

УДК 612.621:636.4.082.4

## ОСОБЛИВІ КЛІТИННІ СТРУКТУРИ В ООЦИТ-КУМУЛЮСНОМУ КОМПЛЕКСІ СВИНІ

*Лобченко В.О. – к. б. н., с. н. с., Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН України*

**Постановка проблеми.** Одержання зрілих яйцеклітин шляхом культивування ооцитів поза організмом із метою їх подальшого запліднення для продукування ембріонів, а зрештою й повноцінного потомства вже протягом декількох десятиліть залишається однією з найважливіших проблем біотехнології репродукції. Підтвердженням важливості таких досліджень стало присудження Нобелівської премії за 2010 рік у галузі медицини фізіологові Р. Едвардсу за досягнення в заплідненні поза організмом яйцеклітини людини. Його експерименти з дозрівання ооцитів, у тому числі й свині, поза організмом [1] були одними з перших, однак проблема й досі залишається не вирішеною остаточно через низку проблем.

Однією з таких проблем є цитоплазматичне дозрівання ооцита свині, як і інших сільськогосподарських тварин, в умовах культивування поза організмом. У той час, як ядерне дозрівання ооцита в штучних умовах вважається цілком задовільним, ембріони, одержані з таких ооцитів, виявляють низький потенціал розвитку. Це, зрештою, й послугувало головною причиною введенням поняття “цитоплазматичне дозрівання” для означення фізіологічної недостатності дозрілих поза організмом ооцитів.

Виявлення факторів, котрі обумовлюють цитоплазматичне дозрівання та біологічна сутність цього явища, є актуальною проблемою біотехнології репродукції. Численні експериментальні дослідження не привели до вирішення цієї проблеми, що значною мірою стримує розробку технології одержання штучних ембріонів із ооцитів тварин для подальшого використання їх у практиці сільськогосподарського виробництва.

На нашу думку, повноцінне дозрівання ооцита може бути пов'язане з допоміжними клітинами яйця – фолікулярним епітелієм, що оточує ооцит (кумуляус). Метою цього дослідження було вивчення стану кумулюсу впродовж дозрівання фолікула в яєчнику свині.

**Стан вивчення проблеми.** Кумулюсна маса дозріваючих фолікулів різних видів тварин, у тому числі свині, вивчалася досить ретельно [2, 3,4].

Численні та різносторонні дослідження на анатомічному, цитологічному та фізіологічному рівнях показали, що клітини фолікулярного епітелію, які оточують ооцит, об'єднані одна з одною та з ооцитом за допомогою щільних контактів (gap junctions) [5, 6]. Щодо ооцитів свині, аналогічні дослідження також відомі [7, 8]. Клітини кумулюсу та комунікаційні шляхи у вигляді щільних контактів є дуже важливими для ооцита, його живлення та повноцінного дозрівання [9, 10, 11].

Окрім того, нещодавно було встановлено [12], що на завершальному етапі дозрівання фолікула кумулюсна маса ооцита являє собою мережу з клітин та відростків, що їх поєднують, по яких у напрямку до ооцита переміщуються оптичнонепрозорі часточки, визначені як мітохондрії. Є всі підстави вважати, що ці часточки потрапляють в ооцит.

З огляду на важливість вирішення цієї проблеми, ми вважали за необхідне детально дослідити динаміку стану кумулюсної маси у процесі дозрівання ооцита, особливо на завершальних стадіях розвитку фолікула. На цьому етапі вивчали цитологічні особливості окремих клітин кумулюсу та морфологію всієї кумулюсної маси в цілому.

**Завдання та методика досліджень.** Яєчники відбирали під час забою тварин на месцевому м'ясокомбінаті. Ооцит-кумулясні комплекси для досліджень виділяли з лідируючого пулу фолікулів і вивчали тільки ті зразки, котрі мали добре розвинену кумулюсну масу. З таких ооцит-кумулясних комплексів готували нативні препарати, де основною ланкою було перетворення тривимірного просторового розташування клітин у двовимірне. Процедуру проводили за допомогою спеціально розробленого пристрою, що дозволяв поступово стискати краплину середовища з ооцит-кумулясними комплексами покривним скельцем [13]. Такі препарати досліджували мікроскопічно на предмет структурної організації клітин кумулюсної маси та їх взаємозв'язків. Від кожної тварини вивчали по 3 – 4 ооцит-кумулясні комплекси.

**Результати досліджень.** Під час вивчення нативних препаратів ооцит-кумулясних комплексів від свиноматок у проєструсі в кумулюсній масі виявлено ознаки її структурованості. Така структурованість полягає в існуванні особливих клітинних комплексів. Ці утворення були названі нами субкумулясними комплексами. Структурно вони нагадують ооцит-кумулясні комплекси: центральна частина яких це комплексоутворювач, або ядро, природа якого залишається не з'ясованою. Навколо ядра розташовуються декілька шарів клітин кумулюсу.

Однак, на деяких препаратах можна виявити відокремлення кожного з субкомплексів за ледь помітними морфологічними ознаками. Інколи можна спостерігати розпад суцільних асоціацій субкумулясних комплексів на окремі комплекси, що трапляється внаслідок процедури приготування препарату (Рис.1).

Окремі клітини кумулюсу в такому субкумулясному комплексі дуже щільно прилягають одна до одної. Розміри субкумулясних комплексів можуть суттєво відрізнятися.

Така цитологічна структура субкумулясних комплексів може бути свідченням їх функціональної окремішності. За формою такі комплекси можна охарактеризувати, як округлі, здебільшого неправильної форми, що, очевидно, викликано щільним приляганням їх один до одного.

Навколо ядра субкумулясного комплексу помітно скупчення оптично непрозорого матеріалу різного ступеня щільності. Можна спостерігати й окремі оптично непрозорі часточки як у безпосередній близькості від такого скупчення, так і на певній відстані від нього.



*Рис.1. Субкумулюсні комплекси в кумулюсній масі ооцит-кумулюсного комплексу свині*

Природа цих часточок залишається нез'ясованою. Але за багатьма ознаками це можуть бути мітохондрії. Очевидно, що вони якимось способом переміщуються від однієї клітини кумулюсу до іншої в напрямку ядра субкумулюсного комплексу, де накопичуються у вигляді досить щільної маси. Природа цього явища становить великий інтерес як з біологічної точки зору, так і з огляду на сутність процесів дозрівання фолікула та яйцеклітини.

У подальшому такі субкумулюсні комплекси на певній фазі свого розвитку зазнають змін, які полягають у редукції організаційного центру. На цій фазі добре помітні відростки кумулюсних клітин, які містять скупчення мітохондрій.

**Висновки та пропозиції.** В ооцит-кумулюсних комплексах, одержаних із фолікулів яєчників свиноматок у фазі проєструсу статевого циклу, може бути виявлена структурованість кумулюсної маси, що являє собою її організаційну перебудову та виявляється в утворенні клітинних субкумулюсних комплексів. Такі утворення можуть бути пов'язані з процесом цитоплазматичного дозрівання ооцита.

**Перспективи подальших досліджень.** З огляду на високу затребуваність ооцит-кумулюсних комплексів для одержання з низ зрілих яйцеклітин необхідне подальше глибоке та всебічне вивчення виявлених субкумулюсних комплексів із фолікулів яєчника свині та інших тварин.

#### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:**

1. Edwards R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, Rhesus monkey and human ovarian oocytes // Nature – 1965 – V. 208. – P. 349 – 351.

2. Meinecke B., Meinecke-Tillmann S., Gips H. Untersuchungen zur biomorphologischen Differenzierung des Cumulus-Oocyten-Komplexes des Schweines während der präovulatorischen Follikelreifung. // Zbl. Vet. Med. – 1984. – A. 31. – P. 370 – 385.
  3. Flechon J.E., Motlik J., Hunter R.H., Fechon B., Pivko J., Fulka J. Cumulus oophorus mucification during resumption of meiosis in the pig. A scanning electron microscope study. // Reprod. Nutr. Dev. 1986. – V. 26. – P. 989 – 998.
  4. Torner H., Brüssow K.-P., Alm H., Rátky, J., Kanitz W. Morphology of porcine cumulus-oocyte-complexes on the stage of preovulatory maturation. // Theriogenology – 1998 – V. 50 – P. 39 – 48
  5. Albertini D.F., Anderson E. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. // Journal of Cell Biology – 1974. – V.63. – P. 234 – 250.
  6. Amsterdam A., et. al. Organization of intermembranous particles in freeze-cleaved gap junctions of rat graafian follicles: Optical diffraction analysis. // Journal of Cell Science. – 1976. – V. 21. – P. 93 – 105.
  7. Norberg, H.S. The follicular oocyte and its granulosa cells in domestic pig // Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Cell and Tissue Research). – 1972. – V. 131. – P. 497 – 517.
  8. Suzuki H., Jeong B.-S., Yang X. Y. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during *in vitro* maturation of porcine oocytes. // Biology of Reproduction. – 2000. – V. 63. – P. 723 – 729.
  9. Brower, P.T., Schultz, R.M., Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: Existence and possible nutritional oocyte growth. // Developmental Biology. – 1982. – P. 90. – P. 144 – 153.
  10. Mori T., Amano T., Shimizu H. Roles of junctional communication of cumulus cell in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*. // Biology of Reproduction. – 2000. – V. 62. – P. 913 – 919.
  11. Bing Y.Z., et al. *In vitro* maturation and glutathione synthesis of porcine oocytes in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. // Reprod. Fertil. Dev. – 2002. – V. 14. – P. 125 – 131.
  12. Лобченко В.А. Неизвестное звено процесса созревания ооцита млекопитающих / В.А. Лобченко // Пути интенсификации отрасли свиноводства в странах СНГ: сб. трудов XVI Междунар. науч.-практ. конф. – Гродно, 26 - 27 авг. 2009. – Гродно, 2009. – С. 78 – 79.
  13. Лобченко В.О. Застосування модифікованого методу приготування нативних препаратів для вивчення кумулюсної маси ооцит-кумулюсних комплексів із яєчників свині. Методологія наукових досліджень з питань селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. Матеріали наук.-теор. конф., присвяченої пам'яті акад. УААН В. П. Бурката, (Чубинське, 25 лютого 2010 року) / За ред. І.В. Гузева – К. : Аграрна наука. – 2010. – С. 79 – 80.
-