



УДК 636:57.089

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА ВОЗОБНОВЛЕНИЕ И ЗАВЕРШЕНИЕ МЕЙОЗА В ООЦИТАХ МЫШИ

Рецензенты: д.-тор б. наук, проф. Бугров А.Д.; канд. с.-х. наук Тихона Г.С.

А.А. Колесникова

Институт животноводства УААН

Исследованы мейотические преобразования в ооцитах мыши при их созревании in vitro после стимуляции ооцит-кумулюсных комплексов импульсным электрическим полем. Выявлено повышение уровня возобновления мейоза и уровня созревания до стадии метафазы II мейоза в ооцитах мыши при энергии импульсной обработки 1,29 мкДж; 1,91 мкДж и 2,58 мкДж. Стимуляция ооцит-кумулюсных комплексов электрическим импульсом с энергией 3,23 мкДж и 5,16 мкДж приводила к повреждению хромосомного материала ооцитов. Оптимальной энергией стимуляции возобновления и завершения мейоза в ооцитах мыши является энергия 1,91 мкДж.

Ключевые слова: ооцит, импульсная стимуляция, цитогенетический анализ, возобновление (реинициация) мейоза, метафаза II мейоза.

Для повышения эффективности созревания ооцитов млекопитающих в системе in vitro используются различные подходы. Один из них состоит во включении стимулирующих веществ (аминокислот, гормонов, факторов роста и т.п.) в состав питательных сред для созревания ооцитов in vitro [1-5]. Другим подходом для повышения уровня созревания in vitro ооцитов является осцилляторный метод, когда в условиях осциллирующего pH ооциты и эмбрионы развиваются лучше, чем в условиях постоянного pH [6]. Нами предложен метод стимуляции ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) импульсным полем, значительно повышающий уровень созревания ооцитов in vitro [7-8]. Мы предположили, что обработка ОКК импульсным полем может влиять, во-первых, на снятие паузы развития ооцитов на стадии диплотены мейоза, а во-вторых, на достижение ооцитами стадии метафазы II мейоза при их созревании in vitro.

Цель представленной работы состояла в изучении влияния импульсного электромагнитного поля на возобновление (реинициацию) мейоза в ооцитах мыши и на достижение ооцитами стадии метафазы II мейоза.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на ооцитах мыши. Ооциты в составе ОКК выделяли методом разрезания внешних стенок антральных фолликулов яичников в фосфатно-буферной среде Дюльбекко (ФБС Дюльбекко) с добавлением 10 % фетальной сыворотки телят (ФСТ). Для работы отбирали ОКК с многослойным компактным кумулюсом и равномерно гранулированной ооплазмой. Импульсная стимуляция выполнялась путем влияния на ОКК импульсного электрического поля в ФБС Дюльбекко с добавлением 10 % ФСТ по методике, подробно описанной ранее [7]. В зависимости от энергии импульса при стимуляции, было выделено 5 опытных групп (1,29 мкДж; 1,91 мкДж; 2,58 мкДж; 3,23 мкДж и 5,16 мкДж) и контрольная группа (0 мкДж). После стимуляции ОКК мыши культивировали в каплях среды Waymouth MB 752/1 с 15 % ФСТ и с добавлением пирувата натрия, бикарбоната натрия и гентамицина под минеральным маслом в течение 15-17 часов по общепринятой методике [9]. Для анализа эффективности импульсной стимуляции



созревания *in vitro* ооцитов нами использован метод цитогенетического анализа, предложенный Тарковским [10].

Результаты исследований. Цитогенетический анализ уровня реинициации мейоза в ооцитах мыши после импульсной стимуляции и созревания *in vitro* показал, что количество ооцитов на стадиях диплотены и последующих стадиях мейоза существенно отличалось для стимулированных ооцитов и ооцитов контрольной группы. В табл. 1 приведены данные, касающиеся уровня реинициации мейоза в импульсно стимулированных ооцитах мыши, анализируя которые установлена существенная раз-

**1. Уровень реинициации мейоза
в импульсно стимулированных
ооцитах мыши**

Энергия импульса, мкДж	n	Дипло- тена, n (%)	Реини- циация мейоза, n (%)
0 (контроль)	50	19 (38,0)	31 (62,0) ^a
1,29	74	21 (28,4)	53 (71,6)
1,91	33	3 (9,1)	30 (90,9) ^b
2,58	32	12 (37,5)	20 (62,5) ^a

Примечание. a:b – $p < 0,01$.

ница относительно реинициации ядерных преобразований в зависимости от энергии импульсной обработки в ооцитах, импульсно стимулированных к созреванию *in vitro*. Действие импульсного поля с энергией влияния 1,29 мкДж на ОКК сравнительно с контролем повысило на уровне тенденции уровень реинициации мейоза на 9,6%, а стимуляция энергией 2,58 мкДж на ОКК почти не изменила уровень созревания ооцитов по сравнению с контрольной группой (соответственно 62,0 % и 62,5 %). Отмечено, что влияние поля с суммарной энергией влияния 1,91 мкДж на ооцит оказалось достоверно более эффективным ($p < 0,01$) для снятия паузы развития в ооцитах, повысив уровень реинициации мейотических преобразований на 28,9 % сравнительно с контролем.

Таким образом, результаты цитогенетического анализа подтверждают наше предположение о том, что стимуляция ОКК при помощи импульсного электрического поля способствует повышению уровня реинициации ядерных преобразований при созревании ооцитов *in vitro*.

Для эффективного полноценного развития ооцитов в системе *in vitro* важна не только возможность реиницировать мейоз, но также и их способность завершить мейотические преобразования. Поэтому другим критерием результативности импульсной стимуляции созревания ооцитов млекопитающих *in vitro* является достижение ооцитами стадии метафазы II мейоза. Результаты созревания до стадии метафазы II импульсно стимулированных ооцитов мыши, оцененного по методу цитогенетического анализа, приведено в табл. 2.

Данные таблицы показывают, что уровень созревания группы ооцитов, стимулированных импульсом с энергией 1,29 мкДж на ОКК ($n=74$), был на 16,1 % выше уровня достижения ооцитами контрольной группы стадии метафазы II, где этот показатель составлял 46,0 % ($p < 0,1$). Для ооцитов мыши, стимулированных импульсом с энергией 1,91 мкДж на ОКК, уровень созревания ооцитов до стадии метафазы II был на 29,8 % ($p < 0,01$) выше, а при действии импульса с энергией 2,58 мкДж – на 0,9 % ($n=32$) выше уровня достижения ооцитами контрольной группы стадии метафазы II.



Таким образом, по критерию реинициации мейоза и критерию достижения ооцитами стадии метафазы II мейоза при помощи цитогенетического анализа установлено, что стимуляция ооцитов мышши импульсным электрическим полем с

энергиями импульса 1,29 мкДж; 1,91 мкДж и 2,58 мкДж повышает уровень созревания ооцитов мышши вне организма с оптимальными значениями этого показателя при энергии 1,91 мкДж на ОКК. Известно, что уровень реинициации мейоза в ооците возрастает в результате повышения концентрации внутриклеточных ионов кальция, которое достигается за счет их освобождения из внутриклеточных депо [11-12]. Возможно, электрический импульс стимулирует этот процесс в ОКК. На созревание же ооцита до стадии метафазы II в равной степени могут влиять как повышение концентрации ионов внутриклеточного кальция, так и дополнительное снабжение созревающего ооцита питательными веществами из среды и/или клеток кумулюса в результате повышения проницаемости цитоплазматических мембран в ОКК при воздействии электрического импульса [13-14].

Увеличение энергии импульса при стимуляции ОКК мышши до 3,23 мкДж и 5,16 мкДж приводило к повреждению хромосомного материала. В ооцитах, стимулированных импульсом с энергией 5,16 мкДж, обнаружено разрывы и слипание хромосом. Возможно, под влиянием именно этих повреждений уровень созревания импульсно стимулированных ооцитов *in vitro* снижался (по сравнению с контрольной группой), как в случае стимуляции импульсом с энергией 3,23 мкДж, или полностью подавлялся (при 5,16 мкДж). Из литературных источников нам известно, что вследствие влияния физических факторов, вызывающих непосредственное повреждение ДНК, может произойти остановка развития клетки с ее дальнейшим апоптозом [15]. В нашем случае действие серии электрических импульсов с избыточным суммарным значением энергии при стимуляции созревания ооцитов может быть именно таким физическим фактором.

Таким образом, подбор корректных значений энергии электрических импульсов при стимуляции созревания ооцитов является важным фактором, влияющим на жизнеспособность ооцитов и на эффективность стимуляции их развития.

Выводы:

1. Изучено действие импульсного электрического поля на мейотические преобразования в ооцитах мышши при их созревании *in vitro*. Установлено, что импульсная стимуляция ОКК при энергии импульса 1,29 мкДж; 1,91 мкДж и 2,58 мкДж повышает уровень реинициации мейоза и уровень достижения ооцитами стадии метафазы II мейоза при созревании ооцитов мышши *in vitro*. Энергия импульса 1,91 мкДж на ОКК является оптимальной для повышения уровня возобновления и завершения мейоза в ооцитах мышши, созревающих в системе *in vitro*.

2. Эффективность прогрессии до стадии метафазы II стимулированных импульсным полем ооцитов мышши

Энергия поля, мкДж	n	Диакинез, n (%)	MI – AI – TI, n (%)	MI, n (%)
0 (контроль)	50	2 (4,0)	6 (12,0)	23 (46,0) ^a
1,29	74	0 (0)	7 (9,5)	46 (62,1)
1,91	33	0 (0)	5 (15,2)	25 (75,8) ^b
2,58	32	0 (0)	5 (15,6)	15 (46,9)

Примечание. a:b – $p < 0,01$.



2. Повышение энергии импульсной стимуляции до 3,23 мкДж и 5,16 мкДж приводит к повреждению хромосомного материала ооцитов мыши.

Бібліографічний список

1. Кузьмина Т.И. Созревание ооцитов коров *in vitro* под влиянием мозгового нейритстимулирующего белка, используемого с целью повышения эффективности культивирования / Т.И. Кузьмина, В.П. Гончарова, Т.А. Гойло [и др.] // Сельскохозяйственная биология.–1995.–№2.– С.61-65.
2. Жернокльов Г.В. Вплив естрадіолу-17 β і факторів росту на ядерне і цитоплазматичне дозрівання ооцитів великої рогатої худоби поза організмом / Г.В. Жернокльов // НТБ, №75 ІТ УААН.–Х., 1998.– С.124-129.
3. Жернокльов Г.В. Вплив лейкемія-інгібуючого фактору росту на розвиток ембріонів корів, держаних *in vitro* / Г.В. Жернокльов // Сучасні методи репродукції сільськогосподарських тварин: стан і перспективи розвитку : Міжнар. наук.-практ. конф., 29-30 січ. 2008 р.: статті.– Х., 2008.– С.158-162.
4. Лобачова І.В. Вплив гормонів і трансформуючих факторів на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro* / І.В. Лобачова // Сучасні методи репродукції сільськогосподарських тварин: стан і перспективи розвитку : міжнар. наук.-практ. конф., 29-30 січ. 2008 р.: статті.– Х., 2008.– С.222-227.
5. Леткевич Л.Л. Влияние эндокринных факторов на процессы регуляции фолликуло- и эмбриогенеза у коров *in vitro* и *in vivo* / Л.Л. Леткевич, А.И. Ганджа, В.П. Симоненко [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси.– Жодино, 2006.– Т.41.– С.68-77.
6. Денисюк П.В. Вплив рН середовища на розвиток *in vitro* доімплантаційних ембріонів свині : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спеціальність 03.00.13 – фізіологія людини та тварин / П.В. Денисюк.– Х., 1997. – 25 с.
7. Шигимага В.О. Эффект импульсной стимуляции развитию ОКК миши *in vitro* / В.О. Шигимага, А.О. Колеснікова // Наук. Вісник ЛДАВМ ім. Гжицького.–Львів, 2005. –Т.7, №4. (27, част. 2).– С.172-176.
8. Колеснікова А.О. Імпульсна стимуляція розвитку ооцитів ссавців *in vitro* / А.О. Колеснікова, В.О. Шигимага // НТБ ІБТ та ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.– 2006.– Вип.7, №3, 4.– С.228-231.
9. Биология развития млекопитающих: Методы / [пер. с англ.; под ред. М. Манк].– М.: Мир.– 1990.– 406 с.
10. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A.K. Tarkowski // Cytogenetics.– 1966.– №5.– P.394-400.
11. Kaufman M. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte / M. Kaufman, S. Homa // J.Exp.Zool.– 1993.– V.265.– P.69-76.
12. Homa S. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte / S.Homa // Mol.Reprod.Dev.– 1995.– V.40.– P.122-134.
13. Pavlin M. Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension / M. Pavlin, M. Kanduser, M. Rebersek [et al.] // Biophys. J.– 2005.– V.88, №6.– P.4378-4390.
14. Ghartley-Tagoe E.B. Increased permeability of intestinal epithelial monolayers mediated by electroporation / E.B. Ghartley-Tagoe, J.S. Morgan, A.S. Neish [et al.] // J.Control Release.– 2005.– V.103, №1.– P.177-190.



15. Chiesa R. Extracellular calcium deprivation in astrocytes: regulation of mRNA expression and apoptosis / R. Chiesa, N. Angeretti, R. Del Bo [et al.] // J.Neurochem.— 1998.— V.70.— P.1474-1483.

ВПЛИВ ІМПУЛЬСНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ НА ВІДНОВЛЕННЯ ТА ЗАВЕРШЕННЯ МЕЙОЗУ В ООЦИТАХ МИШІ

Колеснікова А.О., Інститут тваринництва УААН

Досліджено мейотичні перетворення в ооцитах миші при їх дозріванні in vitro після стимуляції ооцит-кумулясних комплексів імпульсним електричним полем. Виявлено підвищення рівня відновлення мейозу та рівня дозрівання до стадії метафази II мейозу в ооцитах миші при енергії імпульсної обробки 1,29 мкДж; 1,91 мкДж і 2,58 мкДж. Стимуляція ооцит-кумулясних комплексів електричним імпульсом з енергією 3,23 мкДж та 5,16 мкДж приводила до пошкодження хромосомного матеріалу ооцитів. Оптимальною енергією стимуляції відновлення та завершення мейозу в ооцитах миші являється енергія 1,91 мкДж.

Ключові слова: ооцит, імпульсна стимуляція, цитогенетичний аналіз, відновлення (реініціація) мейозу, метафаза II мейозу.

EFFECT OF PULSE STIMULATION ON REINITIATION AND COMPLETION OF MEIOSIS IN MOUSE OOCYTES

Kolesnikova A.A., Institute of animal science UAAS

The meiosis changes in mouse oocytes during their maturation in vitro after pulse stimulation of oocyte-cumulus complexes by pulse electric field was investigated. The increase of rate of meiosis reinitiation and rate of progression oocytes to metaphase II stage of meiosis in mouse oocytes stimulated by pulse energy 1,29 μ J; 1,91 μ J and 2,58 μ J was found. Stimulation of oocytes-cumulus complexes by electric pulse with energy 3,23 μ J and 5,16 μ J resulted in damage of chromosome material. The optimal energy of stimulation of reinitiation and completion of meiosis in mouse oocytes is 1,91 μ J.

Key words: oocyte, pulse stimulation, cytogenetical analysis, reinitiation of meiosis, metaphase II of meiosis.