

МОРФОЛОГІЧНА ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ООЦИТІВ СВИНЕЙ ПРИ ОТРИМАННІ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНИХ ЕМБРІОНІВ ЗАЛЕЖНО ВІД УМОВ ДОЗРІВАННЯ *IN VITRO*

Л. І. Остаповець

Інститут розведення і генетики тварин НААН України

У статті наведені результати порівняльного аналізу морфологічних та цитогенетичних параметрів ооцитів свиней при їх активації до партеногенетичного розвитку залежно від умов дозрівання поза організмом. Отримані результати свідчать про те, що культивування ооцит-кумулюсних комплексів свиней у середовищі ТС 199 з додаванням 20 % еструсної сироватки крові корів позитивно впливає на мейотичне дозрівання, підвищуючи частку ооцитів, дозрілих *in vitro* до стадії метафази II мейоз, порівняно з культивуванням у середовищі NCSU-23+BCA. Також встановлено, що дозрівання ооцитів у середовищі ТС 199 з додаванням 20 % еструсної сироватки крові корів позитивно впливає на їх цитоплазматичне дозрівання, що проявляється у зростанні частоти дроблення партеногенетично активованих ооцитів та формування партеногенетичних ембріонів на 5–16-клітинній стадії розвитку *in vitro*.

Ключові слова: ООЦИТ, СВИНІ, МЕЙОЗ, *IN VITRO*, ДОЗРІВАННЯ, ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНА АКТИВАЦІЯ, ЕМБРІОН, КУЛЬТИВУВАННЯ

У наш час методи клітинних репродуктивних технологій, такі як трансплантація ембріонів, клонування, трансгенез удосконалюються завдяки науковим розробкам у сфері дослідження закономірностей та видових особливостей проходження оогенезу та раннього ембріогенезу. Питання про набуття яйцеклітиною, дозрілою до стадії метафази II *in vitro*, здатності до запліднення та подальшого розвитку ембріонів зберігає свою актуальність. Одним із негативних факторів при отриманні ембріонів свиней *in vitro* є високий рівень поліспермного запліднення яйцеклітин, що суттєво впливає на оцінку функціонального стану ооцитів [1, 2]. Тому, одним із підходів запобігання впливу поліспермії для вірогідного аналізу мейотичного та цитоплазматичного дозрівання ооцитів свиней *in vitro* є застосування партеногенетичної активації гамет [3].

Дозрівання ооцитів ссавців *in vivo* регулюється гормонами, ростовими факторами, циклічними нуклеотидами та іншими біологічно активними речовинами які, діючи на ооцит та фолікулярні клітини, утворюють єдину метаболічну систему [4]. Відомо, що в ооцитах під впливом фолікулярного оточення підтримується призупинка першого поділу мейозу. Ооцити, вилучені із фолікулів, здатні в культуральному середовищі дозрівати до стадії метафази II без додавання гормонів. Проте, розвиток ооцитів до метафази II не є достатнім критерієм зрілості яйцеклітини, так як дозрівання ооцитів — комплексний процес, який включає мейотичне та цитоплазматичне дозрівання [5–7]. Одним із способів досягнення синхронності ядерно-цитоплазматичного дозрівання ооцитів *in vitro* є моделювання умов росту та розвитку гамет, максимально наближених до умов *in vivo*, тобто, при яких забезпечується нормальне функціонування механізмів регуляції оогенезу. Моделювання умов дозрівання ооцитів здійснюється шляхом встановлення оптимального за складом культурального середовища, газового та температурного режимів, дослідження характеру впливу біологічно активних речовин, сироваток, фолікулярних клітин [6, 8, 9, 10]. У зв'язку з цим метою роботи було порівняння цитогенетичних та морфологічних характеристик ооцитів свиней при їх активації до партеногенетичного розвитку залежно від умов дозрівання *in vitro*.

Матеріали і методи

Для одержання ооцитів використовували яєчники забитих на бойні свиней великої білої породи. Вилучення ооцитів проводили шляхом розрізання стінок фолікулів скальпелем. Відібрані ооцит-кумулюсні комплекси культивували в середовищі ТС 199 на розчині Ерла (Sigma), яке доповнювали 20 % інактивованої нагріванням еструсної сироватки крові корів (ЕСКК) або NCSU-23, яке містило 4 мкг/мл сироваткового альбуміну великої рогатої худоби (БСА). Культивування ооцит-кумулюсних комплексів здійснювали в присутності клітин гранульози ($3-5 \times 10^6$ клітин/мл) при температурі $+38,8^\circ\text{C}$, 4 % CO_2 . З метою оцінки дозрівання ооцитів свиней і виявлення хромосомних порушень частину гамет у кожній експериментальній групі фіксували для проведення цитогенетичного аналізу. Решту дозрілих *in vitro* ооцитів активували 7 % розчином етилового спирту протягом 7 хвилин до партеногенетичного розвитку. Активовані гамети культивували в середовищі NCSU-23 [11].

Приготування сухоповітряних препаратів ооцитів та ембріонів проводили за модифікованим методом Тарковського [12]. Ооцити та ембріони свиней переносили у краплю 0,26 % гіпотонічного розчину цитрату натрію, відповідно на 10 та 2 хвилини, при подальшій фіксації сумішшю метанол-оцтової кислоти в співвідношенні 2:1. Цитогенетичний аналіз препаратів, забарвлених 2 % розчином Гімза, проводили під світловим мікроскопом Jenaval. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням критерію χ^2 [13].

Результати й обговорення

Як відомо, морфологічною ознакою завершення ооцитом ядерного дозрівання *in vitro* є виділення першого полярного тільця. Враховуючи цей критерій, досліджували дозрівання ооцитів свиней до стадії метафази II у середовищі ТС 199+ЕСКК ($n=52$) та NCSU-23+БСА ($n=50$). Після 44 годин дозрівання ооцити свиней розподіляли на дві групи: з наявним або відсутнім першим полярним тільцем.

За результатами морфологічного аналізу ооцитів встановлено, що кількість гамет з виділеним першим полярним тільцем при культивуванні в середовищі ТС 199+ЕСКК була статистично достовірно більшою, ніж у ооцитів, які культивували *in vitro* в середовищі NCSU-23+БСА, відповідно 65,4 % проти 44,0 % ($p < 0,05$) (рис. 1).

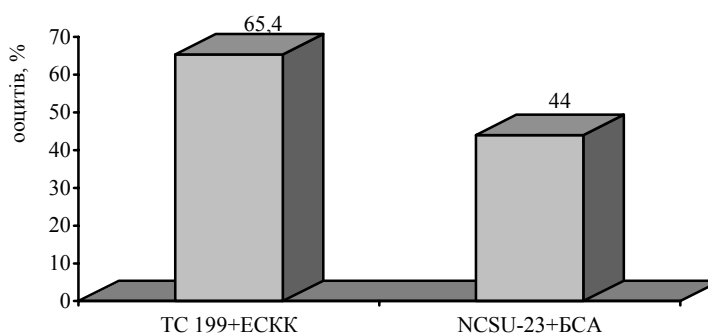


Рис. 1. Дозрівання ооцитів свиней у різних культуральних системах

За даними цитогенетичного аналізу таких ооцитів спостерігали тенденцію до збільшення кількості гамет без ознак дегенерації хромосом на стадії метафази II (рис. 2) після культивування в середовищі ТС 199+ЕСКК і становила 96,4 %, що на 8,9 % більше порівняно із ооцитами, які дозріли в середовищі NCSU-23+БСА. Аналіз одержаних результатів показує, що культивування ооцит-кумулюсних комплексів свиней у середовищі NCSU-23+БСА *in vitro* уповільнює мейотичне дозрівання та негативно впливає на повноцінність яйцеклітин, що призводить до зменшення кількості ооцитів з виділеним першим полярним тільцем.

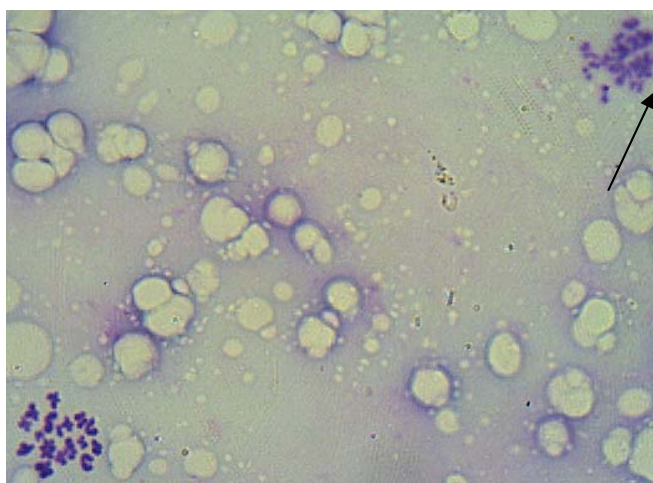


Рис. 2. Хромосоми ооциту свині на стадії метафази II мейозу (хроматин полярного тільця вказано стрілкою), зб. x900 разів

Це дозволяє зробити припущення, що одним із чинників, що сприяв збільшенню кількості ооцитів, які дозріли до стадії метафази II, є дозрівання ооцитів у середовищі з додаванням еструсної сироватки крові корів та клітин гранульози. Показано, що поліпептидні фактори росту, які входять до складу сироватки, можуть ініціювати в клітинах гранульози біосинтез гормонів, необхідних для дозрівання ооцитів у культурі *in vitro* [14].

Досягнення ооцитами метафази II мейозу, не завжди може бути критерієм біологічної повноцінності дозрівання, у зв'язку з цим, досліджували вплив умов культивування ооцит-кумулюсних комплексів свиней на їх партеногенетичну активацію та подальший розвиток *in vitro*. Після порівняння результатів двох експериментальних варіантів спостерігали вірогідно вищий показник загального дроблення партеногенетично активованих ооцитів свиней, за умови дозрівання гамет у середовищі TC 199+ЕСКК, порівняно із групою ооцитів, які дозрівали в середовищі NCSU-23+БСА, відповідно 48,1 % проти 25,5 % ($p < 0,05$) (табл.).

Таблиця

Розвиток партеногенетично активованих ооцитів свиней залежно від їх умов дозрівання *in vitro*

Групи дослідів	Середовище	Кількість ооцитів, n	Кількість ембріонів		
			всього, n (%)	2–4-клітинних, n (%)	5–16-клітинних, n (%)
1	TC 199 + 20% ЕСКК	52	25 ^a (48,1)	11 (44,0)	14 (56,0)
2	NCSU-23 + 4 мкг/мл БСА	51	13 ^b (25,5)	9 (69,2)	4 (30,8)

Примітка: a:b — $p < 0,05$

При порівнянні за кількістю партеногенетичних ембріонів, що зупинили розвиток на 2–4-клітинній стадії, спостерігали тенденцію збільшення цього показника у групі, за умови культивування ооцит-кумулюсних комплексів у середовищі NCSU-23+БСА. Проте, рівень подальшого дроблення партеногенетичних ембріонів, був вищим у 1 групі і перебував на рівні 56,0 %, що на 15,2 % більше, порівняно із іншою дослідною групою (рис. 3).



Рис. 3. Партеногенетичні ембріони свиней, зб. х80 разів

Висновки

Культивування ооцит-кумулюсних комплексів свиней у середовищі ТС 199+ЕСКК призводить до вірогідного збільшення виходу ооцитів з першим полярним тільцем (мейотичне дозрівання), порівняно із середовищем NCSU-23+БСА. Також, забезпечує більш повноцінне цитоплазматичне дозрівання, що підтверджується високим рівнем дроблення партеногенетично активованих ооцитів та формування партеногенетичних ембріонів на 5–16-клітинній стадії розвитку *in vitro*.

Перспективи подальших досліджень. Застосування партеногенетичної активації яйцеклітин *in vitro*, якості біологічної моделі, дозволить одержати нові теоретичні дані щодо закономірностей та видових особливостей проходження оогенезу та раннього ембріогенезу свиней. У подальшому планується проводити дослідження щодо вивчення впливу умов дозрівання ооцитів свиней *in vitro* на їх компетенцію до ембріонального розвитку після партеногенетичної активації.

L. I. Ostapovets'

MORPHOLOGICAL AND CYTOGENETICAL CHARACTERISTICS OF PORCINE OOCYTES AT PARTHENOGENETIC EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO* DEPENDING ON THE CONDITIONS MATURATION

Summary

The results of comparative analysis of morphological and cytogenetical parameters of porcine oocytes during their activating to the parthenogenetic development depending on the conditions maturation are presented in the article. It was determined, that the cultivation of porcine oocyte-cumulus complexes in medium TS 199 with supplements of 20 % estrous blood serum of cows positively influences on the meiotic maturation, increased the rate of oocyte, matured *in vitro* to metaphase II stage meiosis, comparative with the culturing in medium NCSU-23+БСА. It was also shown that maturation of oocyte in medium TS 199 with supplements of 20 % estrous blood serum of cows positively influences on the cytoplasmic maturation, increased the cell-division frequency of parthenogenetic activated porcine oocytes and parthenogenetic embryos produced cytoplasmic *in vitro* on the 5–16-cellular stage of development.

Л. И. Остаповец

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ООЦИТОВ СВИНЕЙ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ СОЗРЕВАНИЯ *IN VITRO*

А н н о т а ц и я

В статье представлены результаты сравнительного анализа морфологических и цитогенетических параметров ооцитов свиней при их активации к партеногенетическому развитию в зависимости от условий созревания вне организма. Полученные результаты свидетельствуют о том, что культивирование ооцит-кумулюсных комплексов свиней в среде ТС 199 с добавлением 20 % эструсной сыворотки крови коров положительно влияет на мейотическое созревание, увеличивая количество ооцитов, дозревших до стадии метафазы II мейоза, по сравнению с культивированием в среде NCSU-23+БСА. Также показано, что созревание ооцитов в среде ТС 199 с добавлением 20 % эструсной сыворотки крови коров положительно влияет на их цитоплазматическое созревание, что проявляется на увеличении частоты дробления партеногенетически активированных ооцитов и формирования партеногенетических эмбрионов на 5–16-клеточной стадии развития *in vitro*.

1. Kikuchi K. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system / K. Kikuchi, A. Onishi et al. // *Biology of reproduction*. — 2002. — Vol. 66, № 4. — P. 1033–1041.

2. Funahashi H. Advances *in vitro* production of pig embryos / H. Funahashi, B. N. Day // *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. — 1997. — Vol. 52. — P. 271–283.

3. Nanassy L. Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos / L. Nanassy, K. Lee, A. Javor et al. // *Animal reproduction science*. — 2008. — Vol. 104, № 2–4. — P. 264–274.

4. Лебедева И. Ю. Участие клеток гранулозы в опосредовании действия пролактина и соматропина на ооцит-кумулюсные комплексы коров *in vitro* / И. Ю. Лебедева, Т. В. Кибардина, Т. И. Кузьмина // *Цитология*. — 2005. — Т. 47, № 10. — С. 882–888.

5. Eppig J. J. Coordination nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals / J. J. Eppig // *Reproduction, fertility and development*. — 1996. — Vol. 8, № 4. — P. 485–489.

6. Hunter M. G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs / M. G. Hunter // *Reviews of Reproduction*. — 2000. — Vol. 5, № 2. — P. 122–130.

7. Niemann H. Progress in reproductive biotechnology in swine / H. Niemann, D. Rath // *Theriogenology*. — 2001. — Vol. 56, № 8. — P. 1291–1304.

8. Abeydeera L. R. *In vitro* production of embryos in swine / L. R. Abeydeera // *Theriogenology*. — 2002. — Vol. 57, № 1. — P. 257–273.

9. Procházka R. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling / R. Procházka, V. Sršeň, E. Nagyová et al. // *Molecular reproduction and development*. — 2000. — Vol. 56, № 1. — P. 63–73.

10. Rath D. *In vitro* maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield *in vitro* / D. Rath, H. Niemann, T. Tao // *Theriogenology*. — 1995. — Vol. 44, № 4. — P. 529–538.

11. Gajda B. *In vitro* culture of pig embryos / B. Gajda // *Roczniki naukowe zootechniki*. — 1998. — Vol. 25, № 1. — P. 31–38.

12. Tarkowski A. K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // *Cytogenetics*. — 1966. — Vol. 5, № 3. — P. 394–400.

13. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М. : Высшая школа, 1990. — 351 с.

14. Schomberg D. W. Interactions between hormones and growth factors in the regulation of granulosa cell differentiations *in vitro* / D. W. Schomberg, J. V. May, J. S. Mondschein // *J. Steroid. Biochem.* — 1983. — Vol. 19, № 1. — P. 291–295.

Рецензент: провідний науковий співробітник НВЦ з вивчення пріонних інфекцій, доктор с.-г. наук Остапів Д. Д.