

**ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО
СТАНУ СТРУКТУРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ АНТРАЛЬНИХ
ФОЛІКУЛІВ ПРИ ПРОЛОНГОВАНОМУ
ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ ЯЄЧНИКІВ ВЕЛИКОЇ
РОГАТОЇ
ХУДОБИ**

М. Д. Гречуха, Г. В. Міненко
rector@lnau.lg.ua

Луганський національний аграрний університет
м. Луганськ, 91008, Україна

Досліджено вплив пролонгованого зберігання яєчників при температурах $+4^{\circ}\text{C}$ або $+16^{\circ}\text{C}$ в середовищі Дюльбекко або фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS) на морфо-функціональний стан ооцит-кумулясних комплексів, клітин гранульози і фолікулярної рідини. Встановлено, що при зберіганні яєчників в досліджуваних умовах зростає ступінь пошкодження всіх структурних елементів антральних фолікулів. За результатами ядерного дозрівання ооцитів найбільш прийнятними умовами при 4-х годинному зберіганні яєчників є середовище Дюльбекко і температура 16°C .

Ключові слова: рН фолікулярної рідини, клітини гранульози, ооцит-кумулясні комплекси, дозрівання *in vitro*, температура зберігання.

**CHARACTERISTIC OF THE MORPHO-FUNCTIONAL
STATE OF STRUCTURAL ELEMENTS OF ANTRAL
FOLLICLES AT PROLONGED HYPOTHERMIC STORAGE
OF BOVINE OVARIES**

M. D. Hrechyha, G. V. Minenko
rector@lnau.lg.ua

Lugansk National Agrarian University,
Lugansk, 8, 91008, Ukraine

The effects of prolonged hypothermic storage of bovine ovaries in

Dulbecco medium or in phosphate buffered saline (PBS) at temperatures of 4 or 16 °C on the morpho-functional state of oocyte-cumulus complexes (OCC), the granulosa cells and the follicle fluid are investigated. It is established that during storage of the ovaries under investigating conditions, the damage of all structural elements of antral follicles increases. The more appropriate conditions for resumption and completion of meiotic maturation in oocytes at 7-hours ovary storage are Dulbecco medium and the 16 °C temperature.

Key words: pH of follicular fluid, granulosa cells, oocyte-cumulus complexes, maturation in vitro, storage temperature.

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ АНТРАЛЬНЫХ Фолликулов ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОМ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ ЯИЧНИКОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Гречуха М. Д., Миненко Г. В.
rector@lnau.lg.ua

Луганский национальный аграрный университет
г. Луганск, 8, 91008, Украина

Исследовано влияние пролонгированного хранения яичников при температурах +4 °C или +16 °C в среде Дюльбекко или фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) на морфо-функциональное состояние ооцит-кумулюсных комплексов, клеток гранулезы и фолликулярной жидкости. Установлено, что при хранении яичников в исследуемых условиях, возрастает степень повреждения всех структурных элементов антральных фолликулов. Наиболее приемлемыми условиями при 4-х часовом хранении яичников, с точки зрения ядерного созревания ооцитов, является среда Дюльбекко и температура 16 °C.

Ключевые слова: pH фолликулярной жидкости, клетки гранулезы, ооцит-кумулюсные комплексы, созревание in vitro, температура хранения, среда хранения.

На сучасному етапі розвитку тваринництва одним з перспективних методів збереження генетичних ресурсів є створення

кріобанків ооцитів і доімплантаційних ембріонів, отриманих *in vitro* [1]. При цьому первинним джерелом ооцитів зазвичай є яєчники самок, які можуть бути отримані після забою тварин з різних причин. Проте, за таких умов тривалість їх доставки в спеціалізовані лабораторії може значно перевищувати передбачений традиційною методикою 3-годинний термін. Разом з цим, під час доставки частка ішемічного пошкодження оваріальної тканини може становити від 60 до 80% загального фолікулярного пулу, а у 20-30% фолікулів спостерігаються морфологічні деструктивні зміни - процеси автолізу [2]. Отже, для збереження максимального пулу життєздатних фолікулів, як первинного джерела гамет, необхідна розробка таких умов тривалого зберігання яєчників, які дають можливість отримувати максимальний вихід ооцитів, придатних як для кріоконсервування, так і для повноцінного дозрівання і запліднення *in vitro*.

Літературні дані [3] свідчать про принципову можливість подовження терміну зберігання яєчників ссавців за рахунок гіпотермії, мета якої - уповільнення всіх метаболічних процесів, що відбуваються у тканинах. Однак, вже при температурах нижче 17 °С в ліпідах мембран виникають фазові переходи, а в білках - конформаційні перебудови. Це, у свою чергу, може призводити до активації мембранних фосфоліпаз, процесів перекисного окислення ліпідів, порушенню роботи мембранозв'язаних ферментів енергетичного обміну, зміні поверхневого заряду мембран, іонного гомеостазу і структурної стабільності клітин [4].

Враховуючи вищевикладене, метою нашої роботи було вивчення впливу пролонгованого зберігання яєчників при знижених температурах на морфо-функціональний стан таких структурних елементів антральних фолікулів, як ооцит-кумулясні комплекси, клітини гранульози і фолікулярна рідина.

Матеріал і методика досліджень. Об'єктом дослідження слугували яєчники корів і телиць, вилучені після забою тварин на Луганському м'ясокомбінаті. У лабораторію яєчники доставляли у фізіологічному розчині з додаванням гентаміцину (50 мкг/мл), протягом двох-трьох годин. Відразу після доставки, яєчники піддавали процедурі аспірації (контрольна група) або зберігали додатково протягом 4-х годин при температурі 4 або 16 °С у фосфатно-сольовому буфері (PBS), або середовищі Дюльбекко. Після закінчення терміну зберігання фолікулярну рідину, клітини гранульози і ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) вилучали методом аспірації з антральних фолікулів діаметром 3-6 мм.

Значення рН фолікулярної рідини вимірювали іономіром рХ-150. Збереженість клітин гранульози визначали шляхом фарбування трипановим синім.

Придатні за морфологічними ознаками для подальшого дозрівання ОКК культивували *in vitro* протягом 24 годин у середовищі TCM-199 з додаванням 10% фетальної сироватки теляти (v/v), ФСГ (10 мкг/мл), ЛГ (50 мкг/мл), естрадіолу 17 β (1 мкг/мл) і гентаміцину (50 мкг/мл). Температура культивування - 39,2 °С, газове середовище з 5% CO₂ при 100% вологості.

Після закінчення культивування морфологічно оцінювали ступінь експансії клітин кумулюсу за наступною класифікацією [5]:

- 0 категорія - ОКК без прояву експансії кумулюсу;
- 1 категорія - експандовані тільки зовнішні шари кумулюсу;
- 2 категорія - експансія охоплює близько 50% зовнішніх шарів кумулюсу, проте в клітинах сонона *radiata* експансія відсутня ;
- 3 категорія - експансія охоплює близько 2/3 клітинної маси кумулюсу, з частковою експансією клітин сонона *radiata*;
- 4 категорія - ОКК характеризуються повною експансією і зовнішніх кумулюсних шарів і клітин сонона *radiata*.

Для оцінки ядерного дозрівання проводили цитогенетичний аналіз стадій мейозу, використовуючи метод приготування давлених препаратів з фарбуванням хромосом ацетогематоксиліном [6].

Результати досліджень. Антральний фолікул є складною взаємопов'язаною системою, що об'єднує декілька типів фолікулярних клітин, які відіграють істотну роль у підтримці нормальної метаболічної активності і регуляції мейозу в ооциті [7]. У свою чергу, комунікаційний взаємозв'язок між різними типами клітин опосередкований фолікулярною рідиною.

Тому в першій серії експериментів нами було досліджено вплив гіпотермічного зберігання яєчників у двох різних середовищах на рН фолікулярної рідини.

Отримані результати представлені на рисунку 1.

Встановлено, що при зберіганні яєчників протягом 4-х годин відбувається зниження рН фолікулярної рідини від 7,1 до 6,5-6,9, залежно від досліджуваних умов. При цьому характер зниження рН за різних температур змінюється залежно від складу середовища.

Так, зниження температури до 4 °С при зберіганні у фосфатно-сольовому буфері призводить до більш різкого зниження рН фолікулярної рідини до 6,5, тоді як у середовищі Дюльбекко при даній температурі по відношенню до контролю, виявляються мінімальні зміни рН. При температурі 16 °С в обох середовищах зберігання

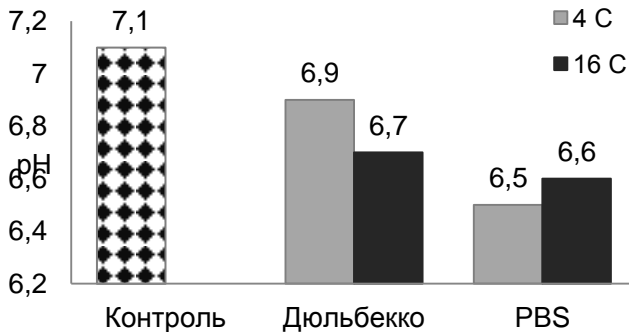


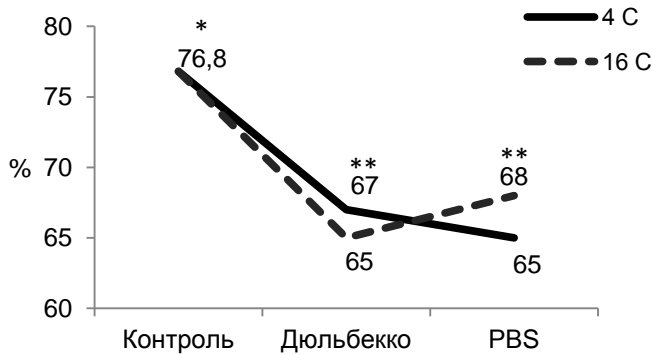
Рис. 1. Зміна рН фолікулярної рідини при зберіганні яєчників корів у середовищах Дюльбекко та фосфатно-сольовому буфері при різних температурах

спостерігається приблизно рівний ступінь закислення фолікулярної рідини.

Зниження рН фолікулярної рідини в умовах ішемії може бути результатом переходу клітин фолікула від аеробного до анаеробного метаболізму, накопичення молочної і фосфорної кислоти і, як наслідок, збільшення ступеня ацидозу [8]. Ймовірно, інтенсивність цих процесів при 16 °С достатньо висока в обох середовищах. Тоді як при 4 °С, за умови присутності в середовищі енергетичних субстратів, метаболічні зміни мають менший прояв.

В той же час, за даними [9] закислення фолікулярної рідини при зберіганні яєчників людини в умовах гіпотермії не мало негативного впливу ні на вихід морфологічно повноцінних ОКК, ні на рівень їх заплідненості.

Тому, в наших наступних дослідженнях нами було вивчено збереженість різних типів фолікулярних соматичних клітин. Встановлено, що в цілому характер зміни рівня збереженості клітин гранулози (рис. 2) подібний до змін, встановлених для рН. Проте, незалежно від температури або складу середовища зберігання відбувається достовірне зниження відсотка життєздатних клітин у порівнянні з контролем на 8,8-11,8%.

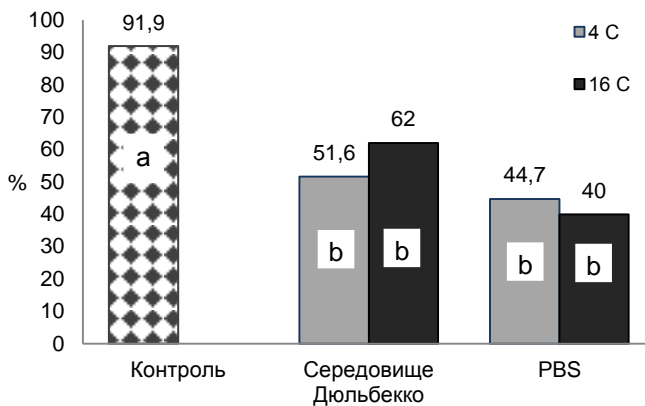


*- $p < 0,05$

Рис. 2. Вплив умов зберігання яєчників в середовищах Дюльбекко та фосфатно-сольовому буфері на збереженість клітин гранульози

Функціональний стан клітин кумулюсу оцінювали за їх здатністю до експансії в процесі дозрівання ОКК при культивуванні поза організмом.

Результати представлені на рисунку 3.



a:b - $p < 0,001$

Рис. 3. Ступінь експансії клітин кумулюсу залежно від умов зберігання яєчників

Визначено, що 4-годинне зберігання яєчників за всіх досліджуваних умов призводить до вірогідного зниження відсотка ОКК з максимальним ступенем експансії клітин кумулюсу (3-ої та 4-ої категорій). Разом з тим, для даного типу фолікулярних клітин цей процес більш виражений у фосфатно-сольовому буферному розчині у порівнянні з середовищем Дюльбекко, хоча різниця між досліджуваними групами і не вірогідна.

Оцінка компетентності ооцитів до повноцінного ядерного дозрівання (табл. 1) показала, що зберігання яєчників в умовах гіпотермії призводить до вірогідного зниження відсотка ооцитів, здатних до відновлення і завершення мейозу. При цьому, більшою мірою на цей процес впливає не склад середовища, а температура.

Таблиця 1. Рівень ядерного дозрівання ооцитів при зберіганні яєчників у середовищах Дюльбекко та фосфатно-сольовому буфері за різних температур

Середовище зберігання	Температура зберігання	n	Стадії мейозу			Ооцитів з дегенеративними змінами хромосом n (%)
			Зародковий пухирець n (%)	Діакенез-Метафаза I, n (%)	Телофаза-Метафаза II, n (%)	
Контроль		132	-	25 (18,9) ^a	107 (81,1) ^a	-
PBS	(4 ⁰ С)	74	9(12,2) ^b	30 (40,5) ^b	19 (25,6) ^{bc}	16 (21,7) ^a
	(16 ⁰ С)	41	-	18 (43,9) ^b	20 (48,8) ^b	3 (7,3) ^b
Дюльбекко	(4 ⁰ С)	67	11 (16,4) ^b	32 (47,8) ^b	22 (32,8) ^{bc}	2 (3,0) ^b
	(16 ⁰ С)	37	-	15 (40,5) ^b	20 (54,1) ^b	2 (5,4) ^b

Значення з різними суперскриптами різняться в межах стовпця з достовірністю не менше $p < 0,05$

Так, відмінність у рівні дозрівання між різними середовищами за однакової температури становила відповідно 8,5% для 4⁰С і 5,25% для 16⁰С, тоді як відмінність між температурами в межах одного середовища становила для середовища Дюльбекко - 21,25% і для фосфатно-сольового буфера – 24,5% ($p < 0,001$).

В той же час, на рівень патологічних мейозів, що виникають в процесі дозрівання ооцитів, впливає не тільки температура, а й склад середовища зберігання яєчників. Так, у фосфатно-сольовому буфері зі зниженням температури зберігання до 4 °С відсоток дегенеративних змін хромосом достовірно збільшується у порівнянні з іншими досліджуваними групами більш ніж у 5 разів.

Таким чином, використання при гіпотермічному зберіганні яєчників більш комплексного середовища Дюльбекко, що відрізняється, насамперед, наявністю енергетичних субстратів, забезпечує кращі результати збереження соматичних клітин фолікула. Тоді як збереженість гермінальної складової, з точки зору здатності до повноцінного ядерного дозрівання, визначається більшою мірою температурою.

Висновки. 1. Гіпотермічне зберігання яєчників протягом 4 годин при температурах 4 або 16 °С призводить до зниження рН фолікулярної рідини неатретичних антральних фолікулів, рівня збереженості різних типів соматичних клітин і компетентності ооцитів до ядерного дозрівання.

2. На результативність процесу зберігання яєчників впливають як температура, так і склад середовища, проте, дія цих факторів на різні структурні елементи антральних фолікулів різняться

3. Негативні зміни функціональної активності соматичних клітин фолікулів в процесі зберігання більшою мірою характерні для клітин кумулюсу у порівнянні з клітинами гранульози. Разом з тим, для даного типу клітин цей процес більш виражений у фосфатно-сольовому буферному розчині у порівнянні з середовищем Дюльбекко.

4. Найвищий рівень компетентності ооцитів до повноцінного ядерного дозрівання спостерігається за умови зберігання яєчників у середовищі Дюльбекко при температурі 16 °С.

Список використаної літератури

1. Biodiversity for Food and Agriculture. Contributing to food security and sustainability in a changing world [Outcomes of an Expert Workshop Held by FAO and the Platform on Agrobiodiversity Research], (Italy, Rome 4-16 April 2010)/FAO of the UN and PAR, 2011. – 66 p.

2. Israely T. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue / Israely T., Nevo N., Harmelin A., et al. // Human Reproduction.– 2006.– Vol.21, № 6.– P. 1368-1379.

3. Richings N. M. Growth and histology of ovarian follicles after cold storage in the tammar wallaby / Richings N. M., Shaw G., Temple-Smith P. D., et al. //Reproduction, Fertility and Development.– 2006.– Vol. 18.– P. 677-688.

4. Онищенко Н. А. Конформационная сущность повреждающего действия

гипотермии / Онищенко Н. А., Бардышева Е. А., Расторгуев Б. П. // Тр. VII Всесоюзной конференции по трансплантации органов и тканей.- Ростов-на-Дону, 1976. - С. 118-119.

5. Coy P. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems / Coy P., Ruoz S., Romar R. et al. // Theriogenology.- 1999.- V.51, №4.- P. 799-812.

6. Щегельская Е. А. «Эллиминационный хроматин» в мейозе ооцитов мышей, свиней и коров при созревании *in vitro* / Щегельская Е. А., Клименко В. В. // Цитология и генетика. – 1997. – Т.31, №3. – С. 30–35.

7. Brackett B.G. *In vitro* oocyte maturation and fertilization / Brackett B.G. // J. Anim. Sci.- 1985.- V.61.- № 3.- P.14-21.

8. Petrucci R. General chemistry in: Principles and Modern Applications / Petrucci R.- London: Collier Macmillan Publishers, 1985.- 205 p.

9. Krizanovska K. The effect of follicular fluid pH on the quality and number of oocytes produced in the *in vitro* fertilization program / Krizanovska K.// Ceska Gynekol. -2000. V.65(3).-H. 134-138.