

УДК 577.352.53:591.31.085.43

ЕЛЕКТРИЧНА ПРОВІДНІСТЬ ЕМБРІОНІВ МИШЕЙ ДОІМПЛАНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ РОЗВИТКУ ПІСЛЯ ГОРМОНАЛЬНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ ЯЄЧНИКІВ ТВАРИН

Є. І. Смольянінова¹
О. А. Стріха¹
В. О. Шигимага²
А. О. Колеснікова²
Є. О. Гордієнко¹

¹Інститут проблем кріобіології та кріомедицини
НАН України, Харків

²Інститут тваринництва НААН, смт Куліничі,
Харківська обл.

E-mail: esmolyaninova@rambler.ru

Отримано 25.01.2012

Стимуляція яєчників ссавців із застосуванням гонадотропних гормонів є невід'ємним етапом допоміжних репродуктивних біотехнологій. Водночас відомо, що гормональна стимуляція призводить до овуляції гамет із різною здатністю до подальшого розвитку. Необхідність дослідження динаміки зміни у функціональному стані гамет та ембріонів зумовлює пошук додаткових клітинних параметрів та методичних підходів щодо їх визначення. Методом імпульсної кондуктометрії визначали питому електричну провідність одно-, дво- та восьмиклітинних ембріонів мишей, яких було отримано після гормональної стимуляції яєчників тварин. Показано, що після запліднення та на перших трьох стадіях розвитку ембріонів значення їхньої електричної провідності поступово змінюються, а характер розподілу цього параметра стає більш однорідним. Для зигот мишей діапазон значень електричної провідності становить $(2,16 \pm 0,24 \div 7,38 \pm 0,58) \cdot 10^{-3}$ См/м. Для двоклітинних та восьмиклітинних ембріонів діапазон значень питомої електричної провідності становить $(1,54 \pm 0,11 \div 6,12 \pm 0,34) \cdot 10^{-3}$ См/м та $(1,21 \pm 0,15 \div 5,55 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$ См/м, відповідно. Проведені дослідження свідчать про те, що електрична провідність є чутливим параметром, який дає змогу виявити приховані порушення функціонального стану ембріонів та дослідити динаміку його зміни. Методом Ноеchst-фарбування досліджено стан ядерного матеріалу ембріонів з морфологічними порушеннями. На основі отриманих та літературних даних обговорюються можливі механізми розвитку апоптозу в ранніх ембріонах миші.

Ключові слова: ооцит, ембріон, електропорація, електрична провідність, гормональна стимуляція яєчників, Ноеchst-фарбування, апоптоз.

Удосконалення допоміжних репродуктивних технологій із відтворення сільськогосподарських та лабораторних тварин і лікування безпліддя людини тісно пов'язані з дослідженнями, які спрямовані на визначення чинників, що впливають на якість ооцитів ссавців. Наразі відомо, що якість ооцитів безпосередньо впливає на їхню здатність до запліднення та подальший розвиток ембріонів [1–4]. Накопичений на сьогодні великий експериментальний досвід свідчить про те, що одним із суттєвих чинників, що впливають на якість ооцитів та ембріонів ссавців, є гормональна стимуляція яєчників тварин з метою викликати в них суперовуляцію [5–11]. Гормональна стимуляція змі-

нює характер овуляції, впливаючи на взаємодію ооцита та фолікулярних клітин, унаслідок чого до овуляції здатні різні за морфофункціональним станом ооцити. Основними критеріями, за якими оцінюють стан ооцитів, є морфологічна цілісність гамет, стан хромосомного матеріалу, здатність до запліднення в умовах *in vivo* або *in vitro*. У свою чергу якість ранніх ембріонів визначають, як правило, за темпами дроблення, кількістю та цілісністю бластомерів і ступенем їх фрагментації. Однак можуть бути приховані порушення фізіологічного стану ооцитів та ембріонів, що потребує розширення спектра діагностичних клітинних параметрів та методів їх вимірювання з метою

виявлення та оцінки зазначених порушень. У низці робіт показано, що такі електричні характеристики клітин, як мембранний потенціал і транспортування іонів крізь плазматичні мембрани, є чутливими параметрами, які віддзеркалюють стан клітин та його зміну під впливом різноманітних ендогенних та екзогенних чинників, зокрема ступінь зрілості ооцитів ссавців [12–14]. У сучасній біотехнології широкого застосування набув метод електропорації [15–17]. Ця технологія ґрунтується на утворенні в плазматичній мембрані короточасних дефектів типу наскрізних пор під дією зовнішнього електричного поля [16]. Традиційно дію електричного імпульсу використовують для навантаження клітин агентами, які в нормі не проникають крізь плазматичні мембрани, трансфекції клітин чужорідною ДНК, злиття клітин тощо [16]. Значення напруженості імпульсного електричного поля (ІЕП), яке спричинює електричний пробій мембрани, є чутливим параметром, що безпосередньо пов'язаний зі структурою мембрани та зміною її стану під впливом різних чинників [17]. Електричною характеристикою цього процесу є електропровідність клітини, яка істотно змінюється зі зростанням напруженості. У попередньому дослідженні методом електропорації нами було показано, що гормональна стимуляція яєчників мишей суттєво впливає на морфофункціональний стан ооцитів, що відбивається на значеннях їхньої електричної провідності [18].

Метою роботи було визначення питомої електричної провідності ранніх ембріонів мишей доімплантаційних стадій розвитку, яких було отримано після гормональної стимуляції яєчників тварин.

Матеріали і методи

Ембріони мишей доімплантаційних стадій розвитку (зиготи, дво- та восьмиклітинні ембріони) отримували від самок мишей гібриду F_1 (C57BL/6J × SV129). У самок ($n = 15$) викликали суперовуляцію без урахування стадії естрального циклу внутрішньочеревним уведенням гонадотропних гормонів: 5 МО гонадотропіну сироватки жеребних кобил (ГСЖК) (Folligon, Нідерланди) і через 48 год — 7,5 МО хоріонічного гонадотропіну людини (лХГ) (Chorulon, Нідерланди). Для одержання ембріонів самок підсаджували до самців на ніч для запліднення. День виявлення копуляційної пробки визначали як перший день вагітності. Ембріони отримували за стандартним методом [19]. Самок забивали

шляхом дислокації шийних хребців. Зиготи на стадії двох пронуклеусів виділяли з яйцепроводів забитих самок через 20 год після введення лХГ. Двоклітинні ембріони отримували через 48 год після ін'єкції лХГ, восьмиклітинні — через 72 год. Потім проводили їх прижиттєве морфологічне оцінювання, враховуючи кількість бластомерів, стан цитоплазми (прозорість та щільність), відсутність фрагментації. В експерименті використовували тільки морфологічно повноцінні ооцити. Стадію клітинного циклу та стан ядерного матеріалу контролювали, фарбуючи ембріони флуоресцентним барвником Hoechst 33342. Ембріони експонували в 0,1% -му розчині Hoechst-33342 при 37 °С протягом 30 хв. Стан хромосомного апарату ембріонів після фарбування досліджували під мікроскопом LSM-510 META (Carl Zeiss, Німеччина) за довжини хвилі збудження 405 нм. Емісію реєстрували на довжині хвилі 465 нм.

Експерименти на тваринах виконували відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених I–III Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001–2007 рр.) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, Франція, 1985).

Питому електричну провідність ембріонів визначали методом імпульсної кондуктометрії [20]. Кожен окремий ембріон двічі відмивали в 0,3 М ізотонічному розчині сахарози для видалення слідів сольового розчину. Потім зразки переносили на предметному склі на предметний столик світлового мікроскопа. У краплю сахарози з ембріоном занурювали мікроелектроди із золотої нитки, що були запаєні в скляні капіляри, таким чином, щоб ембріон опинився між ними. На мікроелектроди подавали поодинокі прямокутні електричні імпульси, амплітуда яких із кожним імпульсом зростала лінійно на певну величину. Тривалість електричного імпульсу становила 60 мкс. Питому електричну провідність ембріонів визначали опосередковано — вимірюванням амплітуди напруги на каліброваному резисторі, який був підключений послідовно з мікроелектродами. Питому електричну провідність об'єкта G , що містився в міжелектродному просторі, знаходили згідно з раніше розробленим алгоритмом [20].

Статистичну обробку даних здійснювали із застосуванням t -критерія Стьюдента з використанням пакета статистичного аналізу даних програми Microsoft Office Excel.

Результати та обговорення

У результаті проведених експериментів встановлено залежність питомої електричної провідності окремих ембріонів мишей, експонованих в ізотонічному розчині сахарози, від напруженості ІЕП між електродами.

У попередньому дослідженні [18] нами було показано, що в загальному пулі ооцитів, що їх було отримано від гормонально стимульованих тварин, були присутні дві групи гамет, які не відрізнялися між собою за морфологічними ознаками, але суттєво різнилися за електричними параметрами. Ооцити однієї групи характеризувалися більш високими значеннями електричної провідності, які змінюються в діапазоні $(4,23 \pm 0,28 \div 8,23 \pm 0,53) \cdot 10^{-3}$ См/м. Гамети другої групи мали менші значення електричної провідності $(1,78 \pm 1,5 \div 4,36 \pm 4,9) \cdot 10^{-3}$ См/м. За збільшенням напруженості ІЕП до значень, близьких до $35 \cdot 10^4$ В/м, у більшості випадків реєстрували різке зростання провідності, що вказує на незворотний електричний пробій плазматичних мембран ооцитів.

Одержані дані свідчать, що гормональна стимуляція яєчників мишей призводить не тільки до наявних морфологічних порушень ооцитів, але й до прихованих, що віддзеркалюються у значеннях їхньої електричної провідності. Виходячи з припущення, що саме гормональна стимуляція яєчників тварин спричинює овуляцію ооцитів з різною здатністю до подальшого розвитку, ми вважали за доцільне дослідити, яким чином змінюються значення цього параметра після запліднення та упродовж подальшого розвитку ембріонів.

На рис. 1 показано залежність питомої електричної провідності зигот, які було

отримано від гормонально стимульованих самок мишей, від напруженості ІЕП в $0,3$ М розчині сахарози.

Як випливає з наведених даних, розподіл ембріонів на дві групи (порівняно з ооцитами) за електричними параметрами практично не спостерігається. У даному разі має місце широкий розкид значень питомої електричної провідності між окремими зиготами. Значення цього параметра змінюються в діапазоні $(2,16 \pm 0,24 \div 7,38 \pm 0,58) \cdot 10^{-3}$ См/м. Невеликі коливання значень електричної провідності окремих ооцитів (рис. 1, а) за збільшення напруженості поля свідчать про утворення пор у плазматичній мембрані ооцитів та її наступної репарації. У разі збільшення напруженості ІЕП до значень, близьких до $35 \cdot 10^4$ В/м, в окремих випадках реєстрували різке зростання провідності, що свідчить про незворотний електричний пробій плазматичних мембран зигот.

На стадії двох бластомерів (рис. 2) електрична провідність ембріонів мишей змінюється в діапазоні $(1,54 \pm 0,11 \div 6,12 \pm 0,34) \cdot 10^{-3}$ См/м і спостерігається менший розкид значень електричної провідності між окремими ембріонами.

На рис. 3 наведено залежність електричної провідності восьмиклітинних ембріонів мишей, що їх було одержано від гормонально стимульованих тварин, від напруженості ІЕП.

Як свідчать одержані дані, розкид значень електричної провідності між окремими ембріонами дедалі зменшується. Значення цього параметра змінюється в діапазоні $(1,21 \pm 0,15 \div 5,55 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$ См/м.

У процесі розвитку електричні параметри ембріонів, яких отримано від гормонально стимульованих тварин, поступово змінюються. Ми вважаємо, що різниця між

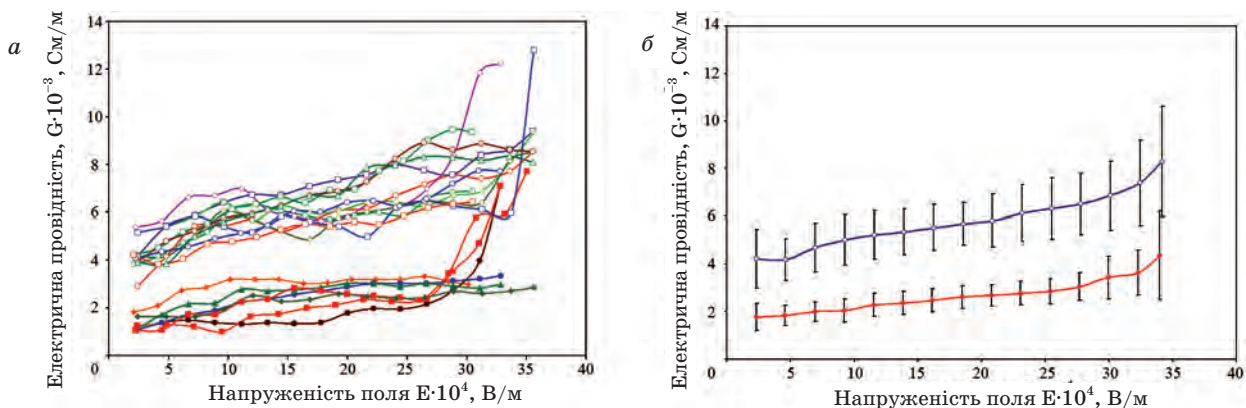


Рис. 1. Залежність питомої електричної провідності зигот мишей від напруженості імпульсного електричного поля в $0,3$ М розчині сахарози:

а — значення залежності для окремих ембріонів; б — статистично оброблені дані, $P \geq 0,05$

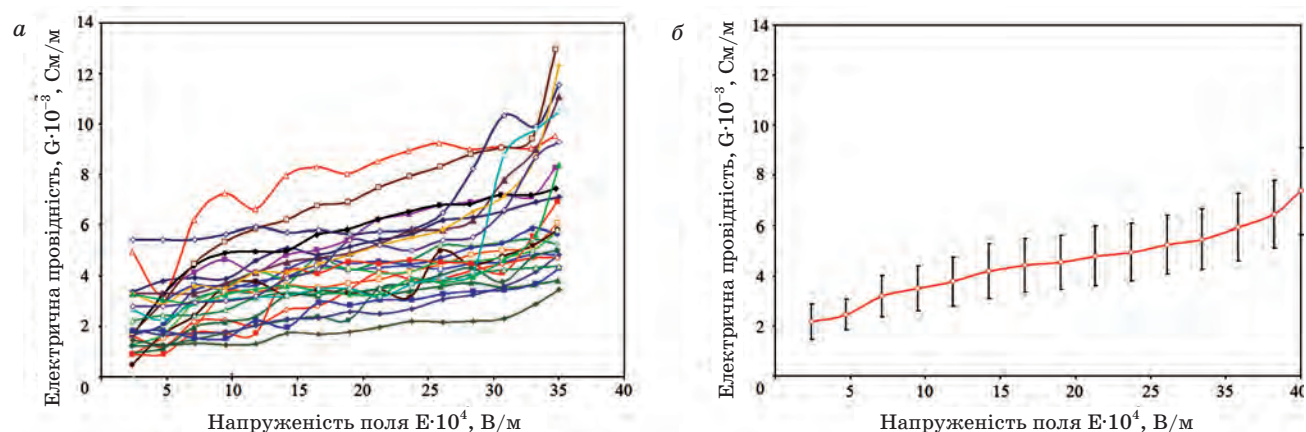


Рис. 2. Залежність питомої електричної провідності двоклітинних ембріонів мишей від напруженості імпульсного електричного поля в 0,3 М розчині сахарози:

а — значення залежності для окремих ембріонів; б — статистично оброблені дані, $P \geq 0,05$

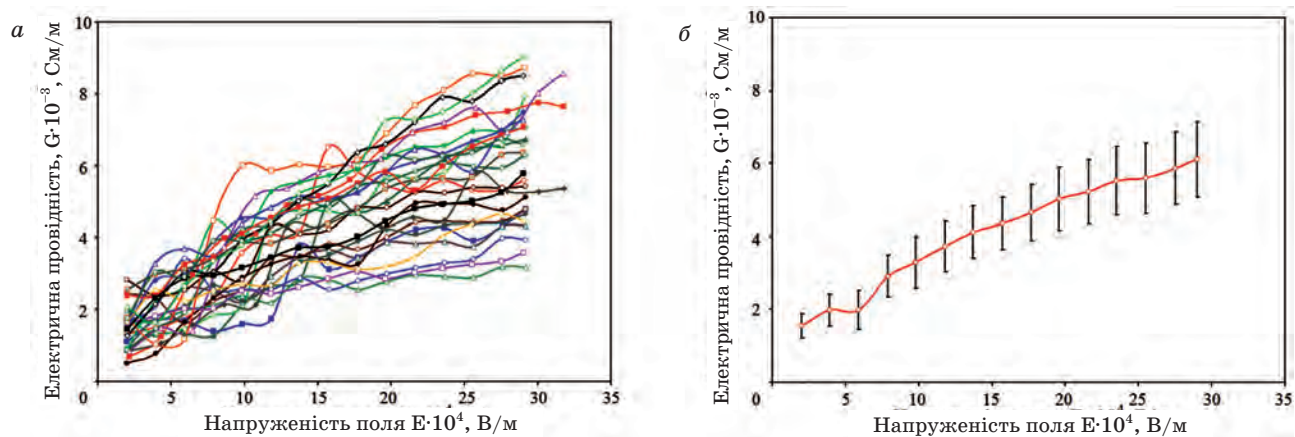


Рис. 3. Залежність питомої електричної провідності восьмиклітинних ембріонів мишей від напруженості імпульсного електричного поля в 0,3 М розчині сахарози:

а — значення залежності для окремих ембріонів; б — статистично оброблені дані, $P \geq 0,05$

значеннями електричних параметрів та динаміка їх зміни віддзеркалюють відмінність у функціональному стані ембріонів, який, у свою чергу, є наслідком відповідного функціонального стану ооцитів. Як показують отримані дані, після запліднення розподіл ембріонів за електричними параметрами поступово змінюється: зникає розподіл на дві чітко відокремлені одна від одної групи, а ширина розкиду значень електричної провідності зменшується. Звертає на себе увагу відсутність необоротного електричного пробую плазматичних мембран дво- та восьмиклітинних ембріонів порівняно з ооцитами та зиготами. Відомо, що напруженість електричного пробую мембрани обернено пропорційна радіусу клітини [16]. У процесі розвитку радіус бластомерів ембріонів зменшується, тому для виникнен-

ня необоротного пробую ембріонів на стадії двох та восьми бластомерів потрібні більш високі значення напруженості електричного поля, ніж ті, що використовувались у нашому дослідженні.

Як відомо, ембріони з порушеннями метаболізму поступово дегенерують і видаляються з популяції в результаті апоптозу [21]. Апоптоз — явище програмованої загибелі клітин, що супроводжується низкою характерних змін у морфології та функціях клітин. У процесі апоптозу в клітинах розвиваються необоротні молекулярні процеси, унаслідок яких відбуваються зморщування мембрани, зменшення об'єму, ушкодження (розриви) ядерної ДНК, конденсація хроматину, подальший розпад ядра, фрагментація клітин на везикули, формування апоптотичних тілець, які потім видаляються з організ-

му [22–24]. Фундаментальні дослідження явища апоптозу в гаметах та ембріонах ссавців тісно пов'язані з дослідженнями, що спрямовані на з'ясування ролі ядра й цитоплазми у його активації. Фолікулогенез та частка фолікулів, що ростуть, залежать від багатьох чинників які включають, зокрема, фактори клітин гранульози та такі, що секретуються ооцитом [25–27]. Навіть якщо мейоз успішно завершився, у цитоплазмі ооцита можуть відбуватись інші процеси, які потрібні для успішного запліднення та подальшого розвитку ембріона. Клітинні механізми, що впливають на якість ооцитів, остаточно не з'ясовано й дотепер. У ранньому ембріогенезі ссавців наразі виділено кілька критичних періодів, зумовлених особливостями стадій розвитку ембріонів [28]. Перший критичний період збігається із заплідненням ооцита і початком мітотичного поділу зиготи, що значною мірою залежить від ступеня зрілості ооцита. Упродовж раннього ембріогенезу в мишей експресія власного геному починається на стадії двох бластомерів [29, 30]. У низці робіт показано, що первинні зміни, які запускають апоптотичний процес, можуть відбуватись у цитоплазмі і передувати порушенням ядерного матеріалу [31]. Головну роль у цих процесах відіграють мітохондрії [32]. Мітохондріальна дисфункція може спричинятися дією зовнішніх чинників [31] і успадковуватися ооцитами без набуття виразних морфологічних аномалій. Сублетальні порушення мітохондрій, які визначають біохімічний статус ооцитів, можуть мати більш віддалені наслідки і проявлятися після запліднення та упродовж подальшого розвитку ембріонів [32, 33].

На наступному етапі нами проведено аналіз морфологічних порушень ранніх ембріонів методами світлової мікроскопії та Hoechst-фарбування.

На рис. 4 подано мікрофотографії двоклітинних ембріонів миші, які було отримано після гормональної стимуляції тварин.

У загальному пулі двоклітинних ембріонів є ембріони з вираженою фрагментацією за типом «виноградного грона», що є маркером пізньої стадії апоптозу. Окрім того, поряд із повністю фрагментованими присутні й одноклітинні ембріони, які зупинили свій розвиток на стадії зиготи (рис. 4, б).

На рис. 5 наведено мікрофотографії ембріонів після Hoechst-фарбування.

В ембріонах з ознаками фрагментації ядерний матеріал розсіяний по цитоплазмі (рис. 5, а), що є ознакою пізньої стадії апо-

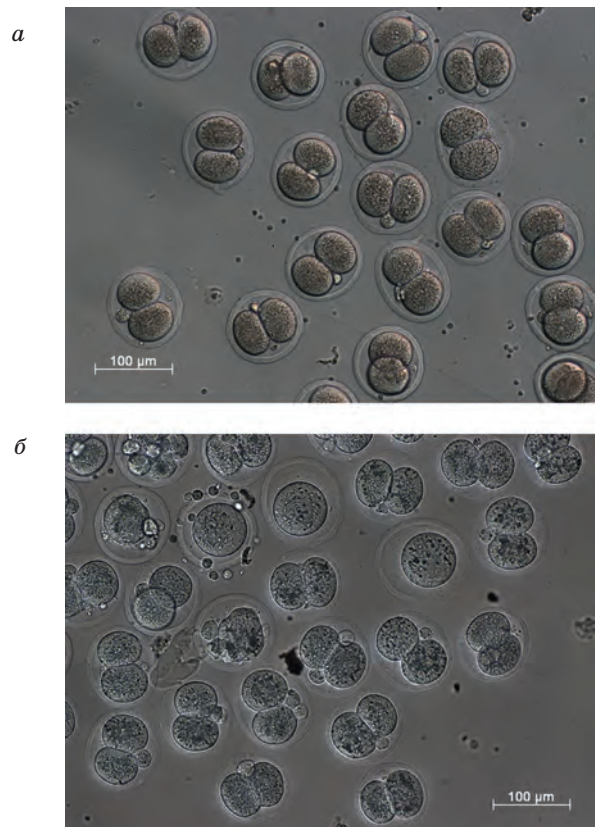


Рис. 4. Мікрофотографії двоклітинних ембріонів мишей, отриманих від гормонально стимульованих тварин:
а — інтактні ембріони; б — ембріони з ознаками морфологічних порушень

птозу. У деяких одноклітинних ембріонах Hoechst-фарбування виявило два наближених один до одного пронуклеуси, без виражених порушень ядерного матеріалу (рис. 5, б).

Наведений приклад вказує на те, що зупинка в розвитку одноклітинних ембріонів може бути зумовлена запуском апоптотичних процесів у цитоплазмі. На користь цього припущення свідчать результати роботи [34], в якій показано, що просторовий розподіл протеасом (протеїнового комплексу, що бере участь в запуску та розвитку апоптозу) в ооцитах та ембріонах людини з ознаками апоптозу істотно змінюється після запліднення та в процесі розвитку ембріонів. Помітне накопичення протеасом у ядерному матеріалі відбувається на стадії двох бластомерів, тимчасом як в ооцитах та зиготах розподіл цих пептидів більш однорідний.

Таким чином, методом електропорації вперше визначено питому електричну провідність у зростаючому ІЕП ембріонів мишей доімплантаційних стадій розвитку,

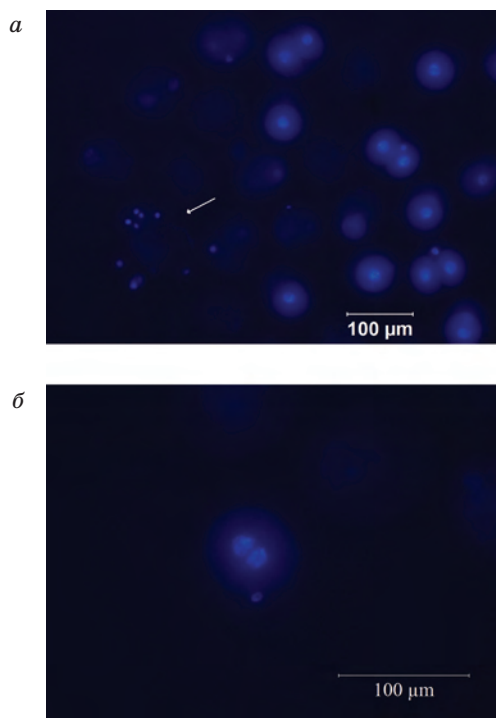


Рис. 5. Мікроскопічне зображення ембріонів мишей після фарбування флуоресцентним барвником Hoechst 33342:
 а — розсіяння ядерного матеріалу у фрагментованих ембріонах (показано стрілкою);
 б — два пронуклеуси у зиготі миші, яка зупинила свій подальший розвиток

отриманих після гормональної стимуляції яєчників тварин. Показано, що значення та характер розподілу цього електричного параметра для ембріонів та ооцитів мишей суттєво відрізняються. Характер розподілу значень їхньої електричної провідності змінюється після запліднення і стає більш однорідним під час розвитку ембріонів. Вилучення з процесу дроблення нежиттєздатних ембріонів із функціональними порушеннями шляхом апоптозу віддзеркалюється у зміні значень їхньої електричної провідності. Ширина розкиду значень цього параметра між окремими ембріонами поступово зменшується у процесі їх розвитку. Отримані дані свідчать, що електрична провідність є чутливим параметром, який дає змогу виявити та відслідкувати динаміку прихованих порушень функціонального стану ембріонів під впливом як екзогенних, так і ендогенних чинників. Простота використання, висока точність задання параметрів електричного імпульсу та надійне відтворення протоколу електропорації дозволяє розглядати метод імпульсної кондуктометрії як перспективний експериментальний підхід для експрес-оцінки функціонального стану гамет та ембріонів у допоміжних репродуктивних біотехнологічних операціях.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Krisher R. L.* The effect of oocyte quality on development // *J. Anim. Sci.* — 2004. — V. 82, E-Suppl. — E14–E23.
2. *Van der Auvera I., D'Hooghe T.* Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development // *Hum. Reprod.* — 2001. — V. 16, N 6. — P. 1237–1243.
3. *Wang Y., Osk S. A., Chian R. C.* Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embryonic development *in vitro* // *Reprod. Biomed. Online.* — 2006. — V. 12, N 3. — P. 304–314.
4. *Watson A. J.* Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence // *J. Anim. Sci.* — 2007. — V. 85, Suppl. 13. — E1–E3.
5. *Ertzeid G., Storeng R.* The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice // *Hum. Reprod.* — 2001. — V. 16, N 2. — P. 221–225.
6. *Dhanju C. K., Sangha G. K., Sekhon P. K.* Biochemical status of ovarian after induction of superovulation on different days of estrus cycle in mice // *Ind. J. Exp. Biol.* — 2001. — V. 39, N 8. — P. 777–780.
7. *Ertzeid G., Storeng R.* Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice // *J. Reprod. Fertil.* — 1992. — V. 96, N 4. — P. 649–655
8. *Redina O. E., Amstislavsky S. Ya., Maksimovskiy L. F.* Induction of superovulation in DD mice at different stages of the estrous cycle // *Ibid.* — 1994. — V. 102, N 2. — P. 263–267.
9. *Fortier A. L., Lopes F. L., Darricarrere N. et al.* Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta // *Hum. Mol. Genet.* — 2008. — V. 17, N 11. — P. 1653–1665.
10. *Schoevers E. J., Kidson A., Verheijden J. H., Bevers M. M.* Effect of follicle-stimulating hormone on nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes *in vitro* // *Theriogenology.* — 2003. — V. 59, N 9. — P. 2017–2028.
11. *Perez G. I., Tao X. J., Tilly J. L.* Fragmentation and death (a.k.a.apoptosis) of ovulated oocytes // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — V. 5, N 5. — P. 414–420.
12. *Emery B. R., Miller R. L., Carrell D. T.* Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with prenatal cumulus cell

- attachment and developmental stage // *BMC Dev. Biol.* — 2001. — Epub. — 1:14 (doi: 10.1186/1471-213X-1-14).
13. *Okamoto H., Takahashi K., Yamashita N.* Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin // *J. Physiol.* — 1977. — V. 267, N 2. — P. 465–495.
 14. *Day M. L., Johnson M. H., Cook D. I.* A cytoplasmic cell cycle controls the activity of K⁺-channel in the pre-implantation mouse embryos // *EMBO J.* — 1998. — V. 17, N 7. — P. 1952–1960.
 15. *Zimmermann U.* Electric field mediated fusion and related electrical phenomena // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1982. — V. 694, N 3. — P. 227–277.
 16. *Chehl J.* Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research // *Acta Physiol. Scand.* — 2003. — V. 177, N 4. — P. 437–447.
 17. *Чизмаджиев Ю. А., Черномордик Л. В., Пастушенко В. Ф., Абидор И. Г.* Электрический пробой бислойных липидных мембран // *Итоги науки и техники. Сер. Биофизика мембран.* — 1982. — Т. 2. — 308 с.
 18. *Смольянінова Є. І., Шигимага В. О., Колеснікова А. О.* Вплив гормональної стимуляції на морфологічні та електричні параметри ооцитів миші // *Біол. тварин.* — 2009. — Т. 11, № 1–2. — С. 329–338.
 19. *Биология развития млекопитающих. Методы* / Под ред. М. Манк. — М.: Мир, 1990. — 406 с.
 20. *Шигимага В. А.* Определение проводимости эмбриональных клеток животных // *Пробл. бионики.* — 2003. — Вып. 59. — С. 60–64.
 21. *Haouzi D., Hamamah S.* Pertinence of apoptosis markers for the improvement of in vitro fertilization (IVF) // *Curr. Med. Chem.* — 2009. — V. 16, N 15. — P. 1905–1916.
 22. *Takase K., Ishikawa M., Hoshiai H.* Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova // *Tohoku J. Exp. Med.* — 1995. — V. 175, N 1. — P. 69–76.
 23. *Fujino Y., Ozaki K., Yamamasu S. et al.* DNA fragmentation of oocytes in aged mice // *Hum. Reprod.* — 1996. — V. 11, N 7. — P. 480–483.
 24. *Van Blerkom J., Davis P. W.* DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis // *Ibid.* — 1998. — V. 13, N 5. — P. 1317–1324.
 25. *Eppig J.* Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals // *Reproduction.* — 2001. — V. 122, N 6. — P. 829–838.
 26. *Han Z-B., Lan G-Ch., Wu Y-G. et al.* Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well — in-drop culture system // *Ibid.* — 2006. — V. 132, N 5. — P. 749–758.
 27. *Gilchrist R. B., Lane M., Thopson J. G.* Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality // *Hum. Reprod. Update.* — 2008. — V. 14, N 2. — P. 159–177.
 28. *Мадич Ф. В.* Молекулярні аспекти критичних періодів раннього ембріонального розвитку тварин // *Біол. тварин.* — 2005. — Т. 7, № 1–2. — С. 22–29.
 29. *Li L., Zheng P., Dean J.* Maternal control of early mouse development // *Development.* — 2010. — V. 137, N 6. — P. 859–870.
 30. *Warner C. M., Exley G. E., McElhinny A. S., Tang C.* Genetic regulation on preimplantation mouse embryo survival // *J. Exp. Zool.* — 1998. — V. 282, N 1–2. — P. 272–279.
 31. *Liu L., Keefe D. L.* Cytoplasm Mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygote // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 62, N 6. — P. 1828–1834.
 32. *Van Blerkom J.* Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence // *Mitochondrion.* — 2010. — V. 11, N 5. — P. 797–813.
 33. *Thouas G. A., Trounson A. O., Jones G. M.* Developmental effects of sublethal mitochondrial injury in mouse oocytes // *Biol. Reprod.* — 2006. — V. 74, N 5. — P. 969–977.
 34. *Wojcik C., Benchaib M., Lornage J. et al.* Localization of proteomes in human oocytes and preimplantation embryos // *Mol. Hum. Reprod.* — 2000. — V. 6, N 4. — P. 331–336.

**ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОВОДИМОСТЬ
ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ
ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ СТАДИЙ
РАЗВИТИЯ ПОСЛЕ ГОРМОНАЛЬНОЙ
СТИМУЛЯЦИИ ЯИЧНИКОВ ЖИВОТНЫХ**

*Е. И. Смольянинова¹, О. А. Стриха¹,
В. А. Шигимага², А. А. Колесникова²,
Е. А. Гордиенко¹*

¹Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков
²Институт животноводства НААН,
пгт Кулинич, Харьковская обл.

E-mail: esmolyaninova@rambler.ru

Стимуляция яичников млекопитающих с использованием гонадотропных гормонов является неотъемлемым этапом вспомогательных репродуктивных биотехнологий. В то же время известно, что гормональная стимуляция приводит к овуляции гамет с различным потенциалом к дальнейшему развитию. Необходимость исследования динамики изменения функционального состояния гамет и эмбрионов обуславливает поиск дополнительных клеточных параметров и методических подходов для их определения. Методом импульсной кондуктометрии определяли удельную электрическую проводимость одно-, двух- и восьмиклеточных эмбрионов мышей, полученных после гормональной стимуляции яичников животных. Показано, что после оплодотворения и на первых трех стадиях развития эмбрионов значения их электрической проводимости постепенно изменяются, а характер распределения этого параметра становится более однородным. Для зигот мышей диапазон значений электрической проводимости составляет $(2,16 \pm 0,24 \div 7,38 \pm 0,58) \cdot 10^{-3}$ См/м. Для двуклеточных и восьмиклеточных эмбрионов диапазон значений удельной электрической проводимости составляет $(1,54 \pm 0,11 \div 6,12 \pm 0,34) \cdot 10^{-3}$ См/м и $(1,21 \pm 0,15 \div 5,55 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$ См/м, соответственно. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что электрическая проводимость является чувствительным параметром, который позволяет выявить скрытые нарушения функционального состояния эмбрионов и исследовать динамику его изменения. Методом Hoechst-окрашивания исследовано состояние ядерного материала эмбрионов с морфологическими нарушениями. На основе полученных и литературных данных обсуждаются возможные механизмы развития апоптоза в ранних эмбрионах мыши.

Ключевые слова: ооцит, эмбрион, электропорация, электрическая проводимость, гормональная стимуляция яичников, Hoechst-окрашивание, апоптоз.

**ELECTRIC CONDUCTIVITY OF MURINE
EMBRYOS AT PREIMPLANTATION
DEVELOPMENTAL STAGES AFTER
OVARY HORMONAL STIMULATION
IN ANIMALS**

*E. I. Smolyaninova¹, O. A. Strikha¹,
V. A. Shigimaga², A. A. Kolesnikova²,
E. A. Gordienko¹*

¹The Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kharkiv

²The Institute of Animal Science of National
Academy of Agrarian Sciences, stl Kulinichi,
Kharkiv region

E-mail: esmolyaninova@rambler.ru

Ovary stimulation in mammals with usage of gonadotropic hormones is an integral stage of assisted reproductive biotechnologies. At the same time it is known that hormonal stimulation causes the ovulation of gametes of different ability to develop. Necessity to investigate the dynamics of gamete and embryo functional state change stipulates the search for additional cell parameters and methodical approaches to their determination. Specific electric conductivity of one-, two-, and eight-cell mouse embryos obtained following hormonal stimulation has been determined by the method of impulse conductometry. It has been shown that the values of electric conductivity are gradually changed after fertilization as well as during an embryo cleavage. The distribution character of this electric parameter becomes more homogeneous. The range of the values of electric conductivity of mouse zygotes has been shown to be $(2,16 \pm 0,24 \div 7,38 \pm 0,58) \cdot 10^{-3}$ S/m. The ranges of values of electric conductivity of two- and eight-cell mouse embryos have been shown to be $1,54 \pm 0,11 \div 6,12 \pm 0,34) \cdot 10^{-3}$ S/m and $(1,21 \pm 0,15 \div 5,55 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$ S/m, correspondingly. The investigations indicate that an electrical conductivity is a sensitive parameter, which allows detecting the hidden disorders of embryo functional state and studying the dynamics of its change. The state of nuclear material of embryos with morphological injury has been investigated by Hoechst-staining method. On the base of the obtained and literature data probable mechanisms of apoptosis in early mouse embryos are discussed.

Key words: oocyte, embryo, electroporation, electric conductivity, ovary hormone stimulation, Hoechst-dyeing, apoptosis.