

УДК: 57.08.636: 616.83:612.014:616-018.82:612.017.1

**Вплив двох типів клітинних культур репродуктивних органів самок на дозрівання *in vitro* ооцитів щурів**  
**С.В.Федорова<sup>1</sup>, А.В.Мадіч<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут біології тварин УААН (Львів, Україна)

<sup>2</sup>Університет м. Дарем (Дарем, Великобританія)

Представлено результати досліджень по впливу співкультивування ооцитів щурів з клітинними культурами яйцепроводів та гранульози на їх дозрівання в умовах *in vitro*. З отриманих експериментальних даних випливає, що ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) щурів при культивуванні на двох різних типах культур клітин репродуктивних органів самок володіють різним ступенем дозрівання. Дозрівання ОКК на культурі епітеліальних клітин яйцепроводів є ефективнішим, ніж на культурі клітин гранульози. Очевидно, це пов'язано з тим, що секреція клітин гранульози інгібує дозрівання ОКК через апоптичні процеси, які відбуваються в клітинах цього типу при атрезії фолікулів за умов фізіологічного статевого циклу.

Ключові слова: *клітини епітелію яйцепроводів, культура клітин гранульози, ооцит-кумулясні комплекси, культивування in vitro.*

### **Вступ**

Застосування технології виробництва первинних клітинних культур, що походять з клітин тканин або репродуктивних органів тварин, дозволило створити умови, найбільш наближені до умов *in vivo*, для підвищення ефективності методів ембріобіотехнології.

Метод інтрафолікулярного дозрівання ооцитів *in vitro* був розроблений ще у 70-ті роки минулого століття (Смирнова, Галиєва, 1998). Основною причиною розробки такого метода були ті обставини, що при вилученні ооцитів із фолікула порушується зв'язок між ооцитом та клітинами фолікула. Це призводить до змін структури ооплазми та її функцій – для дозрівання ооцита необхідна участь багатьох компонентів фолікула (Никитин, 1998). Саме тому потім почали використовувати спільне культивування ізольованих ооцитів з клітинами фолікулів. Але виділення культури гранульозних клітин і довготривале їх збереження є методично складним і високовартісним процесом. Альтернативою в даній ситуації може бути використання фідерних клітин, культуру яких отримують з епітелію яйцепроводів самок тварин. Метод отримання таких культур клітин є зручним у використанні (первинну культуру можна отримувати із забійного матеріалу, готові культури довго зберігаються шляхом криоконсервування, зберігаючи при відтаванні високу проліферативну здатність) і швидким, не потребуючи при цьому великих матеріальних витрат.

Клітинні культури маткового походження, так звані фідерні клітини, здійснюють підтримуючий ефект на розвиток *in vitro* ооцитів та ембріонів тварин ранніх стадій. Епітеліальні клітини яйцепроводів володіють доброю адгезійною здатністю і проліферативною активністю. В культурі вони розташовуються безперервним тонким шаром і створюють на своїй поверхні «мікроклімат», який забезпечує оптимальні умови для культивування ооцитів та ембріонів. За умов *in vivo*, під час підготовки репродуктивних органів самки до прийняття зиготи, в дію вступають складні регуляторні системи, що пов'язані з білковими ростовими факторами (Monniaux et al., 1997). Це низькомолекулярні сполуки, які специфічно впливають на проліферацію клітин. В результаті взаємодії ростових факторів з клітинними рецепторами активується комплекс клітинних реакцій. Джерелом синтезу та секреції більшості ростових факторів і цитокінів є епітеліальні клітини і окремо – клітини епітелію яйцепроводів (Laskey et al., 2000). Таким чином, дослідження ефективності співкультивування *in vitro* ооцитів та культур фідерних та/або гранульозних клітин було доцільним і актуальним.

Мета наших досліджень – дослідити і порівняти вплив культур клітин яйцепроводів та гранульози на дозрівання ооцитів самок щурів *in vitro*.

### **Матеріал і методика**

В експерименті використовувались самки білих лабораторних щурів лінії Вістар віком 6–7 місяців. Тварини утримувались на стандартному раціоні. Для одержання культури фідерних клітин використовували яйцепроводи самок щурів. Тканину яйцепроводів механічно подрібнювали і дезагрували з використанням 0,5%-го трипсину у співвідношенні 1:3. Клітинну суспензію центрифугували при 1000 об/хв. протягом 10 хвилин у середовищі ДМЕМ. Цикли трипсинізації повторювали 3 рази до повної дезагрегації тканин. На кінцевому етапі осад ресуспендували, розводили середовищем ДМЕМ до загального об'єму 1 мл.

Передовуляторні фолікули розрізали ножицями і за допомогою маленького леза скальпеля зішкрібували з внутрішньої стінки фолікула шар гранульозного епітелію, який вносили у пробірку з середовищем ДМЕМ, що містило 20% естральної сироватки і гепарин (20 од./мл). Скляною піпеткою конгломерати клітин ресуспендували 10–15 разів для дисоціації під впливом гепарину, центрифугували при 1000 об/хв. протягом 15 хвилин. Відбирали супернатант (з гепарином), осад ресуспендували з метою повної дисоціації клітин.

Концентрацію клітин обох видів визначали підрахунком у камері Горяєва і вносили у культуральні чашки в кількості  $1 \times 10^6$  клітин на 1 мл середовища. Культури ставили на дорощування на 24 години для отримання моношару при  $t=38,5^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  (Мадіч, 2002).

Від 10 самиць щурів було одержано 140 ооцит-кумуляюсних комплексів (в середньому 12–15 ооцитів на 1 самку), з них після морфологічної оцінки було відібрано 120 морфологічно якісних ооцитів, які використовувались в експерименті. В кожній групі було по 40 ооцит-кумуляюсних комплексів.

В першій дослідній групі ОКК культивувались на моношарі епітеліальних клітин в основному середовищі (ДМЕМ+20% сироватки). ОКК другої дослідної групи культивували на моношарі гранульозних клітин в основному середовищі. Контрольна група складалась з ОКК, які культивувались на звичайному середовищі, без будь-якої підтримуючої культури клітин. Через 24 години культивування ооцити оцінювались за морфологічними ознаками (за наявністю полярного тільця – основною ознакою дозрівання та за щільністю і якістю кумулюсного шару) і розподілялись на три групи – якісні (з одним полярним тільцем і щільним кумулюсним шаром), добрі (без полярного тільця, але з добре вираженим, в деяких місцях розірваним кумулюсним шаром) і погані (ооцити були голі або дегенеровані). Вважали, що ОКК перших двох груп презумптивно дозрілі або можуть дозріти. Статистичну обробку даних проводили методом «Помилки при двох альтернативних ознаках» (Меркурєва, 1964).

### Результати і обговорення

Після 24 годин культивування культура клітин гранульози не створила суцільного моношару, що вказує на її більш низький рівень проліферативної здатності, ніж у клітин епітелію яйцепроводів (рис. 1, 2).

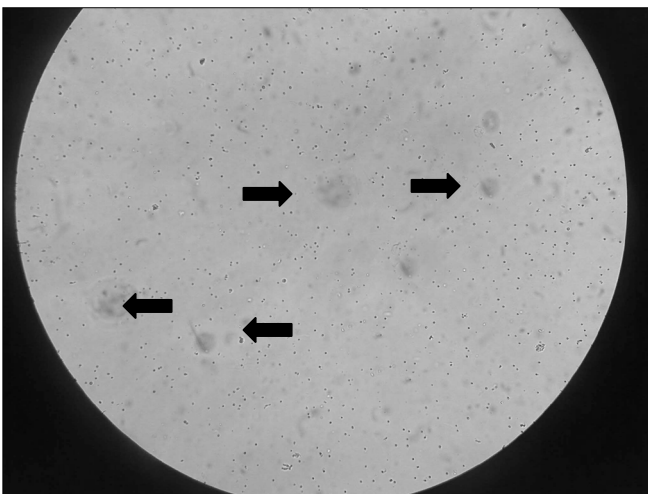


Рис. 1. ОКК щурів в товщі культури клітин гранульози (стрілками вказано ОКК)

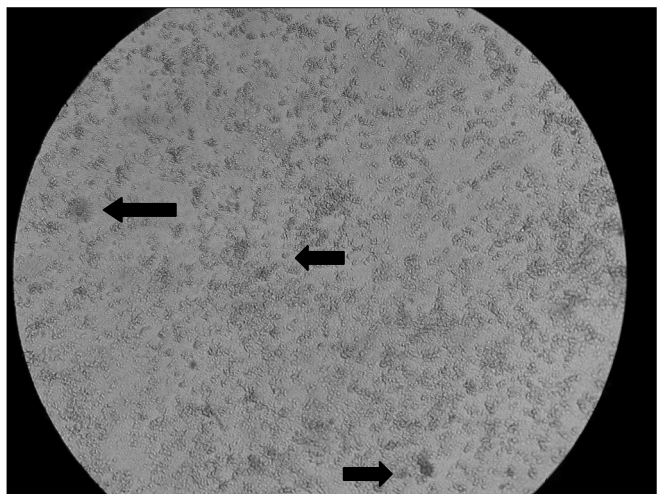


Рис. 2. ОКК щурів в товщі клітин епітелію яйцепроводів щурів (стрілками вказано ОКК)

З літературних джерел відомо, що ооцити тварин у культурі зберігають ту саму потребу в поживних речовинах, як і в донорському організмі. Створення умов дозрівання *in vitro*, адекватних умовам організму, є важливим і водночас важким завданням. Одним з найголовніших компонентів оточуючого середовища ооцитів є ростові фактори, які відіграють важливу регуляційну роль у ранніх процесах становлення вагітності у ссавців взагалі (Sirisathien et al., 2003) До ростових факторів відносять низькомолекулярні протеїни, які мають здатність стимулювати проліферацію клітин, знаходячись поза клітиною і взаємодіючи з її поверхнею. Саме ці сполуки у великій кількості синтезують клітини репродуктивних органів самок на ранніх стадіях вагітності (Derrag et al., 2000). З цього випливає, що використання маточних клітинних культур клітин при культивуванні *in vitro* ооцитів

буде набагато ефективнішим, ніж на синтетичному середовищі з екзогенним додаванням цих факторів.

З одержаних в наших дослідженнях даних очевидно, що використання культури фідерних клітин є набагато ефективнішим, ніж використання культури клітин яйцепроводу. Процент дозрівання ооцитів до стадії першого полярного тільця в таких випадках є набагато вищим, причому отримані цифрові дані є достовірними (табл. 1). Чому ж при використанні епітеліальних культур яйцепроводів щурячі ОКК дозрівають ліпше, ніж на культурі клітин гранульози? Але ж з літератури відомо, що перші спроби культивування ооцитів ссавців були здійснені якраз на гранульозних культурах або взагалі всередині фолікулів (Thibodeaux et al., 1995). Відповідь на дане питання полягає у процесах апоптозу, які відбуваються за фізіологічних умов у фолікулах при нормальному статевому циклі – після відбору домінуючого фолікула всі інші підлягають атрезії, яка і відбувається саме шляхом апоптозу (Лушников и др., 2001; Campe del et al., 1995). Клітини епітелію яйцепроводів ж, навпаки, протягом всього періоду після запліднення і імплантації, зберігають високий проліферативний рівень, не піддаючись апоптозу.

**Таблиця 1.**  
**Порівняльний вплив культур фідерних клітин і гранульози на дозрівання in vitro та якість ОКК лабораторних щурів**

Групи та їх характеристика (кількість культуральних чашок у кожній групі = 5)	Початкова кількість ОКК	Кількість ОКК після дозрівання 24 години		
		Якісні	Добрі	Погані
Дослідна 1 Епітеліальні клітини	40	75±7,9 %*	15±13,69 %*	10±15 %*
Дослідна 2 Клітини гранульози	40	60±10 %*	10±15 %*	30±13,22 %*
Контрольна Основне середовище без клітин	40	32,5±18,72 %*	17,5±14,36 %*	50±11,18 %*

Примітка: \* –  $p < 0,05$ .

Але різниця у цифрових даних щодо ефективності використання цих двох культур не є суттєвою – це можна, очевидно, пояснити тим, що тварин попередньо гормонально обробляли для викликання суперовуляції. До переліку таких гормональних препаратів входять насамперед препарати гонадотропних гормонів – ФСГ, які, як відомо, є антиапоптичними факторами (Merrymann et al., 1998), які викликають гормональні зміни мікросередовища фолікула. У програмах IVF (in vitro fertilization) та IVM (in vitro maturation) використання цих закономірностей дозволяє зберегти життєздатність фолікулів навіть з атрезією, яка вже почалась (Hurk van den et al., 1994). На кінцевих етапах атрезії фолікула в гранульозних клітинах, які загинули шляхом апоптозу, розвиваються явища вторинного некрозу, які звичайно не можуть чинити позитивний вплив на дозрівання ооцитів in vitro.

На основі експериментально отриманих нами даних та спираючись на літературні дані, ми можемо зробити висновок, що дозрівання ооцитів in vitro на культурах клітин маткового походження є доцільним. При цьому використання культури клітин епітелію яйцепроводів є більш ефективним, ніж клітин гранульози, через відсутність апоптичних процесів при явищі атрезії фолікулів у другому випадку.

#### Список літератури

- Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). – М.: Медицина, 2001. – 95с.  
 Мадіч А.В. Ранній ембріональний розвиток тварин in vivo і in vitro та біотехнологічні фактори його регуляції. Автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук. – Біла Церква, 2004. – 36с.  
 Меркурьєва Е.К. Биометрия в животноводстве. – М.: Колос, 1964. – 311с.  
 Никитин А.И. Фолликуло- и оогенез при стимуляции овуляции // Акушерство и гинекология. – 1998. – Т.1. – С. 41–45.  
 Смирнова Т.А., Галиева Л.Д. Созревание ооцитов внутри фолликулов с разной степенью развития микроциркуляторного русла // Проблемы репродукции. – 1998. – №1. – С. 5–9.

- Campe del M.R., Campo del C.H., Mapletoft R.J., Ginter O.J. Morphology and location of attached follicular cumulus-oocyte complexes in horses, cattle and llamas // *Theriogenology*. – 1995. – Vol.43. – P. 533–542.
- Derrar N., Price S., Sirard N. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex // *Theriogenology*. – 2000. – Vol.54. – №4. – P. 587–598.
- Hurk van den R., Dijkstra G., Hulshof S.C.J. Micromorphology of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis, with particular reference to atypical granulosa cells // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1994. – Vol.100, №137. – P. 142–145.
- Lackey B., Gray D., Henricks N. Physiological basis for use on IGFs in reproductive application: a review // *Theriogenology*. – 2000. – Vol.53, №5. – P. 1147–1156.
- Merryman J.A., Whittingham D.G., Carroll J. The effect of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor on the developmental capacity of in vitro matured mouse oocytes // *Human reproduction*. – 1998. – Vol.13, №3. – P. 690–695.
- Monniaux D., Monget P., Besnard N. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants // *Theriogenology*. – 1997. – Vol.47, №1. – P. 3–12.
- Sirisathien S., Hernandez-Fonseca H.J., Brackett B.G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro // *Animal Reproduction Science*. – 2003. – Vol.77, № 1–2. – P. 21–32.
- Thibodeaux J.K., Myers H.W., White K.L. Effect of a serum extender containing growth factors on development of IVM and IVF bovine embryos // *Theriogenology*. – 1995. – Vol.44, №3. – P. 423–432.

**Влияние двух типов клеточных культур репродуктивных органов самок на дозревание *in vitro* ооцитов крыс**  
**С.В.Фёдорова, А.В.Мадич**

Представлены результаты исследований по влиянию ко-культивирования ооцитов крыс с клеточными культурами яйцепроводов и гранулёзы на их дозревание в условиях *in vitro*. Из полученных экспериментальных данных следует, что ооцит-кумуляные комплексы (ОКК) крыс при культивировании на двух разных типах культур клеток репродуктивных органов самок обладают разной степенью дозревания. Дозревание ОКК на культуре эпителиальных клеток яйцепроводов является более эффективным, чем на культуре клеток гранулёзы. Очевидно, это связано с тем, что секреция клеток гранулёзы ингибирует дозревание ОКК из-за апоптических процессов, которые происходят в клетках этого типа при атрезии фолликулов в условиях физиологического полового цикла.

Ключевые слова: *клетки эпителия яйцепроводов, культура клеток гранулёзы, ооцит-кумуляные комплексы, культивирование in vitro.*

**Influence of two types cellular cultures of females reproductive organs on in vitro maturation of rats oocytes**  
**S.V.Fyodorova, A.V.Madich**

The results of the study of the influence of rats oocytes co-cultivation with oviduct epithelium and granulose cells cultures on their maturation in vitro are presented. From the received experimental data it may be concluded that oocytes-cumulus complexes (OCCs) of rats cultivated on two different types of cell cultures from female's reproductive organs had different level of maturation. Maturation of OCCs on the oviduct epithelium cell culture is more effective than on the culture of granulose cells. Obviously, it may be explained by inhibitory influence of specific proteins from granulose cells during their apoptosis which occurs in the time of follicles atresia in the conditions of a female reproductive cycle.

Key words: *oviduct epithelium cells, granulose cell culture, oocytes-cumulus complexes, cultivation in vitro.*

Представлено: М.М.Шараном  
 Рекомендовано до друку: В.А.Бондаренком