

Researches of chemical composition of soya and corn are conducted before and after micronization. The results that we got showed that it is necessary to conduct researches of chemical composition of legumes each party before and after micronization.

Дата надходження в редакцію: 20.02.2013 р.
Рецензент: д.с.-х.н., професор Г. П. Котенджи

УДК 636.2.082

ВПЛИВ ЗБЕРІГАННЯ ЯЄЧНИКІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ПРИ ЗНИЖЕНИХ ТЕМПЕРАТУРАХ НА ПРИДАТНІСТЬ ООЦИТІВ ДО ДОЗРІВАННЯ IN VITRO

Г. В. Міненко, к.с.-х.н., доцент;

О. В. Кочубей, магістр.

Луганський національний аграрний університет

У порівняльному аспекті досліджено вплив зберігання яєчників у двох середовищах різного складу протягом 3-20 годин у діапазоні температур 4-37°C на морфологічний стан ооцит-кумуляюсних комплексів та їх компетентність до дозрівання in vitro. Встановлено перевагу використання в якості середовища зберігання ФБС порівняно із фізіологічним розчином. Додаткове зберігання яєчників за усіх досліджуваних умов знижує потенціал до ядерного дозрівання ооцитів та підвищує відсоток дегенеративних порушень хромосом під час мейозу. Найбільш прийнятним є 6-годинне зберігання яєчників у середовищі ФБС при температурі +16°C.

Вступ. Сучасна світова практика розведення та селекції сільськогосподарських тварин передбачає активне впровадження новітніх методів біотехнології відтворення. До них відносять, у першу чергу, методи трансплантації ембріонів, отриманих in vivo або in vitro.

Загальноновизнано, що результативність методу отримання доімплантаційних ембріонів у системі запліднення поза організмом значною мірою залежить від повноцінного дозрівання in vitro ооцитів [1,2]. Компетентність ооцит-кумуляюсних комплексів до повноцінного дозрівання залежить від цілої низки факторів, серед яких також і тривалість періоду між забоєм тварин і вилученням ооцитів із яєчників, а також температура зберігання яєчників у цей період.

Існуючі літературні дані про можливість короткотривалого зберігання ооцитів ссавців без застосування криогенних температур є досить суперечливими [3,4].

Невирішеними залишаються питання про максимальний термін подовження попереднього зберігання ооцитів та визначення оптимальних фізико-хімічних умов зберігання.

Тому метою наших досліджень було вивчення впливу додаткового зберігання яєчників протягом 3-20 годин за різних фізико-хімічних умов на компетентність ооцитів до дозрівання in vitro.

Матеріали і методи. Дослідження було виконано на яєчниках корів та теличок, забитих на Луганському м'ясокомбінаті. В залежності від мети експерименту після забою тварин вилучені яєчники доставляли у лабораторію протягом двох-трьох годин у побутовому термосі із фізіологічним розчином (0,9% NaCl) з додаванням гентаміцину (50 мкг/мл), або у фосфатно-сольовому буферному середовищі (ФБС) з антибіотиком. Температуру підтримували на рівні 4; 16; 20 або

37°C.

У лабораторії яєчники обробляли 70° етиловим спиртом, споліскували у свіжій порції відповідного стерильного середовища й зберігали при температурі 4; 16; 20 або 37°C відповідно 3; 6 або 20 годин.

По закінченні терміну зберігання ооцит-кумуляюсні комплекси (ОКК) вилучали методом аспірації з антральних фолікулів діаметром 2-6 мм за допомогою шприца об'ємом 5 мл та ін'єкційної голки 18 розряду.

Вилучені ооцит-кумуляюсні комплекси оцінювали під мікроскопом й розподіляли на три категорії за наступними морфологічними характеристиками: (рис. 1)

- ОКК першої категорії – внутрішньоклітинна маса рівного кольору; найближчі до зони пелюциду кумулюсні клітини мають вид 3...4-х чітких шарів дуже щільно притиснутих один до одного клітин циліндричного типу епітелію; гранульозні клітини округлені, щільної упаковки, з рівною та чіткою границею яйценосного горбика;

- ОКК другої категорії – внутрішньоклітинна маса рівномірно забарвлена; кумулюс одно або двошаровий; гранульозні клітини з різним ступенем експансії, чітка границя яйценосного горбика відсутня;

- ОКК третьої категорії – кумулюсні та гранульозні клітини відсутні, або одиничні; внутрішньоклітинна маса рівномірно забарвлена, або з темними вклученнями.

Ооцит-кумуляюсні комплекси 1-ї та 2-ї категорій культивували in vitro протягом 24 годин за наступних умов: склад середовища дозрівання – ТСМ 199 з 20% фетальної сироватки теляти (v/v) доповненого ФСГ (0,5 мкг/мл), ЛГ (5 мкг/мл), естрадіолом 17β (1 мкг/мл), епідермальним фактором росту (10 нг/мл), пенициліном (100 ОД/мл) та

стрептомицином (0,1 мг/мл). Температура культивування - 38,5⁰С, газове середовище з 5 % CO₂ й 100% вологості. По закінченні культивування ОКК

піддавали цитогенетичному аналізу з метою оцінки ядерного дозрівання.

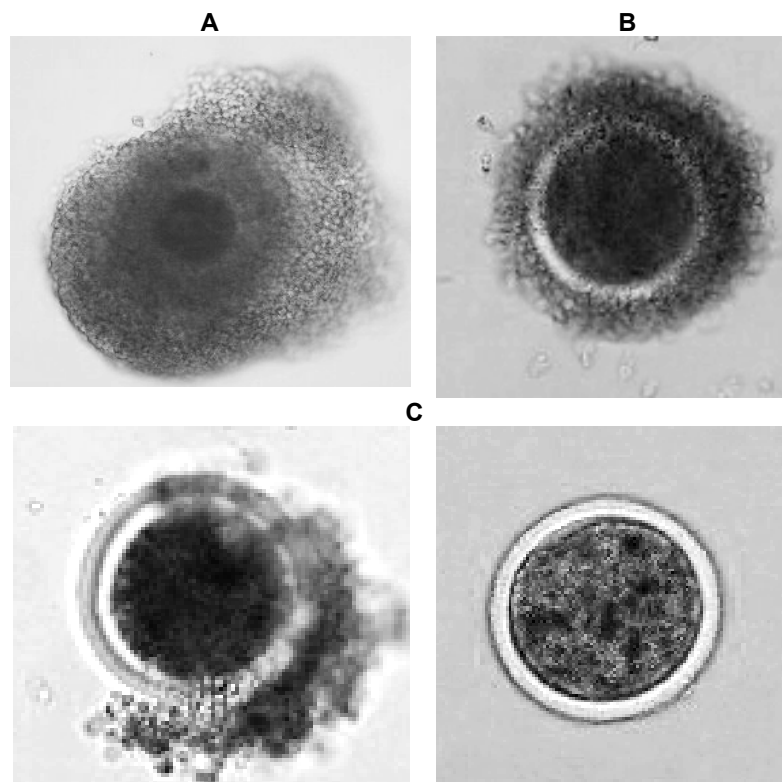


Рис. 1 Розподіл ооцит-кумулясних комплексів за категоріями: А - ОКК першої категорії; В- ОКК другої категорії; С – ОКК третьої категорії

Результати досліджень. Фолікулярні соматичні клітини відіграють важливу роль у процесах фолікулогенезу та оогенезу *in vivo*.

При культивуванні *in vitro* вилучених із антральних фолікулів ооцит-кумулясних комплексів клітини кумулюсу відповідають за підтримку у ооциті блокування мейозу на стадії зародкового пухирця [5], приймають участь у відновленні мейотичного дозрівання, шляхом проведення ЛГ сигналу в ооцит [6], а також відповідають за повноцінність цитоплазматичного дозрівання ооциту [7]. В цілому, такі фактори як багат шаровість та ступінь компактизування клітин кумулюсу визна-

чають подальший потенціал розвитку ооциту після запліднення [8].

Тому у першій серії експерименту нами було досліджено морфологічний стан ооцит-кумулясних комплексів після зберігання яєчників протягом 3-20 годин за різних температур у двох різних середовищах.

Встановлено (табл. 1), що за умов найменш тривалого (тригодинного) зберігання яєчників у обох середовищах вірогідне зниження відсотка ОКК 1 категорії порівняно із контролем відбувається за температур 16 та 4⁰С.

Таблиця 1

Морфологічний стан ОКК після зберігання яєчників у середовищах різного складу протягом 3 годин

Температура зберігання, °С	Середовище зберігання	ОКК всього, n	Морфологія ооцит-кумулясних комплексів		
			1 категорія, n (%)	2 категорія, n (%)	3 категорія, n (%)
контроль		173	144 (83,3) ^a	15 (8,6) ^a	14 (8,1) ^a
37	Фіз.розчин	62	42 (67,7) ^a	8 (12,9) ^a	12 (19,4) ^a
	ФБС	56	44 (78,6) ^a	2 (3,6) ^a	10 (14,3) ^a
20	Фіз.розчин	76	48 (63,1) ^{ab}	16 (21,1) ^a	12 (15,8) ^a
	ФБС	100	72 (72,0) ^a	6 (6,0) ^a	22 (22,0) ^a
16	Фіз.розчин	92	54 (58,7) ^{bc}	28 (30,4) ^b	10 (10,7) ^a
	ФБС	96	70 (72,9) ^a	14 (14,6) ^a	14 (12,5) ^a
4	Фіз.розчин	102	48 (46,2) ^c	28 (26,9) ^b	28 (26,9) ^b
	ФБС	86	50 (58,1) ^b	12 (13,9) ^a	26 (28,0) ^b

* У даній таблиці й у наступних значення із різними суперскриптами у колонках різняться із вірогідністю не нижче $p < 0,05$

Причому за температури 16⁰С воно зумовлено збільшенням частки ОКК 2 категорії, тоді як за температури 4⁰С відбувається вірогідне збільшення відсотка ОКК 3-ї категорії, що є непридатними для наступного культивування *in vitro*.

Слід зазначити, що на морфофункціональний стан ОКК впливає також і склад середовища зберігання яєчників. Відсоток придатних для культивування ОКК був вірогідно вищим за умов зберігання яєчників при температурах +16 та +4⁰С у фосфатному буферному середовищі порівняно із фізіологічним розчином.

Дворазове подовження терміну зберігання яєчників (табл. 2) призводить до більш виражених змін у розподілі ОКК за категоріями, порівняно з контролем. Частка придатних для культивування ОКК вірогідно зменшується для усіх температур, причому у фізіологічному розчині це зменшення зумовлене переважним збільшенням частки ОКК 3-ї категорії, тоді як у ФБС воно відбувається за рахунок збільшення частки ОКК 2-ї категорії. Найбільш високий вихід придатних для культивування ОКК отримано при зберіганні яєчників за температур +37 та +20⁰С у ФБС.

Таблиця 2

Морфологічний стан ОКК після зберігання яєчників у середовищах різного складу протягом 6 годин

Температура зберігання, °С	Середовище зберігання	ОКК всього, n	Морфологія ооцит-кумулясних комплексів		
			1 категорія, n (%)	2 категорія, n (%)	3 категорія, n (%)
контроль		173	144 (83,3) ^a	15 (8,6) ^a	14 (8,1) ^a
37	Фіз.розчин	64	42 (58,3) ^b	10 (13,9) ^a	20 (27,8) ^b
	ФБС	62	38 (61,3) ^b	18 (29,0) ^c	6 (9,7) ^a
20	Фіз.розчин	96	52 (58,3) ^b	16 (16,7) ^b	24 (25,0) ^b
	ФБС	60	42 (70,0) ^{ab}	6 (10,0) ^a	14 (23,3) ^b
16	Фіз.розчин	98	48 (49,0) ^c	20 (20,4) ^b	30 (30,6) ^b
	ФБС	68	42 (61,8) ^b	10 (14,7) ^a	16 (23,5) ^b
4	Фіз.розчин	104	42 (40,4) ^c	32 (30,8) ^c	30 (28,8) ^b
	ФБС	70	38 (54,3) ^c	14 (20,0) ^b	18 (25,7) ^b

У випадку майже добового зберігання яєчників (табл. 3) за усіх досліджуваних умов відбувається подальше підвищення рівня дегенеративних змін у фолікулах. Найвиразніші морфологічні

зміни стану ОКК відмічено при температурі 37⁰С у обох середовищах у порівнянні як з контролем, так і з іншими дослідними групами.

Таблиця 3

Морфологічний стан ОКК після зберігання яєчників у середовищах різного складу протягом 20 годин

Температура зберігання, °С	Середовище зберігання	ОКК всього, n	Морфологія ооцит-кумулясних комплексів		
			1 категорія, n (%)	2 категорія, n (%)	3 категорія, n (%)
контроль		173	144 (83,3) ^a	15 (8,6) ^a	14 (8,1) ^a
37	Фіз.розчин	88	0	4 (4,5) ^a	84 (95,5) ^b
	ФБС	80	2 (2,5) ^e	22 (27,5) ^b	56 (70,0) ^b
20	Фіз.розчин	96	44 (45,8) ^b	28 (29,2) ^b	24 (25,0) ^c
	ФБС	82	46 (56,1) ^c	20 (24,4) ^b	16 (19,5) ^a
16	Фіз.розчин	96	36 (37,5) ^b	36 (37,5) ^c	24 (25,0) ^d
	ФБС	74	38 (51,4) ^c	16 (21,6) ^a	20 (27,0) ^c
4	Фіз.розчин	86	24 (27,9) ^d	28 (32,6) ^d	34 (39,5) ^f
	ФБС	66	16 (25,0) ^d	30 (46,8) ^d	18 (28,2) ^d

Найвищий відсоток придатних для культивування ОКК одержано при зберіганні яєчників у діапазоні температур +16 та +20⁰С, причому перевагу має більш складне середовище ФБС порівняно із фізіологічним розчином.

Таким чином, вірогідні морфологічні зміни ооцит-кумулясних комплексів відбуваються вже через 6 годин зберігання яєчників, що проявляється, у першу чергу, у зменшенні шарів клітин кумулюсу, що оточують ооцит. Більш вираженими ці зміни є при температурах 4 та 37⁰С. При цьому майже за усіх досліджених температурних і часових параметрів зберігання яєчників середовище ФБС було більш прийнятним порівняно із фізіологічним розчином.

Враховуючи це у другій серії експериментів нами було оцінено процес мейотичного дозрівання поза організмом ОКК після зберігання яєчників у ФБС.

Кінетику зміни рівня ядерного дозрівання ооцитів, вилучених із яєчників, що зберігалися протягом різного часу за різних температур наведено на рис. 2.

Встановлено, що додаткове зберігання яєчників за усіх досліджуваних температур негативно впливає на компетентність ооцитів до дозрівання поза організмом зменшуючи відсоток клітин, що реїніціювали мейоз й досягли стадії метафази II порівняно із контролем.

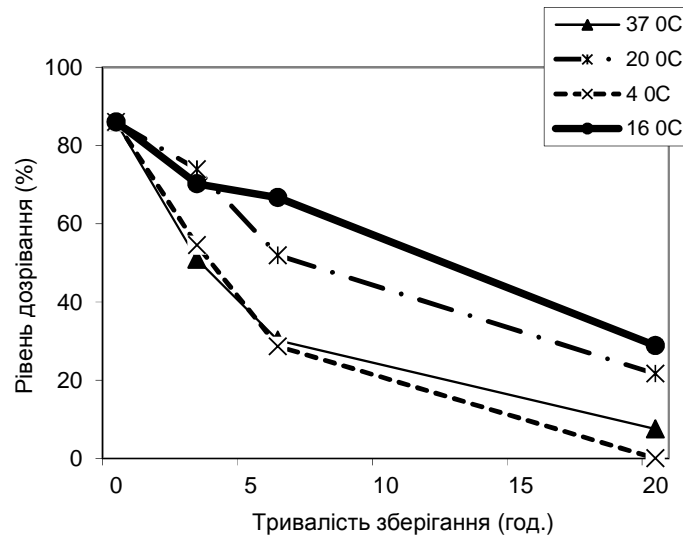


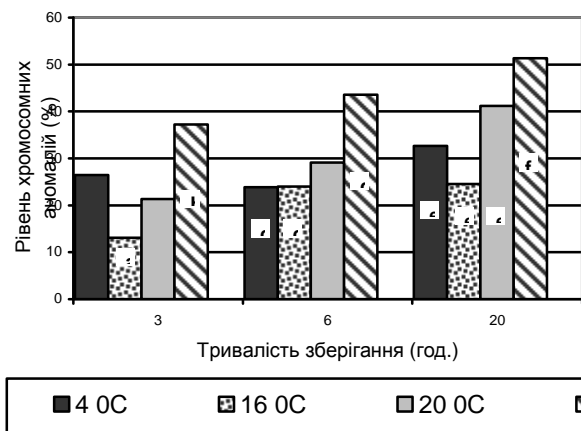
Рис. 2 Вплив температури довготривалого зберігання яєчників у ФБС на здатність ооцитів до ядерного дозрівання *in vitro*

Найбільш значущі негативні зміни спостерігаються за температур 4 та 37⁰С. Найвищим відсоток ооцитів на стадії метафази II був після 3-годинного зберігання за температур 16 та 20⁰С. Подовження терміну зберігання яєчників до 6 годин за температури 20⁰С вірогідно знижувало рівень дозрівання ооцитів й не мало негативного впливу на цей показник за температури 16⁰С. Після 20-годинного зберігання за даних температур спостерігалось подальше вірогідне зниження рівня дозрівання ооцитів. Хоча найвищим цей показник був за умов зберігання яєчників при температурі 16⁰С, він становив лише 28,8%.

Більшість ооцитів, що реїніціювали але не завершили ядерне дозрівання знаходилися на стадії метафази I. Проведений цитогенетичний аналіз виявив також наявність в усіх групах ооцитів з дегенеративними змінами хромосом.

Як свідчать дані, наведені на рис. 3 за будь-якого терміну зберігання найвищий відсоток ооцитів з дегенеративними змінами хромосом виявлено при температурі 37⁰С.

При даній температурі цей показник збільшувався із подовженням часу зберігання з 37,2 до 51,1%. Найменший відсоток ооцитів з дегенерацією хромосом в усіх групах виявлено при температурі +16⁰С. При цьому за 3-годинного зберігання яєчників цей показник був мінімальним і становив 13,1%, а з подовженням зберігання до 6 годин дещо збільшувався до 24% й залишався на цьому рівні при 20-годинному зберіганні. В цілому протягом усього терміну зберігання відсоток ооцитів з хромосомними порушення у процесі мейозу був меншим за понижених температур зберігання (4 та 16⁰С) порівняно із більш високими (20 та 37⁰С).



a:b; c:d; e:f – p<0,05

Рис. 3 Вплив тривалості зберігання яєчників на рівень дегенеративних змін хромосом в ооцитах під час дозрівання *in vitro*

Таким чином на процес ядерного дозрівання ооцитів у більшому ступені впливає термін зберігання яєчників. За умов 20 годинного зберігання у середовищі ФБС не більш ніж 28,8% ооцитів здатні досягати стадії метафази II, при цьому рівень хромосомних аномалій є найвищим.

Висновки

1. Додаткове зберігання яєчників протягом 3-20 годин у діапазоні позитивних температур від 4⁰С до 37⁰С впливає на фізіологічний стан, як ооциту так і соматичних клітин кумулюсу. При цьому найкращі результати за рівнем вилучення придатних для культивування ОКК за усіх дослі-

джених часових періодів отримано при температурах 16 та 20⁰С.

2. Склад середовища зберігання яєчників також впливає на морфо-функціональний стан ооцит-кумулясних комплексів. Встановлено перевагу фосфатного буферного середовища, порівняно із фізіологічним розчином.

3. Додаткове зберігання яєчників за усіх досліджуваних умов знижує їх потенціал до ядерного дозрівання та підвищує відсоток дегенеративних порушень хромосом під час мейозу. Найбільш прийнятним є 6-годинне зберігання яєчників у середовищі ФБС при температурі +16⁰С.

Список використаної літератури:

1. Lonergan P., Carolon C., Merillod P. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions.// *Reprod., Nutr., Dev.*- 1994.- V.34,N.4.- P.329-339.
2. Brackett B.G., Zuelke K.A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos // *Theriogenology.*- 1996.- V.39, N1.- P.43-64.
3. Solano R., de Armas R., Pupo C.A. Short term preservation of inrafollicular oocytes at 4⁰С.// *Theriogenology.*- 1994.- V.41.- P.299
4. Pollard J.W., Martino A., Rumph N.D., Songsasen N. et al. Effect of ambient temperature during oocyte recovery on in vitro production of bovine embryos.// *Theriogenology.*- 1996.- V.46.- P. 849-859
5. Dekel N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP.// *Ann N Y Acad Sci.* – 1988.- V.541.- P. 211–216.
6. Mattioli M. Barboni B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus–oocyte complex. // *Mol. Cell Endocrinol.*- 2000.- V. 161.- P. 19–23.
7. Mori T., Amano T., Shimizu H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro.// *Biol Reprod.*- 2000.- V. 62.- P. 913–919.
8. Li R., Norman R.J., Armstrong D.T. Oocyte secreted factor(s) determina functional differences between bivine mural granulosa cells and cumulus cells.// *Biol. Reprod.*- 2000.- V.63.- P.839-845

В сравнительном аспекте исследовано влияние хранения яичников в двух средах различного состава в течение 3-20 часов в диапазоне температур 4-37⁰С на морфологическое состояние ооцит-кумулясных комплексов и их компетентность к созреванию in vitro. Установлено преимущество использования в качестве среды хранения ФБС по сравнению с физиологическим раствором. Дополнительное хранение яичников при всех исследуемых условиях снижает потенциал ядерного дозревания ооцитов и повышает процент дегенеративных изменений хромосом в процессе мейоза. Наиболее приемлемым является 6-часовое хранение яичников в среде ФБС при температуре +16⁰С.

It was compared the effect of ovary storage in two media with different composition during 3-20 h. in the range of temperatures 4-37⁰С on morphological state of oocyte-cumulus complexes and their competence to in vitro maturation. It as established the advantage of the PBS as preservation medium in compare with physiological solution. Additional storage of ovaries at all studied conditions reduces oocytes nuclear maturation potential and increases the rate of degenerative changes of chromosomes in the process of meiosis. Most acceptable is 6-hours storage of ovaries in PBS at the temperature +16⁰С.

Дата надходження в редакцію: 25.02.2013 р.

Рецензент: д.с.-х.н., професор Ю.В. Бондаренко