



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 636.39:591.465.3

© 2015

В.В. Дзіцюк,
доктор сільсько-
господарських наук

А.Б. Зюзюн

О.С. Осипчук

Інститут розведення
і генетики тварин
імені М.В.Зубця НААН

АНАЛІЗ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КІЗ ТА ПАРАМЕТРІВ ЇХ ДОЗРІВАННЯ В УМОВАХ *IN VITRO*

Мета. Аналіз популяцій ооцит-кумулюсних комплексів кіз і визначення оптимальних часових параметрів їх дозрівання в умовах *in vitro*. **Методи.** Генетичні (цитогенетичний аналіз хромосомних змін під час дозрівання ооцитів *in vitro*), біометричні. **Результати.** Установлено, що за цитоморфологічними ознаками ооцит-кумулюсних комплексів кіз, придатних до подальшого культивування *in vitro*, із яєчників на стадії фолікулярного росту отримано на 15,9% більше, ніж на лютеїновій стадії. **Висновки.** Для отримання ооцит-кумулюсних комплексів кіз доцільніше використовувати яєчники на стадії фолікулярного росту. Оптимальний час культивування ооцитів кіз *in vitro* для досягнення стадії метафази II мейозу — 27 год.

Ключові слова: ооцит-кумулюсні комплекси, кози, *in vitro*, морфологічний аналіз, цитогенетичний аналіз.

Постановка проблеми. Останні досягнення репродуктивної біотехнології — це удосконалення методів отримання ембріонів поза організмом і спроб трансплантації стовбурових клітин [12].

Застосування репродуктивної біотехнології в козівництві допоможе використовувати генетично цінні, але біологічно слабкі сперматозоїди для отримання великої кількості ембріонів від однієї генетично цінної тварини [1]. Етапи дозрівання ооцитів кіз та отримання ембріонів *in vitro* дуже подібні до тих, що застосовують для великої рогатої худоби та овець, але виявлено і певні особливості. Основні етапи отримання ембріонів кіз поза організмом: дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК), запліднення дозрілих до метафази II (М II) ооцитів *in vitro* свіжоотриманими або заморожено-розмороженими сперматозоїдами та культивування отриманих ембріонів до передімплантаційних

стадій, які можна пересадити реципієнту або криоконсервувати для подальшого використання [3–5]. Розвиток ембріонів *in vitro* залежить від процесів, що відбуваються під час ядерного та цитоплазматичного дозрівання ооцитів [6, 11, 13]. Нині рівень дозрівання ооцитів кіз поза організмом набагато нижчий, ніж за їх отримання *in vivo*, що пов'язано з якістю ооцитів, відібраних на культивування [4]. Незважаючи на кількість проведених досліджень, методи відбору та культивування ОКК кіз *in vitro* потребують удосконалення [9].

Мета досліджень — аналіз популяцій ОКК кіз, отриманих із яєчників, і визначення оптимальних часових параметрів їх дозрівання в умовах *in vitro*.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН. Для проведення

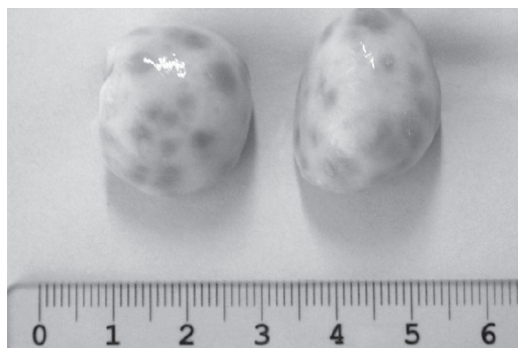


Рис. 1. Яєчники кози на фазі фолікулярного росту

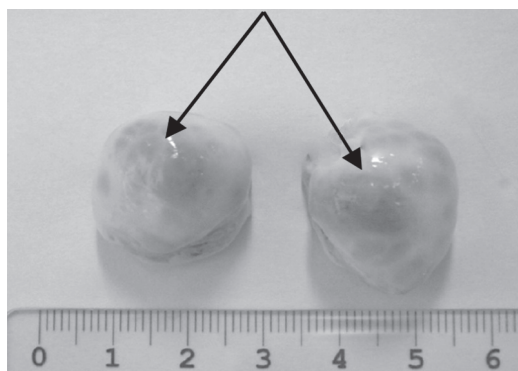


Рис. 2. Яєчники кози на лютеїновій фазі (стрілками вказані жовті тіла)

досліджень були відібрані яєчники кіз на стадії фолікулярного росту та на лютеїновій фазі [2]. Отримання ОКК із преантральних фолікулів яєчників здійснювалось розсіченням фолікулів лезом безпечної бритви в чашці Петрі із середовищем Дюльбекко із додаванням 0,075 мг/мл канаміцин сульфату. Культивування відібраних ОКК кіз *in vitro* проводили в пластикових чашках Петрі у середовищі для дозрівання — 199 на розчині Ерла (Sigma, M 5017), яке доповнювали 20% інактивованої еструсної сироватки крові

корів (власного приготування), 0,068 мг/мл канаміцин сульфату, 0,11 мг/мл пірувату натрію і 0,1 мг/мл глутаміну. До середовища для культивування додавали клітини гранульози — 3–5·10⁶ на 1 мл.

Для дослідження стану хроматину із ооцитів готували сухоповітряні препарати за модифікованим методом Тарковського [10]. Фарбування препаратів проводили 2%-им розчином барвника Гімза. Для оцінки морфологічного стану ооцитів та аналізу цитогенетичних препаратів використовували світловий мікроскоп МБС-9, Jenaval. Статистичну обробку даних проводили за допомогою критерію Ст'юдента.

Результати досліджень. Для здійснення комплексного аналізу популяцій ОКК, вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу, відібрано яєчники на стадії фолікулярного росту та на лютеїновій фазі. Вилучені яєчники, які були на стадії фолікулярного росту, не мали ознак овуляції та жовтих тіл, а яєчники на лютеїновій фазі мали сформовані жовті тіла (рис. 1, 2).

З досліджуваних яєчників (n=8) одержано 166 ОКК, при цьому з 4-х яєчників на стадії фолікулярного росту одержали 110 ОКК, а з 4-х яєчників на лютеїновій фазі — 56 ОКК, тобто на 32,6% менше. Популяцію ооцитів, залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляли на 4 групи: I група — ОКК зі щільним кумулюсом, неушкодженою прозорою оболонкою та гомогенною невакуолізованою ооплазмою правильної округлої форми; II — ОКК із розпушеним кумулюсом та однорідною ооплазмою; III — частково позбавлені клітин кумулюса але з однорідною ооплазмою без ознак атрезії; IV група — атретичні ОКК (денудовані або з малою кількістю кумулюсних клітин, ооплазма з ознаками дегенерації).

За результатами морфологічної оцінки ОКК встановлено, що придатних до культивування ооцитів (I–III груп) із яєчників на стадії фолікулярного росту вилучено на 15,9% більше, ніж

1. Морфологічний аналіз ооцит-кумуляюсних комплексів, вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу (за групами)

Фаза естрального циклу	Загальна кількість ОКК, n	ОКК, придатні до подальшого розвитку поза організмом, n (%)			ОКК, не придатні до подальшого розвитку поза організмом, n (%)
		I	II	III	IV
Фолікулярна	110	46 ^a (41,8 ± 4,7)	29 ^b (26,4 ± 4,2)	19 ^c (17,3 ± 3,6)	16 ^d (14,5 ± 3,3)
Лютеїнова	56	18 ^a (32,1 ± 6,2)	15 ^b (26,8 ± 5,9)	6 ^c (10,7 ± 4,1)	17 ^e (30,4 ± 6,1)

Примітки: d: e — P<0,05, критерій Ст'юдента.

2. Цитогенетичний аналіз ооцит-кумулясних комплексів, вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу, п (%)

Фаза естрального циклу	Загальна кількість ОКК, п	Кількість ооцитів на стадії диплотени, п (%)				Дегенерація хроматину, п (%)
		дифузної	фібрилярної	видимих бівалентів	метафази II	
Фолікулярна	110	54 ^a (49,0±4,7)	28 ^b (25,5±4,1)	6 ^c (5,5±2,1)	4 ^d (3,6±1,7)	18 ^e (16,4±3,5)
Лютеїнова	56	20 ^a (35,7±6,4)	13 ^b (23,2±5,6)	2 ^c (3,6±2,4)	2 ^d (3,6±2,4)	19 ^f (33,9±6,3)

Примітка: e:f — P<0,05, критерій Ст'юдента.

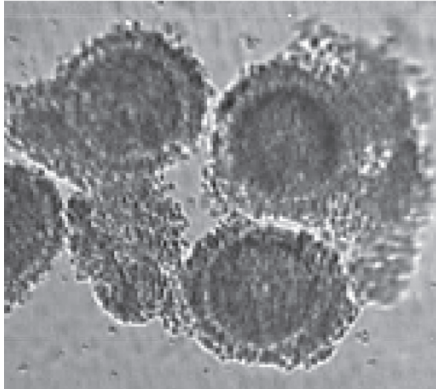


Рис. 3. Зажиттєве фото ОКК кози, придатних до культивування *in vitro* (зб. об. 10×, ок. 10×)

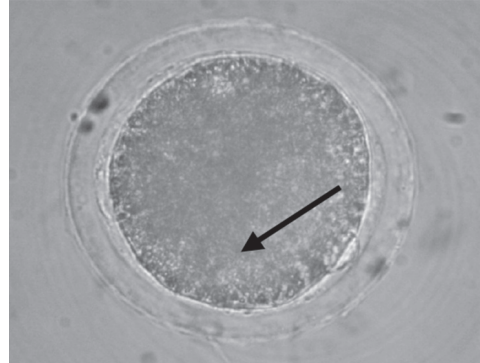


Рис. 4. Ооцит кози після культивування *in vitro*. Ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка) (зб. об. 10×, ок. 10×)

із яєчників на лютеїновій фазі. Крім того, у популяції ОКК, вилучених із яєчників на лютеїновій фазі, отримано значно більшу кількість (P<0,05) дегенерованих ооцитів (табл. 1).

В отриманих на різних фазах естрального циклу ОКК аналізували стан хроматину на виготовлених цитогенетичних препаратах. Результати досліджень свідчать, що більшість ОКК кіз, вилучених із яєчників на фолікулярній і лютеїновій фазах, перебували на стадії диплотени. При цьому найбільше гамет (49%), вилучених із яєчників на фазі фолікулярного росту, і 35,7% ОКК із яєчників на лютеїновій фазі перебували на стадії

дифузної диплотени (табл. 2).

Більшу кількість гамет (33,9%) (P<0,05) з ознаками дегенерації хроматину виявлено в популяції ОКК, вилучених із яєчників на лютеїновій фазі.

Джерела літератури повідомляють, що кількість ооцитів кіз, дозрілих до метафази II після 24–27-годинного культивування, значно більша, ніж після 21-годинного. Також є інформація, що рівень запліднення ооцитів значно вищий після культивування протягом 24–27 год, ніж після культивування 21 або 30 год [7, 8]. Тому нами досліджено 3 часові параметри культивування *in vitro* ооцитів

3. Визначення оптимального часу культивування ооцит-кумулясних комплексів кіз в умовах *in vitro*

Час культивування ОКК, год	Кількість ооцитів, п	Кількість ооцитів на стадії					Кількість ооцитів з дегенерованим хроматином, п (%)
		диплотени, п (%)			метафази I, п (%)	метафази II, п (%)	
		дифузної	фібрилярної	видимих бівалентів			
24	59	11 ^a (18,6±5,0)	16 ^c (27,1±5,7)	7 ^e (11,9±4,2)	5 ^f (8,5±3,6)	14 ^g (23,7±5,5)	6 (10,2±3,9)
27	55	9 ^{ab} (16,4±4,9)	8 ^{cd} (14,6±4,7)	2 ^e (3,6±2,5)	2 ^f (3,6±2,5)	29 ^h (52,7±6,7)	5 (9,1±3,8)
30	56	3 ^b (5,3±3,0)	7 ^d (12,5±4,4)	3 ^e (5,4±3,0)	1 ^f (1,8±1,7)	31 ^h (55,4±6,6)	11 (19,6±5,3)

Примітка: a:b; c:d — P<0,05; g:h — P<0,001, критерій Ст'юдента.

кіз — 24, 27 і 30 год.

Для культивування *in vitro* відібрали 170 ОКК відмінної та доброї якості, покритих кількома шарами клітин кумулюсу (рис. 3). Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільця (рис. 4).

За результатами аналізу цитогенетичних препаратів ооцитів після їх 24-годинного культивування встановлено, що лише у 32,2% ооцитів відбулось ініціювання мейозу і такі клітини перебували на стадії метафази I і метафази II мейозу. Решта ооцитів кіз (57,6%) залишалася на стадії диплотени. Отже, 24-годинне

культивування незрілих ооцитів кіз забезпечує лише 23,7% дозрівання в умовах *in vitro*.

Після 27-годинного культивування ооцитів стадії метафази II мейозу досягло 52,7% ооцитів, не відновили мейотичні перетворення і залишилися на стадії диплотени дифузної 16,4, фібрилярної — 14,6% ооцитів (табл. 3).

За подовження часу культивування до 30 год кількість гамет, які перебували на стадії диплотени дифузної, зменшилася на 11,1%, хоча ця різниця не вірогідна та має тенденцію до збільшення кількості ооцитів із дегенерованим хроматином на 10 %.

Висновки

За результатами морфологічної оцінки та цитогенетичного аналізу популяцій ОКК встановлено, що придатних до культивування ооцитів (I–III груп) із яєчників на стадії фолікулярного росту вилучено більше, ніж із яєчників на лютеїновій фазі. Крім того, в популяції ОКК, вилучених із яєчників на лютеїновій фазі, отримано значно більшу кількість ($P < 0,05$) дегенерованих ооцитів. Тому для отримання

ОКК кіз доцільніше використовувати яєчники на стадії фолікулярного росту. Культивування ооцитів кіз протягом 27 год в умовах *in vitro* дало змогу підвищити ($P < 0,001$) рівень дозрівання до 52,7% ооцитів і зменшити відсоток гамет з дегенерованим хроматином до 9,1 %. Отже, оптимальний час культивування ооцитів кіз *in vitro* для досягнення стадії метафази II мейозу — 27 год.

Бібліографія

1. 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.
2. 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.
3. Crozet N. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*/ N. Crozet, M. Ahmed-Ali, M.P. Dubos//J. Reprod. Fertil. — 1995. — V. 103. — P. 293–298.
4. Current status of embryo technologies in sheep and goat /Y. Cognie, G. Baril, N. Poulin, P. Mermillod// Theriogenology. — 2003. — V. 59. — P. 171–188.
5. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery/J. Koeman, C.L. Keefer, H. Baldassarre, B.R. Downey//Theriogenology. — 2003. — V. 60. — P. 879–889.
6. Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM–IVF oocytes/ D. Izquierdo, P. Villamediana, M. Lopez-Bejar, M.T. Paramio//Theriogenology. — 2002. — V. 57. — P. 1431–1441.
7. Factors influencing, *in vitro* fertilization in goats/ J. Zhou, W.U. Yan-Guang, L. Ming-Jiu, H. Dong et al.//Acta Zoologica Sinica. — 2004. — V. 50 (2). — P. 216–221.
8. Katska-Ksiazkiewicz L. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats/L. Katska-Ksiazkiewicz, J. Opiela, B. Rynska//Theriogenology. — 2007. — V. 68. — P. 736–744.
9. Masudul S. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes in goat: effect of collection techniques and follicular fluid on *in vitro* maturation and fertilization of oocytes in goat/S. Masudul, A. Hoque, M.A.M. Yahia Khandoker//Paperback. — 2011. — V. 13. — P. 374–382.
10. Tarkowski A K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs/A.K. Tarkowski// Cytogenetics. — 1966. — V. 5, № 3. — P. 394–400.
11. Teotia A. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayers/A. Teotia, G.T. Sharma, A.C. Majumdar//Small Rum. Res. — 2001. — V. 40. — P. 165–177.
12. Tibary A. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids/A. Tibary, A.A. Anouassi, H. Khatir//Theriogenology. — 2005. — V. 64. — P. 618–638.
13. Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes/B Wang, H. Baldassarre, T. Tao et al.//Mol. Reprod. Dev. — 2002. — V. 63. — P. 437–443.

Надійшла 31.08.2015.