



УДК 636.2.082

ВПЛИВ ТІОТРИАЗОЛІНУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ ПРИ ПРОЛОНГОВАНОМУ ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ ЯЄЧНИКІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Міненко Г. В., к. с.-г. н.,

Гречуха М. Д., асп.

Луганський національний аграрний університет

Досліджено вплив пролонгованого гіпотермічного зберігання яєчників в середовищі Дюльбекко доповненому тіотриазоліном на морфофункціональний стан ооцит-кумулясних комплексів. Встановлено, що збереженню достовірно високого рівня ооцитів здатних до повноцінного дозрівання in vitro сприяє додавання тіотриазоліну до консервуючого середовища на початкових етапах ішемізації яєчників. Навпроти, присутність тіотриазоліну лише у середовищі зберігання, негативно впливає процес ядерного дозрівання ооцитів.

Ключові слова: тіотриазолін, зберігання яєчників, ооцит-кумулясні комплекси, дозрівання in vitro

Для отримання біологічно повноцінних ооцитів, як базового матеріалу для значної кількості сучасних методів біотехнології відтворення тварин, особливої актуальності набуває питання довгострокового зберігання ізольованих яєчників.

Відомо, що у результаті припинення кровопостачання органу зменшується кисневе та енергопостачання всіх структурних одиниць яєчника, що призводить до виникнення умов ішемії та реоксигенації. Традиційним підходом, що дозволяє зменшити негативний вплив цих процесів, є зберігання органів у гіпотермічних умовах, що забезпечує уповільнення фізіологічних процесів у органі за рахунок зниження температури і відповідно зменшення його «метаболічних потреб» [1].

Разом із цим такий підхід все ж переважно «пригальмовує» ішемічні та гіпоксичні пошкодження клітин, а не запобігає їм [2].

Тіотриазолін (морфоліній 5-метил-1,2,4-триазолін-5-тіоацетат) є речовиною з доведеною антиоксидантною, мембраностабілізуючою, протиішемічною і стимулюючою регенерацію клітин активністю [3, 4].

В основі протиішемічної дії тіотриазоліну лежить його здатність підсилювати компенсаторну активацію анаеробного гліколізу, знижуючи ступінь пригнічення окисних процесів у циклі Кребса зі збереженням внутрішньоклітинного фонду АТФ, з подальшою стабілізацією метаболізму клітин [5, 6].

Метою наших досліджень було вивчення впливу тіотриазоліну на морфофункціональний стан ооцит-кумулясних комплексів, при пролонгованому гіпотермічному зберіганні яєчників.

Матеріали і методи досліджень. Об'єктом дослідження були яєчники корів і телиць, відібрані після забою тварин на м'ясокомбінаті. В лабораторію яєчники доставляли в фізіологічному розчині з додаванням гентаміцину (50 мкг/мл, група «-») або тіотриазоліну (0,1 мг/мл, група «+») протягом двох-трьох годин. Відразу після доставки яєчники піддавали процедурі аспірації (контрольна група) або зберігали додатково протягом 8-ми годин при температурі 16 °С в середовищі Дюльбекко з додаванням препарату тіотриазоліну (групи «-/» та «+/-») і без (групи «-/-» та «+/-»).



Після закінчення терміну зберігання ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) вилучали методом аспірації з антральних фолікулів діаметром 3-6 мм і за морфологічними ознаками розподіляли на чотири категорії [7]:

- перша категорія – внутрішньоклітинна маса рівного кольору; компактний багатошаровий кумулюс, що налічує більш ніж 3 шари;
- друга категорія – компактний кумулюс, що налічує 1-3 шари; внутрішньоклітинна маса рівномірно забарвлена з проявами грубозернистості;
- третя категорія – шари кумулюсних клітин менш компактні, ооплазма неоднорідного забарвлення з темними кластерами;
- четверта категорія – клітини кумулюсу відсутні, або одиничні; неоднорідна гранульована ооплазма.

Придатні для подальшого дозрівання ОКК (1-ї і 2-ї категорій) культивували *in vitro* протягом 24 годин в середовищі TCM 199 з додаванням 10% фетальної сироватки (v/v), ФСГ (10 мкг/мл), ЛГ (50 мкг/мл), естрадіолу 17 β (1 мкг/мл) і ген-таміцину (50 мкг/мл). Температура культивування - 39,2°C, газове середовище з 5% CO₂ при 100% вологості.

Після закінчення культивування морфологічно оцінювали ступінь експансії клітин кумулюсу за наступною класифікацією [8]:

0 категорія - ОКК без прояву експансії кумулюсу;

1 категорія – незначна експандованість зовнішніх шарів кумулюсу;

2 категорія - експансія охоплює близько 50 % зовнішніх шарів кумулюсу, проте в клітинах *corona radiata* експансія відсутня;

3 категорія - експансія охоплює близько 2/3 клітинної маси кумулюсу, з частковою експансією клітин *corona radiata*;

4 категорія - ОКК характеризуються повною експансією і зовнішніх кумулюсних шарів і клітин *corona radiata*.

Для оцінки ядерного дозрівання проводили цитогенетичний аналіз стадій мейозу, використовуючи метод приготування давлених препаратів із забарвленням хромосом ацетогематоксилином [9].

Результати досліджень. Початковим етапом методу отримання ембріонів поза організмом є морфологічна оцінка вилучених ооцит-кумулясних комплексів. При цьому загальноновизнаним є той факт, що кінцева результативність методу значною мірою залежить від якості ОКК [10]. Тому у першій серії експериментів було досліджено вплив присутності тіотриазоліну в середовищі транспортування та зберігання яєчників в умовах гіпотермії на морфологічний стан отримуваних ооцит-кумулясних комплексів.

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що зберігання яєчників протягом 8-ми годин у досліджуваних умовах вірогідно знижує відсоток ОКК, придатних для подальшого культивування по відношенню до контролю.

При цьому найбільш значуще зменшення відсотка ОКК I-ї та II-ї категорій спостерігається за відсутності тіотриазоліну як під час транспортування, так і протягом гіпотермічного зберігання яєчників.

Напроти, внесення тіотриазоліну до середовища транспортування та/або зберігання забезпечує підвищення даного показника на 17,8-30,1 %. Слід також зазначити, що таке підвищення відбувається переважно за рахунок вірогідного зменшення частки ОКК четвертої категорії, тоді як відсоток ОКК третьої категорії в усіх дослідних групах залишається приблизно на одному рівні.



Таблиця 1

**Вплив умов доставки і зберігання яєчників на морфологію
ооцит-кумулясних комплексів**

Додавання тіотриазоліну		n	Категорії ОКК		
транспортне середовище	середовище зберігання		I+II, n (%)	III, n (%)	IV, n (%)
-	-	117	48 (41,0) ^b	22 (18,8) ^b	47 (40,2) ^a
+	-	75	52 (69,3) ^c	14 (18,7) ^b	9 (12,0) ^b
-	+	136	80 (58,8) ^c	30 (22,1) ^b	26 (19,1) ^b
+	+	76	54 (71,1) ^c	10 (13,2) ^b	12 (15,7) ^b
КОНТРОЛЬ		173	159 (91,9) ^a	14 (8,1) ^a	-

Примітка. Значення з різними суперскриптами в межах стовпця різняться з вірогідністю – a:b:c-p≤0,05.

Таким чином, доповнення середовищ транспортування та гіпотермічного зберігання яєчників тіотриазоліном дозволяє підвищити вихід ооцит-кумулясних комплексів придатних до подальшого культивування поза організмом.

Дозрівання ооциту є результатом складних міжклітинних взаємодій гамети та соматичних клітин оваріального фолікулу, і в першу чергу клітин гранульози, які є продуцентами багатьох факторів, що забезпечують нормальний розвиток дозріваючого ооциту. Відповідно, стан шарів кумулюсу є вагомим параметром, який помітно змінюється при дозріванні ооциту і може слугувати одним із критеріїв оцінки його функціональної зрілості при культивуванні *in vitro* [11].

Враховуючи це було оцінено вплив різних умов гіпотермічного зберігання яєчників за ступенем муцифікації кумулюсних клітин у процесі дозрівання поза організмом ооцит-кумулясних комплексів (рис.)

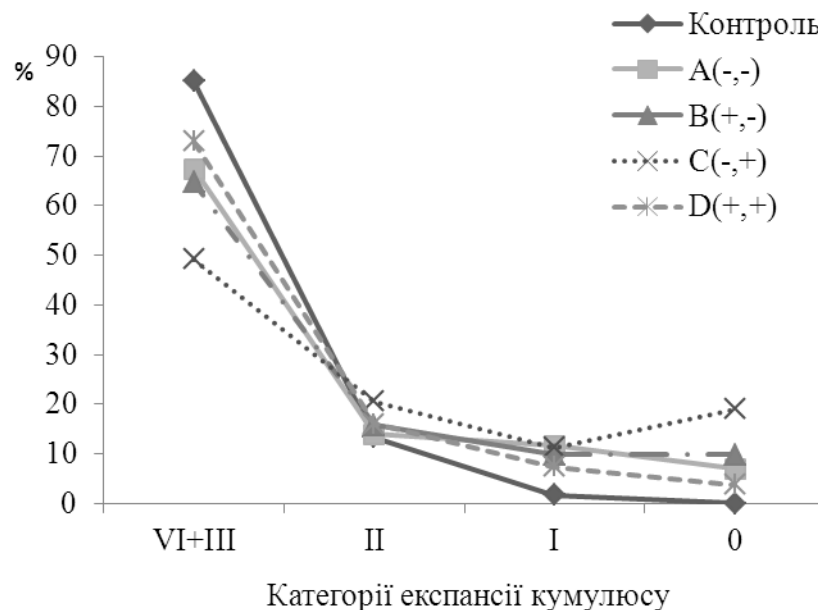


Рис. Розподіл ОКК за категоріями в залежності від ступеня експансії клітин кумулюсу за різних умов зберігання яєчників.



Встановлено, що найбільші відміни у характері розподілу за ступенем експансії клітин кумулюсу після 24 годин культивування порівняно з контролем спостерігали для ОКК, вилучених із яєчників, що транспортували у середовищі без тіотриазоліну, та зберігали у середовищі Дюльбекко доповненому тіотриазоліном. Для даної дослідної групи відсоток клітин із високим ступенем муцифікації шарів кумулюсу був вірогідно нижчим у порівнянні як з контролем, так і з іншими дослідними групами ($p < 0,05$), а відсоток ОКК без прояву експансії – найвищим. Цікаво, що характер розподілу ОКК за ступенем експансії кумулюсу для трьох інших дослідних груп був майже подібним як за умов застосування лише зниженої температури зберігання яєчників, так і різних комбінацій доповнення тіотриазоліном середовищ доставки та зберігання.

Згідно з даними [12], ступінь експансії кумулюсу при дозріванні позитивно корелює з кількістю ооцитів, що здатні досягти стадії метафази II, а також з кількістю одержуваних зародків. Тому на наступному етапі роботи було оцінено вплив умов зберігання яєчників на процес мейотичного дозрівання ооцитів *in vitro* (табл. 2).

Таблиця 2

Рівень ядерного дозрівання ооцитів за різних умов зберігання яєчників

Додавання тіотриазоліну		n	Стадії мейозу ооцитів		Ооцитів з дегенеративними змінами хромосом, n (%)
транспортне середовище	середовище зберігання		Діакінез + Метафаза I, n (%)	Телофаза + Метафаза II, n (%)	
-	-	126	61(48,4) ^b	63(50) ^b	8(9,4) ^a
+	-	42	11(26,2) ^a	31(73,8) ^a	4(9,5) ^a
-	+	48	27(56,2) ^b	17(35,4) ^b	2(4,2) ^a
+	+	108	25(23,1) ^a	83(76,8) ^a	2(2,8) ^a
КОНТРОЛЬ		132	25(18,9) ^a	107(81,1) ^a	-

Примітка. Значення з різними суперскриптами в межах стовпця різняться з вірогідністю – a:b - $p \leq 0,05$.

Отримані дані свідчать, що пролонговане зберігання яєчників в умовах гіпотермії за відсутності тіотриазоліну в обох середовищах призводить до вірогідного зниження рівня ооцитів, здатних відновлювати та завершати мейотичне дозрівання порівняно з контролем. При додаванні тіотриазоліну лише до середовища зберігання, цей показник зменшується ще на 14,6 %.

Найкращі результати за рівнем ядерного дозрівання було отримано при доповненні тіотриазоліном як транспортного середовища, так і середовища зберігання. У випадку застосування тіотриазоліну лише у транспортному середовищі, відсоток ооцитів на завершальних стадіях мейозу хоча й був дещо нижчим, однак вірогідно не відрізнявся як від попередньої дослідної групи, так і від контролю.

В усіх дослідних групах на відміну від контролю було виявлено певний відсоток ооцитів із дегенеративними змінами хромосом. При цьому хоча вірогідної різниці між групами за цим показником не виявлено, обов'язкова присутність тіотриазоліну у середовищі зберігання знижувала його майже втричі.



Таким чином, при 8-годинному зберіганні яєчників при температурі 16⁰С, присутність тіотриазоліну у складі консервуючих розчинів має позитивний ефект на здатність ОКК до повноцінного дозрівання *in vitro* як за зовнішнім критерієм експансії кумулюсу, так і за рівнем ядерного дозрівання.

Висновки:

1. Тіотриазолін позитивно впливає на кількість та якість отримуваних після гіпотермічного зберігання яєчників ооцит-кумулюсних комплексів.
2. Додавання тіотриазоліну у консервуючий розчин, починаючи з перших хвилин припинення кровопостачання органу, дозволяє вірогідно збільшити кількість ооцитів здатних до повноцінного ядерного дозрівання після 8-годинного гіпотермічного зберігання. Напроти, внесення тіотриазоліну лише у середовище зберігання яєчників призводить до зниження цього показнику.

Бібліографічний список

1. Taylor M. J. Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: The clinical perspective / M. J. Taylor, S. C. Baicu // *Cryobiology*. – 2010. – V. 60, N 3. – P. 20-35.
2. Guibert E. E. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade / E. E. Guibert, A. V. Petrenko, C. L. Balaban et al. // *Transfus Med Hemother*. – 2011.- V.38 (2).- P.125-142.
3. Дунаев В. В. Фармако-біохімічні аспекти противоішемічного действия препарату Тиотриазолин в условиях эксперимента / В. В. Дунаев, И. Ф. Беленичев, И. А. Мазур (и др.) // *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики: Зб. наук. стат.- Запоріжжя, 2002. Вип.-8. -С 73-81.*
4. Мазур И. А. Тиотриазолин: фармакологические аспекты и клиническое применение / И. А. Мазур, Н. А. Волошин, И. С. Чекман и др. - Запорожье, Львов: НАУТІЛУС, 2005. – 156 с.
5. Козловский В. И. Применение тиотриазолина в комплексной терапии больных с патологией сердечно-сосудистой системы ВГМУ / В. И. Козловский, Н. Ю. Коневалова, С. П. Козловская // *Витебск «Рецепт»*. – 2007. - № 5 - С. 55.
6. Визир А. Д. Влияние Тиотриазолина на состояние кардиогемодинамики у больных ишемической болезнью сердца с явлениями недостаточности кровообращения. / А. Д. Визир, А. Е. Березин, О. В. Крайдашенко // *Укр. Кардіол. Журн.* – 1996. – № 4. – С. 15–17.
7. Gordon I. Oocyte recovery and maturation. In: *Laboratory production of cattle embryos* / I.Gordon.- CAB International, UK,1994.- P.20-142
8. Coy P. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems / P. Coy, S. Ruoz, R. Romar et al. // *Theriogenology*.- 1999.- V.51, №4.- P. 799-812.
9. Щегельская Е. А. «Эллиминационный хроматин» в мейозе ооцитов мышей, свиней и коров при созревании *in vitro* / Е. А. Щегельская, В. В. Клименко // *Цитология и генетика*. – 1997. – Т.31, №3. – С. 30–35.
10. Canipari R. Oocyte-granulosa cell interactions / R. Canipari // *Hum. Reprod.* – 2000. – V. 6, №3. – P. 279–289.
11. Лобачева І. В. Морфологія ооцит-кумулюсних комплексів, як показник умов мейотичного дозрівання / І. В.Лобачева // *Наукові доповіді НУБІП, 2012 – 5(34).*
12. Eppig J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals / J. J. Eppig // *Reprod Fertil. Dev.* – 1996. – V. 8 (4). – P. 485-489.



ВЛИЯНИЕ ТИОТРИАЗОЛИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОМ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ ЯИЧНИКОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Миненко Г. В., Гречуха М. Д., Луганский национальный аграрный университет

Исследовано влияние пролонгированного гипотермического хранения яичников в среде Дюльбекко, дополненной тиотриазолином, на морфофункциональное состояние ооцит-кумулусных комплексов. Установлено, что сохранению достоверно высокого уровня ооцитов, способных к полноценному созреванию in vitro, способствует внесение тиотриазолина в консервирующую среду на начальных этапах ишемизации яичников. Напротив, присутствие тиотриазолина только в среде хранения негативно влияет на процесс ядерного дозревания ооцитов.

Ключевые слова: тиотриазолин, хранение яичников, ооцит-кумулусные комплексы, созревание in vitro .

EFFECT OF TIOTRIAZOLINE ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES AFTER PROLONGED HYPOTHERMIC STORAGE OF BOVINE OVARIES.

Minenko G. V., Grechyha M. D., Lugansk National Agrarian University

The effect of prolonged hypothermic storage of bovine ovaries in Dulbecco medium supplemented with tiotriazoline on the morpho-functional state of oocyte-cumulus complexes was investigated. It is established that preservation of high rate of oocyte that can survive in vitro favours the injection of tiotriazoline into the canned medium on early stages of ovary ischemization. In contrast, the presence of tiotriazoline only in storage medium has negative effect on nuclear maturation of oocytes.

Key words: tiotriazoline, ovary storage, oocyte-cumulus complexes, in vitro maturation

УДК [631.1.017.3:636.034]:006.3(477)

МОДУЛЬНИЙ ПІДХІД ДО ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМИ ВИРОБНИЦТВА МОЛОКА ВІДПОВІДНО ДО СВІТОВИХ СТАНДАРТИВ НА МАЛИХ ФЕРМАХ УКРАЇНИ

Мирось В. В., д. с.-г. н., проф., акад. АНВО України,
заслужений діяч науки і техніки України
Харківський національний аграрний університет ім. В. В. Докучаєва

Розглядається проблемно-постановочне питання, яке пов'язане з проектуванням і впровадженням у дрібнотоварне виробництво молока на селі, формується саме поняття "модульний підхід", обґрунтовується його використання не тільки необхідністю значного поліпшення якості молока, що виробляється у даному сегменті, з доведенням його до світових стандартів, але й збереженням зникаючих сіл в Україні, вирішенням проблеми кооперації у цій галузі тваринництва.

Ключові слова: модульні ферми, молочна продукція, соціальні питання, кооперація.

Сучасний стан аграрного сектору економіки вимагає термінових заходів щодо забезпечення виробництва високоякісної продукції тваринництва не тільки для внутрішніх потреб а й для її експорту. Останнє в значній мірі буде залежати