

ВПЛИВ КУЛЬТУРАЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ТА ДОБАВКИ ФОЛІКУЛОСТИМУЛЮЮЧОГО ГОРМОНУ НА РІСТ РАННІХ ПРЕАНТРАЛЬНИХ ФОЛІКУЛІВ МИШІ *IN VITRO*

О.Ю. Ткаченко, Г.В. Жернокльов
Інститут тваринництва УААН

Преантральні фолікули є джерелом для отримання повноцінних ооцитів in vitro для наступного їх запліднення і отримання ембріонів високоцінних сільськогосподарських тварин. Розробка ефективних методів культивування фолікулів ранніх стадій дає змогу значно збільшити репродуктивний потенціал тварин. Але на даний момент довгострокове культивування фолікулів ссавців ускладнене відсутністю повної інформації щодо регуляторних механізмів ранніх етапів фолікулогенезу. При визначенні оптимального базового середовища для культивування ранніх преантральних фолікулів миші та встановлення ефективності дії добавок ФСГ (400 мОд/мл) на їх ріст, середовище Waymouth виявилось непридатним для культивування, тоді як при культивуванні у середовищі MEM з ФСГ спостерігався значний ріст фолікулів.

преантральні фолікули, *in vitro*, MEM, Waymouth, фолікулостимулюючий гормон

Перспективним напрямом біотехнології у сільському господарстві є розробка методів, що дають змогу збільшити репродуктивний потенціал високоцінних сільськогосподарських тварин. Одним з таких методів є культивування преантральних фолікулів з метою отримання дозрілих ооцитів *in vitro* для подальшого їх запліднення й одержання ембріонів для трансплантації.

На теперішній час проведено багато робіт з виділення та культивування преантральних фолікулів гризунів [1], свиней [2], корів [3] та людини [4]. Але отримати повноцінні ооцити, здатні до запліднення, вдалося лише з примордіальних та ранніх преантральних фолікулів мишей. Щодо інших видів тварин, то для них культивування фолікулів ще більш ускладнене не тільки через невивченість початкових етапів фолікулогенезу та факторів, що сприяють розвитку фолікулів, але й через значно довший термін культивування.

Для досягнення успіху у довгостроковому культивуванні преантральних фолікулів потрібно розробити розширену багатостадійну стратегію культивування, що створить систему забезпечення розвитку фолікулів, близьку до умов *in vivo*. Однією з найважливіших проблем є необхідність визначення складу живильного середовища, що забезпечить ріст та розвиток преантральних фолікулів поза організмом, тобто формування антральної порожнини, диференціацію соматичних клітин фолікулуата дозрівання ооцита всередині фолікула.

Відомо, що в організмі тварин процес розвитку фолікулів до антральної стадії та овуляція відбуваються під контролем багатьох аутокринних,

паракринних та ендокринних факторів, серед яких – фактори росту та гормони.

Більш важливими гонадотропінами є фолікулостимулюючий (ФСГ) та лютеїнізуючий (ЛГ) гормони. Причому, ФСГ має комплементарну дію з ЛГ, однак вплив ЛГ обмежений пізніми стадіями фолікулогенезу, тоді як ФСГ діє на весь процес [5]. Гонадотропіни вважаються регуляторами апоптозу, що є причиною дегенерації й атрезії фолікулів під час розвитку [6]. В яєчнику ФСГ стимулює поділ соматичних клітин фолікула, а також впливає на розвиток ооцита.

Треба брати до уваги, що необхідна концентрація гормонів та факторів росту, їхня комбінація, а також стадія розвитку фолікула, на якій потрібен вплив того чи іншого фактора і тривалість цього впливу, є різними для різних видів тварин. Однак використання фолікулів миші як модельного об'єкту дає можливість розробити загальну методику вилучення, культивування преантральних фолікулів і визначити можливі комбінації факторів росту та гормонів, що приймають участь у стимуляції процесів фолікулогенезу ссавців.

Метою роботи було порівняти вплив двох різних базових середовищ - Waymouth MB 752/1 та MEM - на ріст та розвиток ранніх преантральних фолікулів миші і визначити ефект від добавки ФСГ у середовища для культивування на ріст фолікулів.

Методика досліджень. Матеріалом досліджень були ранні преантральні фолікули мишей (гібридів CBAx57Bl) 12-14-денного віку. Цей вік було визначено оптимальним у попередніх дослідженнях за максимальною кількістю ранніх преантральних фолікулів, які можна вилучити з яєчника механічним методом. Після забою тварин вилучені в асептичних умовах яєчники мишей, відділені від сполучної тканини, вміщували у чашки Петрі з середовищем Дюльбекко. Фолікулів вилучали механічним методом, що дало змогу зберегти цілісність їх структури, за допомогою голок 26-30 калібру [7]. Для культивування відбирали інтактні рані преантральні фолікули, які мали округлу форму з видимим ооцитом, розташованим по центру, і середнім діаметром фолікулів 100-140 мкм, згідно з класифікацією Pincton H.M. та ін. [8]. У таких фолікулів наявна сформована зона пелюцида, 2-3 щільні шари клітин гранульози, ядро знаходиться на стадії зародкового пухирця.

Культивування проводили у чашках Петрі у співвідношенні 10 фолікулів на краплину середовища об'ємом 100 мкл під мінеральним маслом. Як базове середовище розвитку застосовували середовища Waymouth MB 752/1 або MEM з добавкою або без ФСГ у концентрації 400 мМО/мл. В усі середовища додавали також антибіотики (60 мкг/мл пеніциліну G та 1 мг/мл стрептоміцину). При визначенні впливу ФСГ, як контроль було використано результати культивування ранніх преантральних фолікулів у відповідному базовому середовищі.

Культивування проводили при температурі 37°C у газовому

середовищі з 5% CO₂ у повітрі. Кожні дві доби ½ об'єму середовища у краплині заміняли на свіже. Упродовж культивування кожні 48 годин під час заміни середовища морфологічно оцінювали динаміку росту фолікула за загальним діаметром та станом оточуючих клітин гранульози і ооцита. Загальний термін культивування становив 7 діб.

Кожний експеримент мав три повторності. Результати були опрацьовані статистично з використанням критерію Стьюдента.

Результати досліджень. Середній діаметр ранніх преантральних фолікулів, що залучалися до культивування, на момент вилучення дорівнював 120 мкм. При культивуванні у середовищах MEM та Waymouth без добавок гормону (контрольні групи) достовірного збільшення діаметра фолікулів протягом усього періоду культивування не спостерігалось у жодному з середовищ, однак зберігалася загальна тенденція щодо деякого росту протягом перших трьох діб, та наступного його пригнічення (табл.1).

1.Середній діаметр фолікулів упродовж культивування у середовищі Waymouth та MEM

Середовище культивування	Доба культивування					
	1	2	3	4	5	6
Waymouth	129±11,52	136±12,48	136±13,2	129±10,32	-	-
MEM	121±8,2	124±12,0	126±21,3	125±13,1	124±17,4	117±19,1

Слід також зазначити, що хоча при культивуванні у середовищі Waymouth помітне деяке початкове збільшення діаметра фолікулів порівняно з середовищем MEM, але після 4-ї доби переважна більшість фолікулів мала ознаки дегенеруючих, тому подальше культивування виявлялося неефективним. При цьому не спостерігалось помітної проліферації клітин гранульози, гранульозна оболонка фолікулів залишалася компактною.

Доповнення середовища Waymouth фолікулостимулюючим гормоном (рис.1) не впливало на ріст фолікулів: результат вірогідно не відрізнявся від контролю ні за кількісними показниками розміру фолікула, ні за якістю шарів гранульози.

Відомо, що середовище Waymouth широко використовується для культивування ооцитів, вилучених з антральних фолікулів мишей [9], однак отриманий результат свідчить про недоцільність використання цього середовища для культивування інтактних ранніх преантральних фолікулів, через те що зазначене середовище не сприяє їх росту.

Навпаки, добавка ФСГ вірогідно покращила ріст поза організмом ранніх преантральних фолікулів у середовищі MEM (рис.2).

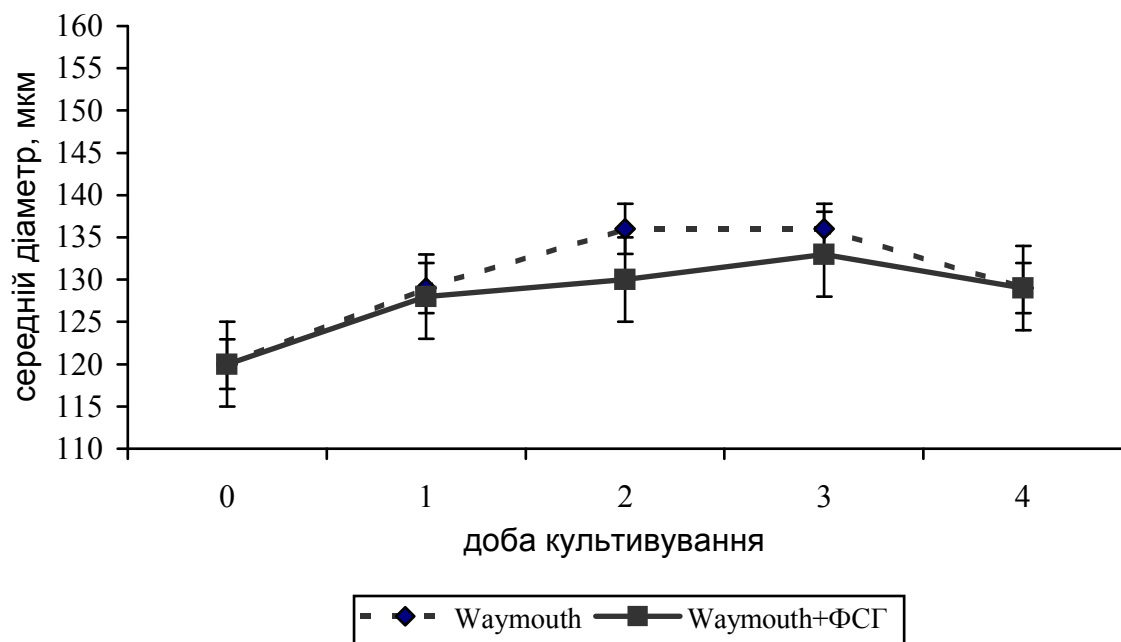


Рис.1 Вплив ФСГ на ріст фолікулів при культивуванні у середовищі Waymouth

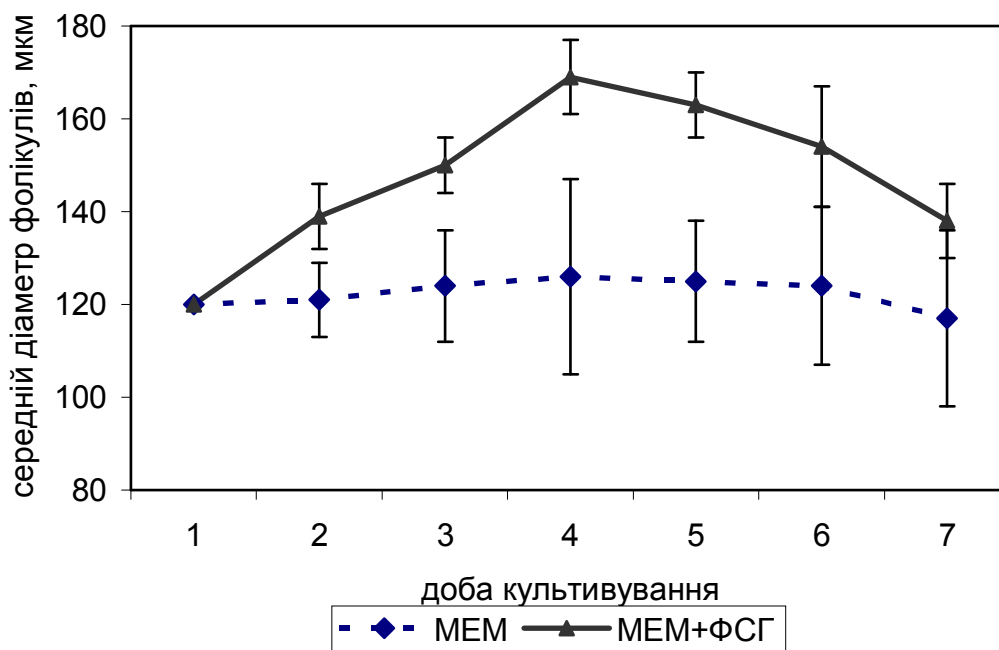


Рис.2 Вплив ФСГ на ріст фолікулів при культивуванні у середовищі MEM

Так, значне збільшення діаметра фолікулів спостерігалось вже через 24 години і становило в середньому 139 мкм порівняно з 120 мкм на початку культивування. Максимум росту фолікулів спостерігався на

четверту добу, коли середній діаметр фолікулів збільшився на 41% порівняно з початковим й дорівнював у середньому 169 мкм, що згідно з класифікацією, наведеною у Smitz and Cortvrindt [10] відповідає розміру пізніх антральних фолікулів. Ріст фолікулів супроводжувався помітною проліферацією клітин гранульози та розростанням гранульозного шару по поверхні чашки Петрі. Починаючи з 5 доби культивування відбувалися дегенеративні зміни у фолікулах, що характеризувалися зменшенням їх діаметра, ймовірно через втрату тургору клітин, а також початком дегенерації ооцитів. Ооцитів оцінювали після вилучення з фолікулів механічним методом. На 5 добу ооцити мали в основному прозору цитоплазму, але в деяких цитоплазма була гранульована, що свідчить про дегенеративні зміни. При культивуванні у середовищі MEM з ФСГ ооцити мали менш виражений ступінь дегенерації порівняно з контролем.

Таким чином, було виявлено, що результати культивування преантральних фолікулів у середовищах MEM та Waymouth без добавок є однаково незадовільними, тоді як доповнення MEM фолікулостимулюючим гормоном забезпечило їх ріст до пізньої антральної стадії.

Висновки:

1. Оптимальним базовим середовищем для культивування ранніх преантральних фолікулів мишей є середовище MEM.

2. Збагачення середовища MEM ФСГ у концентрації 400 мМО/мл сприяє росту фолікулів поза організмом, що характеризується наявністю проліферації клітин гранульози та збільшенням діаметра фолікулів.

3. Динаміка збільшення середнього розміру фолікулів визначається кривою з максимумом на 5 добу культивування і наступним пригніченням росту у зв'язку з дегенерацією фолікулів.

Бібліографічний список

1. Eppig J.J., Schroeder A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro /Biol Reprod – 1989. – Vol. 41. – p.268-276
2. Hirao Y., Nagai T., Kubo M., Miyano T., Miyake M., Kato S. In vitro growth and maturation of pig oocytes /J.Reprod Fertil.– 1994. – Vol.100. – p.333-339.
3. Gutierrez C.G., Ralph J.H., Telfer E.E., Wilmut I., Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro /Biol Reprod. – 2000. – Vol.62. –p.1322-1328.
4. Roy S.K., Treacy B.J., Isolation and long-term culture of human preantral follicles /Fertil Steril – 1993. – Vol.59. – p.783-790
5. Cecconi S. growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives /J. of reproduction and development. – Vol. 48, No.5. – 2002. – p.431-445.
6. Fortune J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles /Animal Reproduction science. – Vol.78. – 2003. – p.135-163.
7. Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. /Demeestere I., Delbaere A., Gervy C.,

- Van den Bergh M., Deverecker F., Englert Y. // Human Reproduction. – Vol.17, No.8. – 2002. – p.2152-2159.
8. Growth and maturation of oocytes in vitro./ Pincton H.M., Danfour M.A., Harris S.E., Chambers E.L., Huntriss J. // Reproduction Supplement.– 2003. – Vol.61. – p.445-462.
9. Bavister B.D., Rose-Hellekant T.A., Pinyopummintr T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media / Theriogenology. – Vol.37, №1. – p.127-145.
10. Smits J.E.J., Cortvrindt R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro / Reproduction. – Vol.123. – 2002. – p.185–202.

*ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ И ДОБАВКИ
ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА РОСТ РАННИХ
ПРЕАНТРАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ МЫШИ IN VITRO*

Е.Ю.Ткаченко, Г.В. Жерноклев

Институт животноводства УААН

Преантральные фолликулы представляют собой источник получения полноценных ооцитов in vitro для последующего их оплодотворения и получения эмбрионов высокоценных сельскохозяйственных животных. Разработка эффективных методов культивирования фолликулов ранних стадий дает возможность значительно повысить репродуктивный потенциал животных. Но в настоящее время долгосрочное культивирование фолликулов млекопитающих усложнено отсутствием полной информации о регуляторных механизмах ранних этапов фолликулогенеза. При определении оптимальной базовой среды для культивирования ранних преантральных фолликулов мыши и установлении эффективности добавок ФСГ (400 мЕд/мл) на их рост среда Waymouth оказалась непригодной для культивирования, тогда как при культивировании в среде MEM с ФСГ отмечался значительный рост фолликулов.

*EFFECT OF CULTURE MEDIUM AND FSH ON GROWTH OF MOUSE EARLY
PREANTRAL FOLLICLES IN VITRO*

E.Tkachenko, G.Zhernoklyov

Institute of animal science UAAS

Preantral follicles are the source for full oocyte production in vitro for their subsequent fertilization and embryos of high-valuable farm animals production. The development of effective methods of culture of follicles at different stages gives opportunity to increase the reproductive potential of animals. But nowadays a long-term culture of mammalian follicles is complicated because of the lack of information about early stages of folliculogenesis. During determination of an optimal basic medium for early mouse preantral follicle culture and definition of the efficiency of FSH addition in concentration 400 mIU/ml on their growth Waymouth medium appeared to be unfit for culture, while culture in MEM with FSH showed the significant follicle growth