,8±2,7)	19 ^d (11,9±2,6)	32 ^c (20,0±3,1)

Примітка. b:c – $p < 0,01$ критерій Ст'юдента.

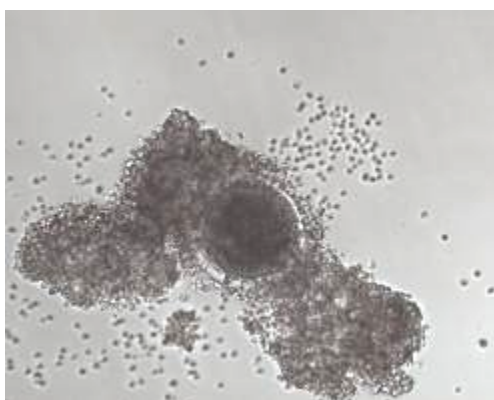


Рис. 1. Зажиттєве фото ооцит-кумулясного комплексу кролиці 1-ї групи. Об.10х, ок. 10х.

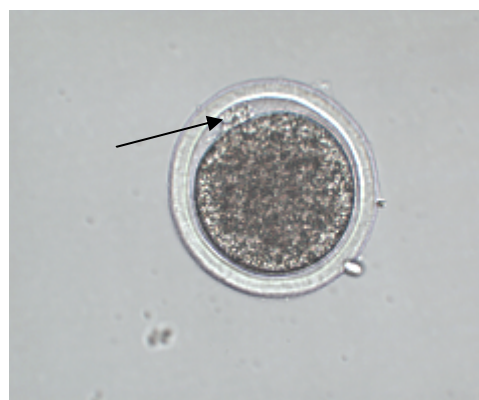


Рис. 2. Яйцеклітина кролиці після культивування *in vitro* Ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка). Об.10х, ок. 10х.

Вірогідна різниця спостерігалась у кількості ооцитів 2-ї групи. Так з яєчників кролиць сірий велетень отримано 26 % ОКК із розпушеним кумулюсом, а з яєчників кролиць породи метелик лише 14 % (табл. 1). Відсоток ОКК незадовільної якості, тобто непридатних до культивування поза організмом, для гамет обох



порід у середньому становив 32,8 %. Всього з 22 яєчників було одержано 207 ОКК (67,2 %), які є придатними для культивування поза організмом.

За морфологічною оцінкою та даними цитогенетичного аналізу визначено, що через 24 години культивування *in vitro* в підібраних нами умовах 75,2 % (79/105) ооцитів кролиць породи сірий велетень і 83,3 % (85/102) ОКК, вилучених від кролиць породи метелик, відновили мейотичне дозрівання і досягли стадії ядерного дозрівання – метафази II мейозу (табл. 2). Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільца (рис. 2).

Таблиця 2

Ефективність дозрівання *in vitro* ОКК кролиць

Порода	Всього ооцитів	Стадії розвитку ОКК <i>in vitro</i>				Кількість ооцитів з хромосомними порушеннями, n (%)
		диплотени, n (%)	діакінезу, n (%)	метафаза I, n (%)	метафаза II, n (%)	
Сірий велетень	105	7 ^a (6,7±2,4)	3 ^b (2,9±1,6)	5 ^c (4,8±2,1)	79 ^d (75,2±4,2)	11 ^e (10,5±2,9)
Метелик	102	3 ^a (2,9±1,7)	2 ^b (2,0±1,4)	5 ^c (4,9±2,1)	85 ^d (83,3±3,7)	7 ^e (6,9±2,5)

Цитогенетичним аналізом встановлено, що відсоток ооцитів, які не відновили мейотичне дозрівання незначний і вірогідної різниці між ооцитами, отриманими від самок порід сірий велетень (6,7 %) і метелик (2,9 %), не виявлено. Менше 5 % ооцитів зупинило свій розвиток на діакінезі та метафазі I. Кількість ооцитів із хромосомними порушеннями не перевищила 11 %. Отримані результати демонструють ефективність морфологічного аналізу популяцій ОКК, вилучених з яєчників кролиць. Встановлено, що в середньому рівень дозрівання *in vitro* ооцитів, вилучених із яєчників кролиць порід сірий велетень і метелик, сягає 79,2 % (164/207).

Попередніми дослідженнями доведено ефективність використання епідидимальних сперматозоїдів бугаїв та кнурів для одержання ембріонів *in vitro* [2, 6]. Метою наших наступних досліджень було вивчити морфологічні характеристики свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів та показати можливість використання таких гамет при формуванні зародків *in vitro*.

Встановлено, що свіжовилучені епідидимальні сперматозоїди кролів породи метелик (три самці) та сірий велетень (три самці) проявляли активність на рівні 40±10,0 % та 20±10,0 %, відповідно (рис. 3). Після перебування сперматозоїдів у середовищі «TALP Ca²⁺ free» протягом 15 хв. відбулося підвищення активності гамет у середньому на 28,5 % зі збереженням такого рівня упродовж 2 годин. Починаючи з 3-ї години активність сперматозоїдів поступово знизилась до 5 %. Зберігання розріджених епідидимальних гамет кролів проводили при температурі +20°C.

Для дослідження запліднювальної здатності свіжовилучених сперматозоїдів кролів ми проводили осіменіння ними поза організмом яйцеклітин кролиць. Встановлено, що рівень формування *in vitro* ембріонів за використання дозрілих *in vitro* ооцитів та свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів порід метелик та сірий велетень (табл. 3) досягає 51,2 % (106 із 207).

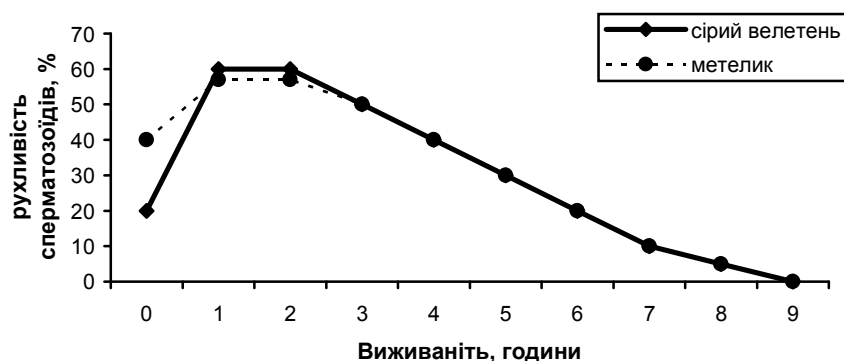


Рис. 3. Збереженість рухливості епідидимальними сперматозоїдами кролів.

Таблиця 3

Одержання ембріонів *in vitro* за використання ооцитів кролів різних порід

Порода кролиць	Осіменених ооцитів	Кількість (%)		
		зигот	2–4-клітинних зародків	ранніх морул
Метелик	102	67 ^a (65,7±4,7)	54 ^b (52,9±4,9)	21 ^c (20,6±4,0)
Сірий велетень	105	71 ^a (67,6±4,6)	52 ^b (49,5±4,9)	19 ^c (18,1±3,8)

Вірогідної різниці між рівнем формування зигот і кількістю ембріонів, отриманих поза організмом з використанням гамет кролів порід метелик та сірий велетень, не встановлено. До доімплантаційних стадій розвинулось ембріонів *in vitro* з використанням гамет кролів породи метелик 20,6 %, а в разі використання гамет кролів породи сірий велетень – 18,1 % (табл. 3).

Встановлено, що використання дозрілих *in vitro* ооцитів та свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів порід метелик та сірий велетень є ефективним і забезпечує високий рівень (51,2 %) формування ембріонів *in vitro*.

Висновки: Морфологічна систематизація незрілих ОКК забезпечує відбір компетентних до розвитку поза організмом гамет. За морфологічною оцінкою та даними цитогенетичного аналізу встановлено, що рівень дозрівання *in vitro* ооцитів, вилучених із яєчників кролиць порід сірий велетень та метелик, сягає 79,2 % (164/207). Отже, ОКК, які вилучені з яєчників кролиць, необхідно використовувати в технології отримання ембріонів *in vitro* для більш повного використання репродуктивного потенціалу самиць та реалізації завдань «Програми збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року».

Показано перспективність застосування свіжовилучених сперматозоїдів із хвостової частини придатка сім'яника кролів у технології формування ембріонів

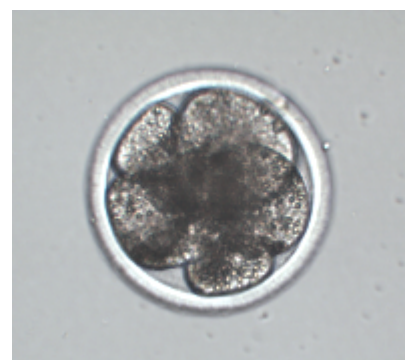


Рис. 4. Зажиттєве фото сформованого *in vitro* ембріона кроля. Збільшення в 100 раз.



in vitro. Встановлено, що використання дозрілих *in vitro* ооцитів та свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів порід метелик та сірий велетень є ефективним і забезпечує високий рівень (51,2 %) формування ембріонів *in vitro*. Застосовані нами біотехнологічні методи відкривають нові перспективи для раціонального використання генофонду неконкурентоспроможних племінних ресурсів і дають можливість ефективно використовувати генетичний матеріал різних видів тварин. Розроблена біотехнологічна модель використання *in vitro* репродуктивного матеріалу кролів на основі методів ембріологічної генетики є складовою виконання у найближчі роки завдань цілісної наукової методології, державної програми дій щодо збереження біорізноманіття тваринництва та міжнародних документів, підписаних Україною («Інтерлакенська декларація та глобальний план дій щодо збереження, сталого використання і розвитку генетичних ресурсів тварин у світі для продовольства і сільського господарства» (Швейцарія, ФАО, 2007).

Бібліографічний список

1. Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г. Экспериментальная генетика в животноводстве // М.: РАСХН. – 1995. – 326 с.
2. Ковтун, С. І. Перспективи використання наукових розробок з біотехнології в селекційній роботі / С. І. Ковтун // Перспективи використання досягнень генетики і біотехнології у практичній селекції тварин : матеріали творч. дискусії. – К. : Аграр. 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., 2005. – С. 192–200.
4. Кузнецов, В. Є. Вплив різних клітинних систем на розвиток зародків великої рогатої худоби *in vitro* / В. Є. Кузнецов, І. Б. Кузнецова, С. І. Ковтун // Наук. праці Полтавської держ. аграр. акад. – 2002. – Т. 1 (20). – С. 130–133.
5. Некоторые аспекты использования трансгенных технологий в животноводстве / Эрнст Л.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А. / Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 2, С. 4–9.
6. Щербак, О. В. Епідидимальні сперматозоїди кнурів та ефективність ембріогенезу свиней *in vitro* / О. В. Щербак // Наук.–техн. бюл. / УААН, Ін-т тваринництва. – Х., 2008. – № 96. – С. 469–472.
7. 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. Sirdard // Theriogenology. – 1994. – V.41. – pp.1499–1509.
8. Cierpka L. Transgenic animals for xenotransplantations / Annals of animal science, Supplement, № 1 (2006) – P. 85-92.
9. Houdebine L.M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production / Repeod. Dom. Anim., 2005. – № 3. – P. 269-281.
10. Jura J., Jurkiewicz J. Methods for the production of transgenic animals / Annals of animal science, Supplement, № 1 (2006) – P. 29-37.
11. Kitajima, S. E. Liu J. Fan rabbit transgenesis / Kitajima, S.E. Liu J., Fan / Rabbit Biotechnology rabbit genomics, transgenesis, cloning and models London – New York, 2009 – pp. 37–48.
12. Shiomi, M. Rabbit as a model for the study of human diseases / M. Shiomi / Rabbit Biotechnology rabbit genomics, transgenesis, cloning and models London – New York, 2009 – pp. 49–63.



13. Zabetian M. The applications of transgenic rabbits in agriculture and biomedicine / M. Zabetian, M. Tahmoorespur, Kh. Hosseini // *Jornal of Animal and Veterinary Advances*, 2011 – Vol. 10, № 6 , - P. 780-790.

14. Zhao S. General topic: applications of transgenic rabbits in biomedical research based on literature search / S. Zhao, K. Wei, Q. Y. Yu, Li, F. Cheng, Y Wang, P. Yang, J. Fan, E. Liu // *World rabbit science*, 2010 - №18 – P. 118-125.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА КРОЛЕЙ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОЙ ГЕНЕТИКИ

Щербак О. В., Зюзюн А. Б., Осипчук А. С., Институт разведения и генетики животных НААН

Разработана и практически применена биотехнологическая модель использования in vitro репродуктивного материала кролей на основе методов эмбриологической генетики. Осуществлена морфологическая систематизация и цитогенетический анализ с целью отбора наиболее подходящих для полноценного созревания in vitro ооцит-кумулясных комплексов кролей. Установлено, что использование дозревших in vitro ооцитов пород бабочка и серый великан обеспечивает формирование эмбрионов in vitro на уровне 51,2 %. Использование эпидидимальных сперматозоидов кролей для оплодотворения in vitro позволяет дополнительно использовать генетический потенциал животных и усовершенствовать биотехнологические методы.

Ключевые слова: ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) кролей, эпидидимальные сперматозоиды, созревания и оплодотворения in vitro, эмбрионы кролей.

BIOTECHNOLOGY MODEL OF THE USE IN VITRO OF RABBITS REPRODUCTIVE MATERIAL ON THE BASIS OF METHODS BY EMBRYOLOGICAL GENETICS

O.V. Scherbak, candidate of sciences, A. B. Zuyzuyn, A.S. Osipchuk, Institute of Animal Breeding and Genetics UAAS

During the study biotechnological model for using in vitro rabbit reproductive material was developed and practically applied based on the methods by embryological genetics. Morphological systematization and cytogenetic analysis was realized in order to select the most suitable for the full maturation in vitro oocytes and cumulus complexes of rabbits. Using matured in vitro oocytes of butterfly and gray giant breeds rabbits provides the formation of embryos in vitro at the level of 51.2%. Using the rabbits' epididymal sperm for in vitro fertilization permits use further the genetic potential of animals and improve the biotechnological methods.

Keywords: rabbits oocytes and cumulus complexes (OCC), epididymal sperm, in vitro maturation and fertilization, rabbits embryos.