

УДК 575.16:57.085:591.16:636

Остаповець Л.І., © кандидат біологічних наук, (ostlara@online.ua)

Інститут розведення і генетики тварин,
с. Чубинське, Бориспільський район, Київська обл.**ЦИТОГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ООЦИТІВ СВИНЕЙ ПРИ
ОТРИМАННІ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНИХ ЕМБРІОНІВ ПІСЛЯ
ІНГІБУВАННЯ РЕДУКЦІЙНОГО ДІЛЕННЯ МЕЙОЗУ *IN VITRO***

*Показано можливість партеногенетичного розвитку після інгібування виділення першого полярного тільца в ооцитах свиней та їх наступної активації етанолом, принаймі, до 16-клітинної стадії *in vitro**

Ключові слова: ооцит, мейоз, *in vitro*, дозрівання, партеногенетична активація, ембріон, культивування, цитохалазин, свині

Вступ. Досягнення сучасної біології та генетики розвитку тварин свідчать про те, що без розуміння закономірностей оогенезу та ранніх стадій ембріонального розвитку ссавців неможливо широко застосовувати методи репродуктивної біотехнології [5, 7].

Партеногенез – здатність жіночих статевих клітин розвиватися без участі сперматозоїдів. Перші спроби з активації яйцеклітин ссавців до партеногенетичного розвитку зроблені Г. Пінкусом у 30-х роках ХХ ст., але тільки починаючи з 80-х років дослідження з одержання партеногенетичних ембріонів набули більш широкого розвитку [2, 9]. Залежно від того, на якій стадії мейозу (метафазі I або метафазі II) відбувається партеногенетична активація ооцитів, фактору активації та інших чинників, подальший розвиток активованих гамет може призводити до отримання різних типів партеногенетичних ембріонів. До основних таких типів належать генетично однорідні, неоднорідні та мозаїчні гаплоїди, гетерозиготні диплоїди, амейотичні гетерозиготні диплоїди [6].

В останній час особливої актуальності набули дослідження з активації яйцеклітин до партеногенетичного розвитку на ранніх стадіях мейозу, наприклад на метафазі I. Це може сприяти отриманню нових різновидів диплоїдного мейотичного партеногенезу і наблизити вирішення питання про амейотичний партеногенез у ссавців. На думку вчених, застосування даного методу дасть можливість отримувати нащадків, які за своїм походженням і генетичними характеристиками будуть являти собою материнські клони. А. К. Голубевым та ін. показано, що активація ооцитів корів на стадії метафазі I мейозу *in vitro* холодним шоком призводить до формування 2-4-клітинних амейотичних партеногенетичних ембріонів [3]. При активації ооцитів свиней на метафазі I комбінацією етанолу з циклогексамідом отримані 2–6-клітинні амейотичні партеногенетичні ембріони свиней *in vitro* [4]. Проте, Д. Кубяк із співавторами запропонував інший спосіб отримання амейотичних

партеногенонів свавців *in vitro* [10]. Суть якого полягала у пригніченні першого редукційного ділення мейозу ооцитів мишей з використанням цитохалазину D та послідуною активацією таких гамет до амейотичного партеногенезу. Застосування цитохалазину D обумовлено його здатністю інгібувати полімеризацію актинових мікрофіламентів, що призводить до пригнічення виділення першого полярного тільця під час редукційного ділення мейозу. Тобто інгібує процес цитокінезу, але в той же час не впливає на каріокінез (рух хромосом в анафазі I мейозу), внаслідок чого відбувається формування тетраплоїдних ооцитів, які після активації, завершення 2-го мейотичного ділення та виділення полярного тільця містили диплоїдний набір хромосом. Генотип таких партеногенетичних ембріонів відрізнявся від генотипу матері лише внаслідок мінливості, обумовленої кросинговером. Такі партеногенетичні ембріони розвивалися до стадії бластоцисти, але трансплантація реципієнтам таких ембріонів не призвела до народження нащадків, їх розвиток зупинився на 9-10 день [10]. Застосування І. Б. Кузнецовою та ін. такого підходу дало можливість одержати амейотичні партеногенетичні ембріони корів на стадії ранньої морули [8].

Виходячи з актуальності даного питання було досліджено динаміку дозрівання ооцитів свиней до стадії метафази I мейозу *in vitro* з метою їх послідуною активації до партеногенезу при умові інгібування екструзії першого полярного тільця.

Матеріал і методи. Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси свиней породи велика біла. Відбір яєчників свиней проводили на бойні від забитих тварин. Вилучення ооцит-кумулюсних комплексів ооцитів свиней проводили шляхом розрізання (надрізу) скальпелем стінок видимих антральних фолікулів. Відібрані за морфологічними ознаками ооцити переносили в середовище 199 („Sigma”) для дозрівання з додаванням 20% еструсної сироватки крові корів та клітин гранульози в концентрації $3-5 \times 10^6$ клітин на 1 мл середовища. З метою пригнічення екструзії першого полярного тільця ооцити переносили через 12 годин від початку культивування у середовище 199, яке містило 5 мкг/мл цитохалазину D („Sigma”), де їх культивували протягом 5 або 8 годин. Після чого відмивали у середовищі 199 і переносили в культуральне середовище (загальна тривалість культивування ооцит-кумулюсних комплексів складала 44 години). Ооцит-кумулюсні комплекси культивували при температурі $+38,8^\circ\text{C}$ та 4% CO_2 в повітрі.

Партеногенетичну активацію яйцеклітин свиней проводили 7%-вим розчином етилового спирту протягом 7 хвилин. Після активації гамети культивували в середовищі NCSU-23 при температурі $+38,8^\circ\text{C}$ та 4% CO_2 в повітрі.

Для дослідження стану мейотичних хромосом під час дозрівання ооцитів поза організмом готували сухоповітряні препарати за модифікованим нами методом А. К. Тарковського [11]. Ооцити свиней переносили на 10 хвилин у краплю 0,26%-го гіпотонічного розчину цитрату натрію з подальшою фіксацією сумішшю метанол-оцтової кислоти в співвідношенні 2:1. Фарбування препаратів проводили 2,0%-вим розчином барвника Гімзи.

Результати дослідження. При отриманні партеногенетичних ембріонів свиней за умови інгібування першого мейотичного поділу одним із етапів є вивчення хронології змін стадій мейозу в ооцитах під час дозрівання *in vitro*.

Проведено цитогенетичний аналіз ооцитів свиней, які культивували *in vitro* протягом 10, 12, 14, 16, 18 годин. Встановлено, що через 10 годин дозрівання переважна більшість ооцитів була на стадії диплотени і тільки у 23,8 % гамет спостерігали відновлення мейозу і вони перебували на стадії діакінезу та метафази I (таблиця). Після 12 годин культивування виявлено достовірно більшу кількість ооцитів на метафазі I, порівняно з 10 годинами дозрівання (40,4 % проти 14,3 %, $p < 0,05$) (рис. 1). Через 14 годин спостерігали достовірне збільшення кількості ооцитів на стадії метафази I, порівняно із 10 та 12 годинами дозрівання ($p < 0,05$), а також однакову кількість гамет (9,5 %) на стадії анафази I та телофази I.

Таблиця

Динаміка дозрівання *in vitro* ооцитів свиней до стадії метафази I

Тривалість дозрівання, годин	Ооцити на стадії						Ооцити із дегенерацією хромосом *, n (%)
	диплотени, n (%)	діакінезу, n (%)	метафази I, n (%)	анафази I, n (%)	телофази I, n (%)	метафази II, n (%)	
10 (n = 21)	16 ^a (76,2)	2 (9,5)	3 ^f (14,3)	0	0	0	0
12 (n = 47)	24 ^b (51,1)	4 (8,5)	19 ^g (40,4)	0	0	0	0
14 (n = 21)	5 ^c (23,8)	1 (4,8)	11 ^g (52,4)	2 (9,5)	2 ^h (9,5)	0	1 (4,8)
16 (n = 40)	7 ^d (17,5)	0	20 ^g (50,0)	4 (10,0)	9 (22,5)	0	1 (2,5)
18 (n = 34)	1 ^{dc} (2,9)	0	15 ^g (44,2)	2 (5,9)	13 ⁱ (38,2)	3 (8,8)	1 (2,9)

Примітки:

1. a:b, c:e, f:g; h:i – $p < 0,05$; a:c, b:d – $p < 0,01$; a:d, b:e – $p < 0,001$.

2. n – кількість проаналізованих гамет.

3. * – % від загальної кількості ооцитів.

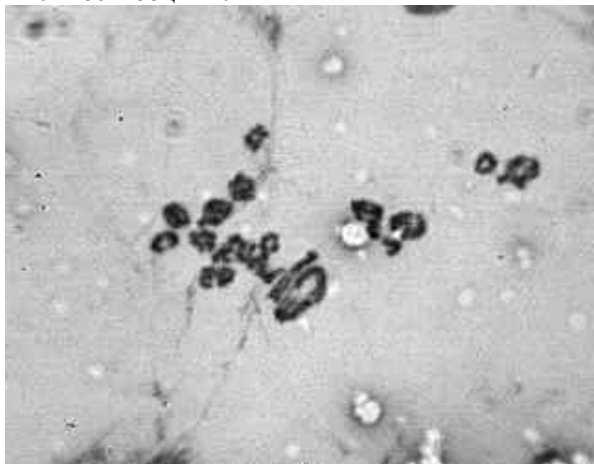


Рис. 1. Стадія метафази I мейозу ооциту свині, зб. x 900 разів

Виділення першого полярного тільця в ооцитах спостерігали після 18 годин дозрівання (8,8 %). Під час проведення цитогенетичного аналізу ооцитів виявлені дегенеративні зміни ядерного матеріалу: злипання хроматину або хромосом та їх деконденсацію. Не виявлено ооцитів з ознаками дегенерації на 10, 12 годину культивування, хоча на 14, 16, 18 годину спостерігали дегенеративні зміни ядерного матеріалу, але не на високому рівні.

Таким чином, за результатами досліджень динаміки дозрівання *in vitro* ооцитів свиней до стадії метафази I встановлено, що оптимальним часом додавання цитохалазину D є 12 годин від початку дозрівання. Хоча на цей час культивування була відмічена менша кількість гамет на стадії метафази I, порівняно з 14, 16 та 18 годинами культивування, але не було виявлено ооцитів на більш просунутих стадіях мейозу.

Проведені дослідження з партеногенетичної активації ооцитів свиней при умові інгібування екструзії першого полярного тільця *in vitro*. Встановлено, що після експозиції ооцитів свиней з цитохалазином D протягом 5 годин та наступної їх активації на 44 годині дозрівання отримано партеногенетичних ембріонів на рівні 69,1 % (рис. 2). Серед яких 43,1 % партеногенетичних ембріонів перебували на 2-4-клітинній та 56,9 % на 6-16-клітинній стадіях розвитку.

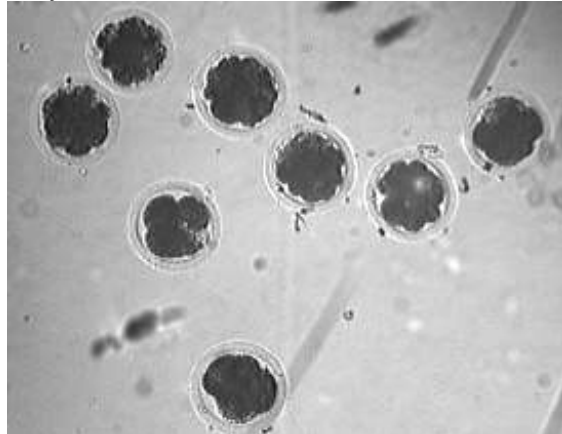


Рис. 2. Амейотичні партеногенетичні ембріони свиней на різних стадіях доїмплантаційного розвитку, зб. x 80 разів

Висновки. Таким чином, за результатами цитогенетичного аналізу ооцитів свиней встановлено, що 12 годин від початку дозрівання ооцитів свиней є оптимальним часом додавання цитохалазину D. Інгібування екструзії першого полярного тільця в ооцитах під час дозрівання *in vitro* з використанням цитохалазину D та наступною активацією таких гамет дозволяє отримати амейотичні партеногенетичні ембріони на рівні 69,1 %.

Література

1. Дыбан А. П. Раннее развитие млекопитающих / А. П. Дыбан. – Л. : Наука, 1988. – 228 с.

2. Дыбан А. П. Партеногенетическое развитие овулировавших мышинных яйцеклеток под влиянием этилового спирта / А. П. Дыбан, Л. И. Хожай // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1980. – Т. 139. – С. 487–489.

3. Цитогенетический анализ ооцитов коров при их стимуляции к партеногенезу / А. К. Голубев, И. В. Кудрявцев, В. Е. Кузнецов [и др.] // I Всес. конф. по цитогенетике сельхоз. животных : 10–13 ноября 1985 г. : тезисы докл. – М., 1985. – С. 13–14.

4. Щегельская Е. А. Раннее партеногенетическое развитие после активации ооцитов свиньи на метафазе I / Е. А. Щегельская // Теория и практика племенного дела в животноводстве : материалы междунар. науч.-практ. конф. – Х., 1996. – С. 74–75.

5. Эрнст Л. К. Фундаментальные и прикладные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии / Л. К. Эрнст // Вестник РАСХН. – 2006. – № 1. – С. 9–11.

6. Эрнст Л. К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст, Н. И. Сергеев. – М. : ВО „Агропромиздат”, 1989. – 302 с.

7. Кузнецов В. Є. Біотехнологія у тваринництві / В. Є. Кузнецов // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть : у 4 т. / редкол. В. В. Моргун (голов. ред.) [та ін.]. – К. : Логос. – 2001. – Т. 4. – С. 31–57.

8. Кузнецова І. Б. Активація ооцитів корів до партеногенетичного розвитку етанолом / І. Б. Кузнецова, В. Є. Кузнецов, О. О. Лукашенко // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34, № 1. – С. 57–64.

9. Pincus G. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. 2. The activation of the tubal eegs of the rabbit / G. Pincus, E. V. Enzmann // Journal Experimental Zoology. – 1936. – Vol. 73, № 2. – P. 195–208.

10. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of first meiotic cleavage with cytochalasin D / J. Kubiak, A. Paldi, M. Weber [et al.] // Development. – 1991. – Vol. 111, № 3. – P. 763–769.

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

Summary

Ostapovetz L.I.

Institute of animals breeding and genetics,

v. Chubinsky, Boryspil District, Kyiv Region, Ukraine

CYTOGENETICAL CHARACTERISTICS OF PORCINE OOCYTES THE PRODUCTION OF PARTHENOGENETIC EMBRYOS AFTER INHIBITION OF THE FIRST MEIOTIC CLEAVAGE *IN VITRO*

It was shown the possibility of parthenogenetic development in vitro of matured porcine oocytes after inhibition of the first meiotic division and treatment with ethanol at least to 16-cell stage embryos.

Стаття надійшла до редакції 19.03.2010