

УДК: 636.4.082.4:57.086.83

**Вплив умов культивування ооцит-кумулясних комплексів свиней *in vitro* на розвиток партеногенетичних ембріонів**  
**Л.І.Остаповець**

*Інститут розведення і генетики тварин (с. Чубинське, Київська обл.)  
ost\_lara@univ.kiev.ua*

У статті наведено результати досліджень з вивчення впливу умов дозрівання ооцитів свиней *in vitro* на розвиток партеногенонів. Встановлено, що співкультивування ооцитів свиней із клітинами гранульози в концентрації  $3-5 \times 10^6$  клітин на 1 мл середовища позитивно впливає на цитоплазматичне дозрівання гамет, що проявляється у розвитку партеногенетичних ембріонів до пізніх доімплантаційних стадій.

*Ключові слова: біологія розвитку, ооцити свині, мейоз, клітини гранульози, дозрівання in vitro, партеногенетичне активування, ембріон.*

**Вступ**

За останнє десятиліття досягнуто значного прогресу в розробці ефективного методу отримання *in vitro* ембріонів тварин (IVP). Такий біотехнологічний метод знайшов застосування при вдосконаленні одержання клонованих та трансгенних тварин. Порівняно із іншими видами сільськогосподарських тварин застосування IVP у свиней пов'язано з декількома значними проблемами: неповноцінним цитоплазматичним дозріванням, високим рівнем поліспермного запліднення (40–90 %), редукцією кількості клітин у бластоцисті та її низькою життєздатністю (Wei et al., 2001; Han et al., 1999). Дозрівання *in vitro* ооцитів свиней до стадії метафази II є ключовим етапом при отриманні реципієнтів-оопластів. Запліднення таких яйцеклітин дає можливість одержати велику кількість ембріонів для експериментів з клонування та трансгенезу (Betthausen et al., 2000; Lai et al., 2002; Walker et al., 2002).

Дозрівання *in vitro* ооцитів свавців прийнято розглядати в двох аспектах – ядерному та цитоплазматичному. Загалом, ооцити є дозрілими, коли відбулось виділення першого полярного тільця (ядерне дозрівання) та блокування мейозу на стадії метафази II. Хоча такі ооцити здатні запліднитись, вони можуть бути некомпетентними до подальшого ембріонального розвитку внаслідок дефіциту деяких цитоплазматичних факторів, що необхідні для повноцінного цитоплазматичного дозрівання (Hunter, 2000; Motlik, 1989). Встановлено, що стадії метафази II ооцити свиней досягають вже після 24 годин культивування *in vitro*, але компетентність до подальшого розвитку вони набувають після 40 годин дозрівання (Gruppen et al., 1997). Набуття такими яйцеклітинами здатності до подальшого ембріонального розвитку потребує синхронізації ядерного та цитоплазматичного дозрівання ооцитів свиней *in vitro*. Культивують ооцит-кумулясні комплекси свиней від 36 до 48 годин (Motlik et al., 1984; Yoshida et al., 1993; Wang et al., 1997) при температурі 38,5–39°C у різних типах середовищ (простих або комплексних) з додаванням гормонів (Hong et al., 2004; Illera et al., 1998; Liu et al., 1997; Mattioli et al., 1991; Yamauchi et al., 1999), факторів росту (Abeydeera et al., 2000; Gruppen et al., 1997), антиоксидантів (Tatemoto et al., 2001), фолікулярної рідини (Algriany et al., 2004; Yoon et al., 2000), соматичних клітин фолікула (Abeydeera et al., 1998; Sun et al., 2001), епітеліальних клітин яйцепроводу свині (Bugeau et al., 2000). Незважаючи на різноманітність розроблених підходів культивування *in vitro* ооцит-кумулясних комплексів, результативність залишається низькою, що в деякій мірі може бути пояснено гетерогенністю відібраних гамет (Lucas et al., 2002; Nagai, 1996; Roca et al., 1998).

Встановлено, що дозрілі *in vivo* ооцити (відібрані на час овуляції) мають суттєво вищий потенціал до біологічно повноцінного ембріонального розвитку, ніж ооцити, які дозрівали *in vitro*. Завершення ядерного дозрівання легко визначити, цитоплазматичне дозрівання може бути оцінене за здатністю формувати пронуклеуси після запліднення та нормальним перебігом доімплантаційного ембріонального розвитку. Слід відмітити, що час утворення пронуклеусів значно відрізняється між *in vivo* та *in vitro* дозрілими ооцитами свиней (Mattioli et al., 1989).

Важливою проблемою є високий рівень поліспермного запліднення *in vitro* дозрілих яйцеклітин, що значно впливає на результати з визначення якості ооцитів, їх компетентності до подальшого ембріонального розвитку. Тому одним із підходів запобігання впливу поліспермії для вірогідного аналізу повноцінності дозрівання яйцеклітин свиней *in vitro* є застосування методу партеногенетичного активування таких гамет.

Враховуючи важливість проведення досліджень із удосконалення системи дозрівання *in vitro* ооцитів свиней, метою даної роботи було вивчення впливу співкультивування ооцитів свиней із

клітинами гранульози під час дозрівання *in vitro* на їх компетентність до подальшого розвитку після партеногенетичного активування.

### Методика

Відбір яєчників проводили на бойні від забитих свиней великої білої породи. Вилучення ооцит-кумулясних комплексів виконували розрізанням стінок фолікулів яєчників скальпелем. Відібрані ооцити розподіляли на дві групи. Першу групу клітин (1) переносили для дозрівання в середовище ТСМ 199 (Sigma) з додаванням 20% еструсної сироватки крові корів та клітин гранульози в концентрації  $3-5 \times 10^6$  клітин на 1 мл середовища, другу групу (2) – в середовище без клітин гранульози. Культивували ооцит-кумулясні комплекси протягом 44–46 годин при температурі  $+38,8^\circ\text{C}$  та 4%  $\text{CO}_2$  в повітрі (Остаповець, 2003). Активування до партеногенетичного розвитку здійснювали 7%-ним розчином етилового спирту протягом 7 хвилин. Активовані гамети культивували в середовищі NCSU-23 (Gajda, 1998). За допомогою модифікованого нами методу Тарковського (Tarkowski, 1966) готували сухоповітряні препарати активованих ооцитів та ембріонів. Цитогенетичний аналіз клітин, забарвлених 2%-ним розчином барвника Гімза, проводили під мікроскопом МБД-15. Статистичну обробку даних експериментальних досліджень проводили з використанням критеріїв Стюдента (Лакін, 1990).

### Результати та обговорення

На підставі отриманих даних морфологічного та цитогенетичного аналізу активованих до партеногенетичного розвитку гамет свиней (перебували на стадії телофази II мейозу, містили один (рис. 1 (а)) або два пронуклеуси (рис. 1 (б)) або досягли стадій дроблення (рис. 2)) встановлено, що дозрівання ооцитів свиней *in vitro* без клітин гранульози не мало негативного впливу на рівень активування гамет. Тобто кількість яйцеклітин на більш просунутих стадіях мейозу від метафази II та партеногенетичних ембріонів в 1 та 2 групах знаходилась на рівні 85,4% (111/130) та 83,5% (101/121), відповідно.

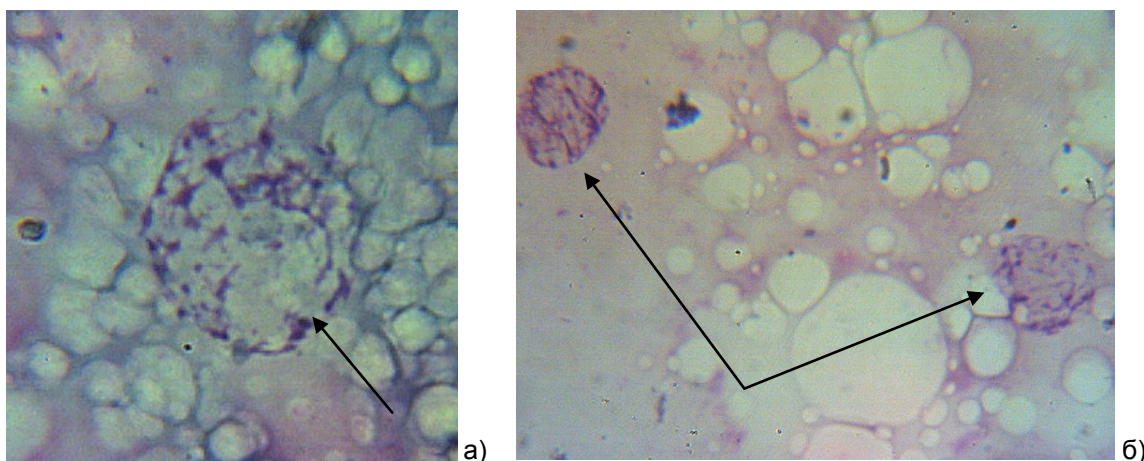
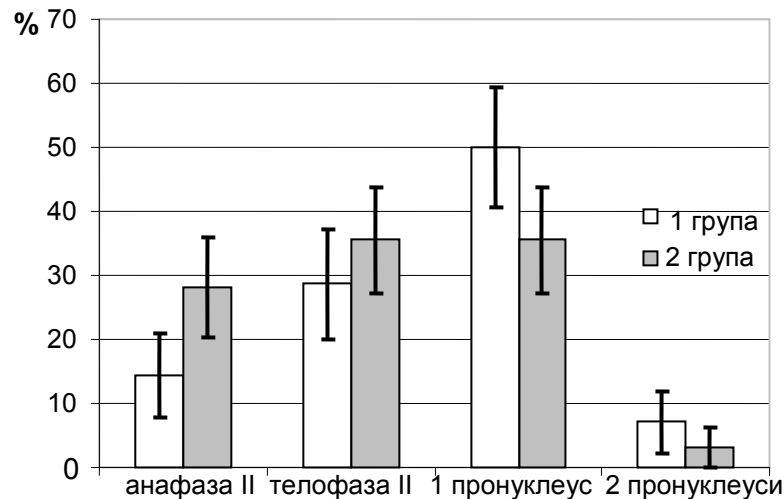


Рис. 1. Сухоповітряний препарат ооциту свині на стадії 1 пронуклеусу (а) та 2 пронуклеусів (б). Пофарбовано барвником Гімза, об. 90× ім. м., ок. 10× та об. 40×, ок. 10×



Рис. 2. 8-клітинний партеногенетичний ембріон свині, отриманий *in vitro*, об.10, ок.10

Проте, у 1 групі серед нероздроблених гамет переважна більшість перебувала на стадії формування пронуклеусів – 57,1% клітин, порівняно з 2 групою, де вона складала 37,5% (рис. 3). Слід відмітити, що для нероздроблених гамет 1 групи характерно перебування більшої кількості активованих яйцеклітин на стадії одного пронуклеусу порівняно із 2 групою (50,0% (14/28) та 34,4% (11/32) відповідно). Але не було виявлено вірогідної різниці за частотою перебування клітин на стадії формування пронуклеусів у досліджуваних групах. Незалежно від умов дозрівання серед нероздроблених гамет на стадії формування пронуклеусів більшість мала один пронуклеус, що суттєво відрізнялось від кількості гамет із 2 пронуклеусами (50,0% та 7,1% ( $p < 0,01$ ); 34,4% та 3,1% ( $p < 0,01$ ), відповідно).



**Рис. 3.** Динаміка клітинних перетворень нероздроблених активованих гамет свиней в залежності від умов дозрівання

Після порівняння результатів досліджень 2-х експериментальних варіантів спостерігали тенденцію збільшення загального показника дроблення партеногенетично активованих ооцитів свиней, які дозрівали *in vitro* в культуральному середовищі з клітинами гранульози, порівняно із групою ооцитів, які дозрівали *in vitro* без клітин гранульози (табл.).

#### Таблиця.

**Вплив умов дозрівання на динаміку доімплантаційного розвитку партеногенетичних ембріонів свиней**

Групи досліджу	Всього активованих ооцитів	Загальний рівень дроблення		Кількість ембріонів, які досягли стадії					
		n	%	2–4-клітинної		5–12-клітинної		16–32-клітинної	
				n	%	n	%	n	%
1	111	83	74,8	32	38,6	41	49,4	10	12,0
2	101	69	68,3	31	44,9	35	50,7	3	4,4

Крім показника дроблення яйцеклітин після їх партеногенетичного активування *in vitro*, не менше значення має й показник рівня подальшого розвитку (дроблення) ембріонів, який визначають шляхом культивування активованих яйцеклітин та 2-клітинних ембріонів. При порівнянні у 1 та 2 групах кількості партеногенетичних ембріонів, що зупинили розвиток на 2–4-клітинній стадії, спостерігалась тенденція до збільшення цього показника у 2 групі. Проте, рівень подальшого дроблення партеногенетичних ембріонів (кількість ембріонів, що мають більше чотирьох бластомерів, від загальної кількості ембріонів), був вищим у 1 групі і перебував на рівні 61,4%, порівняно із іншим дослідним варіантом, де ооцит-кумулясні комплекси культивували *in vitro* без клітин гранульози, – 55,1% (табл.).

**Висновок**

Встановлено позитивний вплив співкультивування ооцитів свиней із клітинами гранульози під час дозрівання поза організмом на розвиток партеногенетичних ембріонів *in vitro* до стадії ранньої морули.

**Список літератури**

- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с.
- Остаповець Л.І. Хромосомні перетворення ооцитів свиней під час дозрівання *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць / За ред. М.В.Роїка. – К: Аграрна наука, 2003. – С. 433–438.
- Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C. et al. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione // *Biology of reproduction*. – 1998. – Vol.58, №1. – P. 213–218.
- Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C. et al. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor // *Theriogenology*. – 2000. – Vol.54, №5. – P. 787–797.
- Algriany O., Bevers M., Schoevers E. et al. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro* cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes // *Theriogenology*. – 2004. – Vol.62, №8. – P. 1483–1497.
- Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M. et al. Production of cloned pigs from in vitro systems // *Nature biotechnology*. – 2000. – Vol.18, №10. – P. 1055–1059.
- Bureau M., Bailey J.L., Sirard M.A. Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes // *Zygote*. – 2000. – Vol.8, №2. – P. 139–144.
- Han Y.M., Abeydeera L. R., Kim J.H. et al. Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced in vitro // *Biology of reproduction*. – 1999. – Vol.60, №5. – P. 1110–1113.
- Hong J.Y., Yong H.Y., Lee B.C. et al. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media // *Theriogenology*. – 2004. – Vol.62, №8. – P. 1473–1482.
- Hunter M.G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs // *Reviews of reproduction*. – 2000. – Vol.5, №2. – P. 122–130.
- Gajda B. In vitro culture of pig embryos // *Roczniki naukowe zootechniki*. – 1998. – Vol.25, №1. – P. 31–38.
- Grupen C.G., Nagashima H., Nottle M.B. Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development *in vitro* // *Reproduction, fertility and development*. – 1997. – Vol.9, №6. – P. 571–575.
- Illera M.J., Lorenzo P.L., Illera J.C., Petters R.M. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM–IVF processes // *International journal of developmental biology*. – 1998. – Vol.42, №8. – P. 1169–1172.
- Lai L., Park K.W., Cheong H.T. et al. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells // *Molecular reproduction and development*. – 2002. – Vol.62, №3. – P. 300–306.
- Liu L., Dai Y., Moor R.M. Role of secreted proteins and gonadotrophins in promoting full maturation of porcine oocytes in vitro // *Molecular reproduction and development*. – 1997. – Vol.47, №2. – P. 191–199.
- Lucas X., Martínez E.A., Roca J. et al. Relationship between antral follicle size oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs // *Theriogenology*. – 2002. – Vol.58, №5. – P. 871–886.
- Mattioli M., Bacci M.L., Galeati G., Seren E. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro // *Theriogenology*. – 1989. – Vol.31, №6. – P. 1201–1207.
- Mattioli M., Bacci M.L., Galeati G., Seren E. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro // *Theriogenology*. – 1991. – Vol.36, №1. – P. 95–105.
- Motlik J., Crozet N., Fulka J. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles // *Journal of reproduction and fertility*. – 1984. – Vol.72, №2. – P. 323–328.
- Motlik J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals // *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. – 1989. – Vol.38. – P. 17–25.
- Nagai T. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes // *Animal reproduction science*. – 1996. – Vol.42, №1. – P. 153–163.
- Roca J., Martínez E., Vazquez J.M., Lucas X. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test // *Reproduction, fertility and development*. – 1998. – Vol.10, №6. – P. 479–485.
- Sun Q.Y., Lai L., Bonk A. et al. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: Effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition // *Molecular reproduction and development*. – 2001. – Vol.59, №2. – P. 192–198.

- Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // *Cytogenetics*. – 1966. – Vol.5, №3. – P. 394–400.
- Tatemoto H., Ootaki K., Shigeta K., Muto N. Enhancement of developmental competence after *in vitro* fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside during *in vitro* maturation // *Biology of reproduction*. – 2001. – Vol.65, №6. – P. 1800–1806.
- Walker S.C., Shin T.Y., Zaunbrecher G.M. et al. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using *in vitro*-matured oocytes // *Cloning and stem cells*. – 2002. – Vol.4. – P. 105–120.
- Wang W.H., Hosoe M., Shioya Y. Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation // *Journal of reproduction and fertility*. – 1997. – Vol.109, №2. – P. 247–255.
- Wei Z., Park K.W., Day B.N., Prather R.S. Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos // *Molecular reproduction development*. – 2001. – Vol.60, №4. – P. 457–462.
- Yamauchi N., Sasada H., Soloy E. et al. Effects of hormones and osmolarity in the culture medium on germinal vesicle breakdown of porcine oocytes // *Theriogenology*. – 1999. – Vol.52, №1. – P. 153–162.
- Yoon K.W., Shin T.Y., Park J.I. et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids // *Reproduction, fertility and development*. – 2000. – Vol.12, № 3–4. – P. 133–139.
- Yoshida M., Mizoguchi Y., Ishigaki K. et al. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro* // *Theriogenology*. – 1993. – Vol.39, №6. – P. 1303–1311.

**Влияние условий культивирования ооцит-кумулюсных комплексов свиней *in vitro* на развитие парthenогенетических эмбрионов**  
Л.И.Остаповец

В статье изложены результаты исследований по влиянию условий созревания *in vitro* ооцитов свиней на развитие парthenогенонов. Показано, что сокультивирование ооцит-кумулюсных комплексов свиней с клетками гранулёзы *in vitro* в концентрации  $3-5 \times 10^6$  кл/мл среды положительно влияет на цитоплазматическое созревание гамет, что проявляется развитием парthenогенетических эмбрионов до стадии ранней морулы.

Ключевые слова: *биология развития, ооцит свиньи, мейоз, клетки гранулёзы, созревание in vitro, парthenогенетическая активация, эмбрион.*

**Effect of the cultivation conditions of porcine oocytes cumulus complexes *in vitro* on the development of parthenogenetic embryos**  
L.I.Ostapovets

This article highlights the results of study of porcine oocytes *in vitro* maturation conditions effect on their parthenogenone development. It is shown that co-cultivation of porcine oocyte-cumulus complexes with the granulosa cells at concentration of  $3-5 \times 10^6$  cell/ml of culture medium positively influences the cytoplasmic maturation of oocytes, that is represented in the development of parthenogenetic embryos to the morula stage.

Key words: *developmental biology, porcine oocyte, meiosis, granulosa cells, maturation in vitro, parthenogenetic activation, embryo.*

---

Представлено В.С.Коноваловим  
Рекомендовано до друку А.В.Некрасовою