

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ КАК МАРКЕР ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО СОЗРЕВАНИЯ *IN VITRO* ДОНОРСКИХ ООЦИТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Т.И.Кузьмина¹, Х.Торнер², Х.Альм²

¹ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург-Пушкин

²Институт биологии сельскохозяйственных животных, Думмерсторф, Германия

Клеточные репродуктивные технологии, основанные на использовании донорских ооцитов млекопитающих – активно развивающаяся область медицины и животноводства. Применение репродуктивных технологий в животноводстве, значительно расширилось за последние 30 лет, особенно в разведении крупного рогатого скота. Несмотря на то, что в последнее время появилось значительное число публикаций, свидетельствующих об успехах новейших технологий репродукции (получение клонированных и трансгенных телят, свиней, лошадей, овец и т.д.), отдельные этапы этих многоступенчатых технологий (селекция донорских яйцеклеток и эмбрионов, их культивирование и оплодотворение *in vitro*, подбор животных реципиентов, доноров и т.д.) требуют дополнительных разработок, базирующихся на фундаментальных исследованиях завершающих этапов мейоза ооцитов, и на этой основе разработке морфофункциональных тестов качества ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), оптимальных систем дозревания яйцеклеток, компетентных к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбрионов. Разработка метаболических тестов качества яйцеклеток – перспективное направление в совершенствовании клеточных репродуктивных технологий. Актуальность изучения активности митохондрий и их внутриклеточного распределения определяется их ключевой ролью в обеспечении нормального функционирования клетки в целом. Митохондрии играют важную роль в физиологии клетки. Они обеспечивают клетку энергией в форме молекул АТФ, участвуют в регуляции концентрации ионов кальция в цитоплазме, а также являются важнейшим звеном в процессе программируемой клеточной гибели – апоптоза. Ряд авторов обнаружили, что митохондриальная дисфункция и малое содержание АТФ обуславливает низкие потенции ооцита к созреванию и дальнейшему развитию из них эмбрионов (Barnett et al., 1997, Van Blerkom et al., 1998, Van Blerkom, 2004). В наших исследованиях было показана возможность применения флуорохромов, специфически связывающихся с функционально активными митохондриями, для оценки динамики и пространственного расположения митохондрий в ооплазме. Ис-

пользование таких зондов, как Mitotraker Rose, Green подразумевает анализ фиксированной яйцеклетки, что не позволяет в дальнейшем индивидуально оценить ее жизнеспособность перед оплодотворением. В связи с этим, нами были проведены эксперименты по выявлению возможности использования родамина 123 для прижизненного окрашивания созревших яйцеклеток. В выборе концентрации и экспозиции мы исходили из результатов, полученных ранее на митохондриях сперматозоидов (Windsor D. P. and White I., 1993), а также учитывали наши предыдущие результаты по исследованию интенсивности флуоресценции родамина 123 в ооцитах коров (Kuzmina T. I. et al., 1998). Результаты экспериментов, свидетельствуют о том, что обработанные родамином 123 созревшие ооциты коров способны к дальнейшему развитию. Из яйцеклеток, имевших высокий уровень флуоресценции, было получено большее число эмбрионов. После окрашивания ооцитов коров и свиней до начала культивирования родамином 123 нами было протестировано три типа локализации митохондрий в ооплазме: 1. митохондрии образуют мелкие кластеры по периферии ооплазмы; 2. равномерное распределение митохондрий по всей ооплазме; 3. митохондрии формируют гигантские кластеры, занимающие всю центральную часть ооцита. В ооцитах коров с хроматином без признаков дегенерации в 73 % случаев митохондрии локализовались по периферии, этот же показатель в клетках с дегенерированным хроматином составил лишь 21 %. У ооцитов с хроматином без признаков дегенерации и периферийным расположением митохондрий в ооплазме процент окружающих их клеток кумулюса с пикнотическими ядрами был достоверно ниже ($14,7 \pm 2,0$ против $23,2 \pm 2,7$, $P < 0,01$), чем у ОКК с дегенерированным ядерным материалом в ооците, а процент кумулюсных клеток с профазными ядрами – выше ($18,0 \pm 3,1$ против $8,8 \pm 1,6$, $P < 0,05$). Через 24 часа культивирования из 64 клеток, лишь 8 имели периферийную локализацию митохондрий. Последние находились на стадии диплотены (как с нормальными, так и с дегенерированными хромосомами). Равномерное распределение митохондрий имело место у 39,1 % ооцитов. При этом ооциты, которые остались через 24 часа на стадии диплотены имели дегенерированный ядерный материал. 32 % клеток находились на стадии диакинеза и метафазы I. 28% ооцитов с равномерным распределением митохондрий имели дегенерированные хромосомы на стадии телофаза I – метафаза II. Анализируя клетки, имеющие расположение митохондрий в виде гигантских кластеров, установлено, что большинство клеток (51,9 %) находились на стадии телофаза I – метафаза II и имели нормальный ядерный материал. Остальные 48,1 % клеток находились на различных стадиях мейоза. При этом клетки, находящиеся на стадии диплотены и диакинеза имели дегенерированные хромосомы. Исходя из полученных результатов, следует вывод о перераспределении митохондрий в созревающем ооците, что свидетельствует об активном участии этих органелл в процессе созревания ооцитов *in vitro*.

В результате экспериментов по оценке функциональной активности ооцитов свиней на основе определения интенсивности флуоресценции

родамина 123 получены нижеследующие результаты: в ооцитах с нормальным хроматином на стадии диплотены и на стадии метафазы I достоверных различий в интенсивности флуоресценции 123 не обнаружено. Однако на стадии телофазы I – метафазы II интенсивность флуоресценции родамина оказалась достоверно ниже, чем на диплотене и метафазе I ($1,5 \pm 0,4$ на стадии TI-MII и $2,6 \pm 0,2$, $2,5 \pm 0,3$ на стадиях диплотены и MII соответственно, $P < 0,05$). Возможно, функциональная активность митохондрий снижается при блоке развития ооцитов свиней на стадии метафазы II перед оплодотворением яйцеклеток.

Серия экспериментов по определению функциональной активности митохондрий в ооцитах коров и свиней с помощью флуоресцентного зонда MitoTracker Orange CMTMRos (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) в концентрации 200 nM дала возможность выявить достоверные различия в интенсивности флуоресценции ооцитов в зависимости от морфологии окружающих их клеток кумулюса и характеристики состояния ооплазмы. В наших исследованиях использована общепринятая классификация ооцит-кумулясных комплексов по состоянию кумулюса, она подразумевает деление на 4 класса (Jackowska M. et al., 2009). Класс I – ооцит с гомогенной ооплазмой, окруженный не менее 5 слоями компактного кумулюса, класс II – ооцит с гомогенной ооплазмой, характеризующийся меньшим количеством компактного кумулюса, III класс – ооцит с гетерогенной ооплазмой, окруженный более, чем 3 слоями кумулюса, IV – ооцит с ярко выраженной гетерогенной ооплазмой и отсутствием кумулюса (денудированный). В результате проведенных экспериментов достоверные различия в уровне интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos отмечены между ооцитами коров, относящимися к классам I, II и III, IV.

Эффективным подходом к оценке качества сред и систем для культивирования ооцитов коров и свиней оказалось измерение интенсивности флуоресценции в ооцитах после 24 часов культивирования. Так добавка 50 нг/мл пролактина совместно с клетками гранулезы (концентрация 10^6 клеток/мл) в среду культивирования ооцитов коров способствовала достоверному возрастанию интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos в ооцитах коров на стадии метафазы II. ($119,9 \pm 20,4$ μ a в контроле против $254,4 \pm 20,2$ μ a в опыте, $p < 0,001$). Анализ уровня интенсивности флуоресценции в ооцитах коров, созревших в TC-199 с 10 % фетальной бычьей сыворотки, клетками гранулезы и 10 нг/мл рекомбинантного бычьего соматотропина (опытная группа) выявил достоверные различия между этим показателем в контрольной (без соматотропина) и опытной группах ($309,2$ против $119,9$ μ a; $P < 0,01$). Следует отметить высокий выход эмбрионов из ооцитов коров с высокими показателями интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos ($40,0$ против $25,5$ %, $P < 0,05$). Уровень интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos в ооцитах свиней, прокультивированных совместно с оболочками фолликула ($366,2 \pm 15,1$ μ a, $P < 0,001$) и/или с фолликулярной жидкостью ($254,7 \pm 13,1$ μ a, $P < 0,001$) превышал таковой в контроле – без

фолликулярної жидкості і структурних елементів фолликула ($127,4 \pm 10,5 \mu\text{a}$, $P < 0.001$).

Таким образом, мониторинг транслокации и оценка функционального состояния митохондрий донорских ооцитов коров и свиней на основе измерения интенсивности флуоресценции флуорохромов (родамин 123, MitoTracker Orange CMTRos) – информативный критерий раннего прогнозирования потенций к формированию зрелой яйцеклетки и оценки качества сред для созревания ооцитов *in vitro*.

УДК 636.92.082:621.039.53+57.08

ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ КРОЛІВ *in vitro* З ВИКОРИСТАННЯМ НАНОМАТЕРІАЛІВ

А. Б. Зюзюн*

Інститут розведення і генетики тварин НААН

Одержання біологічно повноцінних ембріонів сільськогосподарських тварин поза організмом (*in vitro*), порівняно з їх формуванням в статевих шляхах самок, не завжди є на високому рівні, оскільки ембріональний розвиток залежить від взаємозв'язку ембріонів із статевими шляхами самки. Отже, ефективне одержання ембріонів ссавців *in vitro* неможливе без забезпечення оптимальних умов культивування та середовищ, які повинні задовольняти потреби клітин у поживних речовинах і відповідати особливостям метаболізму (Соу Р. et. al., 2005; Смилова Н. И. и др., 1999).

Наразі дослідження з удосконалення методик клонування, трансгенезу та одержання ембріональних стовбурових клітин проводяться переважно з використанням гамет кролів (M.R. Blanco et. al., 2011; Y. Kosenyuk, 2006.). Це пов'язано з тим, що цей вид сільськогосподарських тварин є зручним біологічним об'єктом внаслідок коротких репродуктивних циклів і багатоплідності. Тому існує необхідність в удосконаленні методик одержання дозрілих яйцеклітин кролів та формування ембріонів *in vitro* з метою їх використання для відпрацювання методів одержання клонованих та трансгенних особин.

Для удосконалення середовищ культивування поза організмом ембріонів кролів заслуговує на увагу високодисперсний кремнезем (ВДК), який є наноматеріалом з розміром частинок 4–40 нм і застосовується для підвищення життєздатності кріоконсервованих сперматозоїдів сільськогосподарських тварин та оптимізації середовищ формування ембріонів свиней *in vitro* (Чуйко А. А., 2003; Ковтун С. І., 2009). Наявність на поверхні ВДК певної кількості хімічно активних гідроксильних груп зумовлює моди-

* Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, професор, член-кореспондент НААН С.І. Ковтун