

СЕРЕДОВИЩЕ SOF ІНІЦІЮЄ КОМПАКТИЗАЦІЮ РАННІХ ЗАРОДКІВ ОВЕЦЬ *IN VITRO*

І.В. Лобачова *

Інститут тваринництва УААН

Досліджували вплив базового середовища на успішність процесу компактизації ранніх зародків овець, одержаних від спонтанно циклюючих або оброблених на суперовуляцію тварин. Середовище SOF, було придатним для підтримки подальшого розвитку і компактизації 25% 8-16-клітинних та 92,8% 16-32-клітинних зародків, тоді як середовища TC-199 та DMEM більшою мірою стимулювали поділ бластомерів, але не їх компактизацію.

вівці, зародок, бластомер, морула, суперовуляція, компактизація,

Методика одержання зародкових клітин поза організмом є однією з основ сучасної біотехнології. В останні роки досягнуто значних успіхів у розвитку цього методу. Проте, не дивлячись на одержання великої кількості "пробіркових" ягнят, певні питання цієї методики залишаються невирішеними. Зокрема, з ранніх морул, які одержують *in vitro*, лише третина розвивається до стадії поширеної бластоцисти.

Дослідження зародків різних видів тварин показали, що трансформація морул у бластоцисти відбувається лише за умови компактизації перших. У процесі компактизації зовнішні бластомери контактують між собою максимально можливою площиною цитоплазматичних мембран і створюють таким чином своєрідне ізольоване середовище для внутрішніх бластомерів. Додавання до середовища антитіл до увоморуліна (молекули міжклітинної адгезії) або до конексину 32 (структурного компонента контактів зі щелиною) попереджувало компактизацію морул і їх наступний перехід у бластоцисти [1]. Це свідчить про важливу роль міжклітинних контактів різних типів у процесі трансформації ранніх зародків.

Численні спостереження показали, що компактизація зародків *in vivo* має місце після подолання ними певної стадії розвитку. Можливе існування двох ймовірних факторів, які певною мірою пояснюють це явище. По-перше, після подолання зародками певної стадії розвитку ініціюється синтез структурних компонентів міжклітинних контактів, які, після вбудовування в цитоплазматичну мембрану бластомерів, і зумовлюють наступну компактизацію зародків. По-друге, компоненти міжклітинних контактів присутні на мембранах починаючи ще з одноклітинної стадії, але їх зближення ініціюється лише після зміни фізико-хімічного складу оточуючого середовища (наприклад, при просуванні зародків із яйцепроводу в порожнину рогу матки). Знання того, який механізм більшою мірою зумовлює успішність компактизації, важливе для розробки більш

* Науковий консультант - доктор сільськогосподарських наук Безуглий М.Д.

досконалих схем культивування *in vitro* зародків, і, як наслідок, підвищення ефективності методики одержання ранніх зародків поза організмом.

Відомо, що склад середовища мейотичного дозрівання ооцитів та наступного дорощування поза організмом певною мірою впливає на якість одержаних *in vitro* зародків, зокрема, певною мірою змінює спектр експресії генів у них. Наприклад, показана відсутність експресії гену, що кодує білок конексин 43 (Cx43) в *in vitro* зародках корів, хоча розвиток зародків до стадії бластоцисти при цьому продовжувався [2]. За цих умов більш придатними для вивчення причин, які зумовлюють компактизацію ранніх зародків, є зародки, що одержані *in vivo*.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу середовища на успішність процесу компактизації бластомерів у ранніх зародках овець, одержаних *in vivo*.

Методика досліджень. У дослідженнях використовували ранні зародки (≤ 32 бластомера) овець місцевих порід, які одержували на 3 або 5-у добу статевого циклу від спонтанно цикльованих або оброблених на суперовуляцію тварин. Після вилучення із яйцепроводів (8-12 бластомера) або з порожнини рогів матки у 2-відсотковий розчин фетальної сироватки теляти (ФС) на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко (ФСБД) зародки оцінювали за стадією розвитку і переносили у 500 мкл культурального середовища. Як базовий розчин культуральних середовищ використовували середовища ФСБД ("Blochem KG"), TC-199 ("Sigma", M2520), DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium, "Sigma", D7777), SOF (synthetic oviduct fluid), до яких додавали пеніцилін (0,1 мг/мл), стрептоміцин (0,05 мг/мл), ФС (2-20%, "Sigma", F2442), овечий сироватковий альбумін (3 мг/мл, ОАА, "Sigma", A3264) та скупчення або моношар клітин BRL (buffalo rat liver), гранульозні (ГК) і/або клітини слизової оболонки яйцепроводу (КСЯ) або рогів матки (КСМ). Середовище SOF складалось зі 107,7 mM NaCl, 7,16 mM KCl, 1,19 mM KH_2PO_4 , 1,71 mM CaCl_2 , 0,49 mM MgCl_2 , 25,07 mM NaHCO_3 , 3,3 mM лактату Na, 0,3 mM пирувату Na, 1% BME ("Sigma", B6766), 1% MEM ("Sigma", M7145). Культивування проводили при 38,5°C, 100-відсотковій вологості і 5-відсотковому вмісту CO_2 у повітрі. Оцінку стану зародків проводили кожні 24 години. За факт розвитку вважали формування чітко спостереженої бластопорожнини. Частину зародків після формування бластоцист піддавали заморожуванню.

Результати досліджень. У таблиці наведено результати культивування зародків залежно від складу культурального середовища і початкової стадії розвитку.

Використання 20-відсоткового розчину ФС на ФСБД як середовища культивування забезпечило наступний розвиток лише ранньої бластоцисти, тобто зародка, який вже пройшов стадію компактизації. Проте слід відмітити, що при короточасній витримці зародків у такому середовищі 16-32-бластомерні зародки набували ознак початкової компактизації, але зі збільшенням терміну культивування ці ознаки зникали, ініціювалось відокремлення бластомерів і їх руйнування.

Середовище TC-199 виявилось непридатним підтримати розвиток 8-12-бластомерних зародків, які одержували на 3-тю добу статевого циклу, навіть при додаванні до середовища соматичних клітин. При цьому мало місце певне збільшення кількості бластомерів, тобто ініціювався подальший поділ внутрішньоклітинної маси, але не її компактизація.

Після 3 діб культивування 16-32-бластомерних зародків у 10-відсотковому розчині ФС на середовищі DMEM до стадії бластоцисти розвинулося лише 14,26% зародків. При цьому відмічено потемніння внутрішньоклітинної маси, що ми пов'язуємо з інтенсифікацією асиміляційних процесів у зародках. Проте, після перенесення решти ембріонів (18 шт.) у 10-відсотковий розчин ФС на середовищі SOF ще 7 зародків продовжили свій розвиток.

Розвиток ранніх зародків залежно від типу культурального середовища і стадії розвитку

Базове середовище	Складові компоненти середовища	Початкова стадія розвитку зародка (бластомерів)	n	Розвинулось до стадії ранньої-поширеної бластоцисти %(n), після культивування протягом		
				1 доби	2 діб	3 діб
ФСБД	20% ФС	8-16	4	0,0	0,0	0,0
		16-32	3	0,0	0,0	0,0
		рання бластоциста	1	100 (1)	-	-
DMEM	10% ФС	8	1	0,0	0,0	0,0
		16-32	21	0,0	9,5 (2)	14,3 (3)
TC-199	5% естральної сироватки телиці + BRL	10-12	2	0,0	0,0	0,0
	2% ФС + ГК + КСЯ	8-12	3	0,0	0,0	0,0
SOF	10% ФС	8-16	1	0,0	0,0	0,0
		16-32	1	100 (1)	-	-
		пізня морула	1	100 (1)	-	-
	10% ФС + ОСА	8-16	2	0,0	0,0	0,0
		16-32	8	50,0 (4)	87,5 (7)	100 (8)
	20% ФС + ОСА	16-32	14	21,4 (3)	85,7 (12)	-
	10% ФС + КСМ	8-16	1	0,0	100 (1)	-
		16-32	6	100 (6)	-	-
	10% ФС + ОСА + КСМ	16-32	3	0,0	33,3 (1)	100 (3)

Найбільше стимулювало розвиток ранніх зародків овець середовище SOF, яке у загальному підсумку забезпечило формування бластоцист для 25,0% 8-16-клітинних зародків і для 92,8% 16-32-клітинних ембріонів. Дія SOF посилювалась з підвищенням вмісту ФС, а також при додаванні КСМ. Додавання сироваткового альбуміну певною мірою гальмувало розвиток культивованих зародків, а також зумовлювало деяке потемніння внутрішньоклітинної маси.

Візуальне спостереження розвитку зародків у середовищі SOF свідчить, що при цьому початку компактизації не передувало збільшення загальної кількості бластомерів. Середовище TC-199, навпаки, стимулювало поділ клітин внутрішньоклітинної маси, але не їх компактизацію. Наведене свідчить, що

середовище SOF сприяє утворенню міжклітинних контактів між бластомерами, що не притаманне середовищам TC-199 та DMEM. Що може бути причиною такої різниці дії середовищ? На відміну від SOF середовища TC-199 і DMEM насичені різноманітними біологічно активними речовинами (наприклад, фолієвою кислотою, хлоридом холіну, тіаміном та іншими), які, на нашу думку, певною мірою можуть впливати або на композиційний склад, або на фізико-хімічні характеристики мембран бластомерів і зумовлювати спостережений ефект. Деяким підтвердженням цього є відмічене раніше підвищення відсотка запліднення ооцитів при використанні як базового середовища інсемінації середовища SOF проти використання TC-199 [3].

Слід відмітити, що майже всі 16-32-бластомерні зародки вилучали з оброблених на суперовуляцію тварин на 5-ту добу після першого осіменіння. Дослідження зародків, які овулювали природно, показує, що на цей час вони розвиваються до стадії бластоцисти, чого у зародків від стимульованих тварин не відбувалось. На нашу думку, внутрішнє середовище рогів матки виявилось нездатним забезпечити відповідні умови для розвитку зародків. Проте, наступний розвиток цих зародків у середовищі SOF свідчить про повноцінність одержаних ембріонів.

Таким чином, середовище SOF стимулює впливало на процес компактизації ранніх зародків поза організмом. Така здатність SOF буде використана в подальших дослідженнях при оптимізації складу культуральних середовищ дорощування зародків, одержаних поза організмом.

Бібліографічний список

1. Lee S., Bilula N.B., Warner A.E. Gap junction assembly in the preimplantation mouse conceptus is independent of microtubules, microfilaments, cell flattening, and cytokinesis // Cell. – 1987. – V. 51. – P. 851-860.
2. Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J.W., Niemann H. Expression of gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo* // J. of Repr. and Fert. – 1996. – V. 108. – P. 17-24.
3. Лобачева И.В. Культивирование вне организма прижизненно извлеченных ооцитов овец // Зоотехния. - 2002. - № 1. - С. 28.

Изучали влияние базовой среды на успешность процесса компактизации ранних зародышей овец, полученных от спонтанно циклировавших или обработанных на суперовуляцию животных. Среда SOF оказалась приемлемой для поддержки дальнейшего развития и компактизации 25% 8-16-клеточных и 92,8% 16-32-клеточных зародышей, в то время как среды TC-199 и DMEM в большей мере стимулировали деление бластомеров, а не их компактизацию.

Influence of basic medium on success of compactization of early sheep embryo received from spontaneous cycled and treated for superovulation animals had being studied. SOF medium was acceptable for support of further development and compactization of 25% 8-16-cell and 92,8% 16-32-cell embryos, while TC-199 and DMEM mediums had stimulated the division of blastomeres but not their compactization.