

ВПЛИВ ГОРМОНІВ І ТРАНСФОРМУЮЧИХ ФАКТОРІВ НА МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ МИШЕЙ *IN VITRO*

І.В. Лобачова

Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова “Асканія-Нова” УААН
– Національний науковий селекційно-генетичний центр з вівчарства

*Вивчено залежність впливу фолікулостимулюючого (10 мкг/мл) і хоріонічного (10 мкг/мл) гормонів та трансформуючих чинників росту TGF- α (50 нг/мл) і TGF- β 1 (0,1 нг/мл) на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro* від наявності оточуючих кумулюсних клітин. Гонадотропні гормони сприяли зменшенню мейозстимулюючого впливу кумулюсу, реалізуючи свою дію через фолікулярні клітини. Трансформуючі фактори, впливаючи безпосередньо на внутрішньоклітинні структури ооцитів, обумовлювали вірогідне зростання дегенерації хромосом у оголених ооцитах. Кумулюсні клітини сприяли зниженню негативного впливу цих речовин на хромосомні перетворення.*

Ключові слова: миша, ооцит, культивування *in vitro*, гормони, TGF, мейоз, кумулюс.

Техніку *ovum pick-up* все більше застосовують при одержанні ооцитів від дрібних тварин, зокрема овець. Значним її недоліком є збільшення в загальній масі частки оголених ооцитів, які традиційно вилучають із дослідів, оскільки вважається що, що відсутність кумулюсу під час культивування не сприяє повноцінності дозрівання зародкових клітин. Разом з тим, наявність у цитоплазмі прижиттєво вилучених ооцитів чітко тестованого зародкового міхурця свідчить про “початкову” якість таких клітин. Тож існує ймовірність того, що при створенні певних умов культивування такі ооцити здатні розвинути до пізніх ембріональних стадій.

Позитивна роль кумулюсних клітин при дозріванні ооцитів показана у багатьох роботах [4, 6]. Загально визнаною є думка, що вони постачають до цитоплазми ооцита живильні і будівельні речовини, а також фактори, що сприяють формуванню здатності до запліднення і поділу на ранніх етапах. Разом з тим, досліді Straigmiller R.B. і Moor R.M. [5] і Xu X. зі співробіт. [7] свідчать про можливість повноцінного дозрівання оголених ооцитів при додаванні фолікулярних клітин до середовища, без їх безпосереднього контакту з ооцитами, а також ймовірність розробки такого культурального середовища, яке б забезпечувало повноцінне мейотичне дозрівання оголених ооцитів.

Удосконалення складу середовища мейотичного дозрівання неможливе без знання особливостей впливу певних біологічно активних речовин на ооцит і оточуючі фолікулярні клітини. До таких речовин належать, зокрема, фолікулостимулюючий і лютеїнізуючий гормони, які є важливою ланкою регуляторного механізму фолікуло- і оогенезу в організмі. Не останню роль в оогенезі приймають також трансформуючі фактори росту α і β [3], представниками останнього з яких є інгібіни і активіни. Для відповіді щодо доцільності їх використання при культивуванні *in vitro* необхідно визначити не тільки кількісні та якісні показники впливу цих речовин на ооцит, а також, чи реалізується їх вплив безпосередньо на його клітинні структури, чи опосереднюється оточуючими фолікулярними клітинами.

Метою нашого дослідження було визначення впливу ФСГ і ЛГ та трансформуючих факторів росту α і $\beta 1$ на кількісні показники мейотичного дозрівання ооцит-кумулясних комплексів різної морфології *in vitro*. Об'єктом досліджень обрано ооцити мишей, які зазвичай використовуються при визначенні загальних закономірностей фолікуло- та оогенезу ссавців.

Матеріали і методи досліджень. Досліди проведені на лабораторних мишах лінії C57BL і їх гібридах з СВА двох вікових груп – дорослих (3-4 місяці, на яєчниках присутні жовті і атретичні тіла) і ювенільних (5-7 тижнів, на яєчниках відсутня лютеїнова тканина). Тварин вбивали наркотизацією медичним ефіром. Після огляду яєчники подрібнювали лезом у середовищі TC-199 з HEPES (25 мМ) і гепарином (5 мкг/мл). Пошук і оцінку ооцитів проводили при 20-40-кратному збільшенні. Оцінені ооцит-кумулясні комплекси тричі промивали у свіжих краплях культурального середовища і переносили на мейотичне дозрівання по 5-10 штук на 0,1 мл середовища. Маніпуляції по отриманню, пошуку і оцінці ооцитів здійснювали при температурі 25-27 °С. Мейотичне дозрівання строком 17-18 годин проводили при 37 °С, 5%-ному вмісті вуглекислого газу у повітрі і 100%-ній вологості. Після закінчення культивування ооцити звільняли від клітин кумулюсу, оцінювали на наявність полярного тіла при збільшенні у 100-120 разів і тестували на стан хромосом за А. Tarkowsky (1966).

Для усунення фактору невизначеності дії сироватки як основне середовище мейотичного дозрівання використовували середовище SOF (NaCl – 107,7 мМ, KCl – 7,16 мМ, KHPO_4 – 1,19 мМ, CaCl_2 – 1,71 мМ, MgCl_2 – 0,49 мМ, NaHCO_3 – 25,07 мМ, суміш BME – 1%, суміш MEM – 1%) з додаванням бичачого сироваткового альбуміну (3 мг/мл, “Sigma”, A9647), глутаміну (0,1 мг/мл) і пірувату натрію (0,3 мг/мл, “Sigma”, P4562).

Для визначення впливу ФСГ і ХГ їх сумісно додавали до основного середовища у кількості – ФСГ (“Sigma”, F2293) - 10 мкг/мл, ХГ (“Sigma”, C1063) - 10 мкг/мл. Для визначення впливу трансформуючих факторів їх сумісно додавали до основного середовища у кількості – TGF- α (“Sigma”, T7924) - 50 нг/мл, TGF- $\beta 1$ (“Sigma”, T7039) – 0,1 нг/мл. Контролем у обох варіантах було основне середовище.

Визначення впливу біологічно активних речовин проведене у кількох повтореннях із використанням в одному циклі культивування ооцитів із яєчників не менш як двох мишей.

Результати дослідів опрацьовували статистично за М.А. Плохінським (1969).

Результати досліджень. Для визначення шляхів впливу гормонів і трансформуючих факторів виділені ооцити були поділені на дві окремі групи: до першої групи увійшли ооцит-кумулясні комплекси з багатошаровим кумулюсом та ооцити з 2-3-ма шарами кумулюсних клітин, до другої – повністю оголені ооцити і ооцити з залишковими кумулюсними клітинами. Невід’ємною умовою використання оголених ооцитів була наявність в їх цитоплазмі чітко тестованого зародкового міхурця. Культивування ооцитів обох груп здійснювали без додавання до середовища інших фолікулярних клітин.

Вивчення впливу ФСГ і ХГ проведено з використанням ооцитів від дорослих циклюючих тварин. Результати дослідів підтвердили відомий гальмівний вплив оточуючих кумулюсних клітин на мейотичні перетворення хромосом — $78,51 \pm 18,21$ % оголених ооцитів досягли стадії метафаза2 (M2) проти $60,91 \pm 8,06$ % ооцитів із кумулюсом ($p > 0,05$, $t_d = 0,88$) після культивування у контрольному середовищі (табл. 1). Відсутність стримуючого впливу кумулюсу

вела до прояву у хромосом схильності до вступу у наступну стадію мейотичну стадію – анафазу2.

1. Вплив ФСГ і ХГ на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro* (M±m)

Група ооцитів	Кількість повторень	n	Частка ооцитів на стадії, %			
			диплотена	діакінез–метафаза1	анафаза	тілофаза–метафаза2
Ооцити з кумулюсом						
Контрольна	3	25	29,7±14,47	9,39±6,44	0,0	60,91±8,06
Дослідна	3	31	15,93±2,68	2,56±3,14	0,0	81,47±3,85
Оголені ооцити						
Контрольна	3	20	4,76±5,83	16,67±20,41	0,0	78,57±18,21
Дослідна	3	21	3,7±4,54	16,67±10,21	0,0	79,63±5,67

Додавання ФСГ і ХГ до культурального середовища не впливало на оголені ооцити, проте достовірно збільшувало частку дозрілих клітин у групі ооцитів із кумулюсом ($p<0,05$, $t_d=2,30$). Цікаво, що як у контрольному, так і в дослідному середовищі не спостерігалось розрихлення кумулюсу, хоча зв'язки між ооцитами і оточуючими фолікулярними клітинами послаблялися, про що свідчила легкість відділення клітин при пипетуванні.

Таким чином, ФСГ і ХГ сприяли зниженню гальмівного впливу кумулюсу і при цьому реалізовували свою дію на ооцит через оточуючі фолікулярні клітини. Останнє добре проявлялося у простому середовищі, не збагаченому біологічно активними речовинами сироватки. Позитивним впливом кумулюсних клітин на ооцити можна вважати те, що в ооцитів із кумулюсом розмір сформованого полярного тіла варіював значно менше, ніж у оголених ооцитів. Це може свідчити про регулюючий вплив фолікулярних клітин на цитоплазму ооцитів.

На протилежність попередньому досліді додавання трансформуючих факторів TGF- α і TGF- β 1 достовірно погіршувало розвиток ооцитів із кумулюсом ($p>0,05$, $t_d=1,31$), а також, хоч і у меншій мірі, оголених ооцитів ($p>0,05$, $t_d=1,10$) (табл. 2). При цьому у ооцитів із кумулюсом спостерігалися слабкі ознаки розрідження кумулюсу, ступінь якого, за нашими спостереженнями, корегувала зі зменшенням частки ооцитів на стадії M2. Крім того, додавання трансформуючих факторів зумовило збільшення серед дозрілих до стадії M2 ооцитів частки клітин із дегенерацією хромосом як серед оголених ооцитів – $63,33\pm22,73$ проти $5,56\pm6,81$ ($p<0,05$, $t_d=2,43$), так і серед ооцитів із кумулюсом – $28,57\pm17,5$ проти $16,67\pm20,41$ ($p>0,05$, $t_d=0,44$) відповідно. При цьому дегенерація проявлялася порушенням нормального виду метафазних хромосом, їх розтягуванням або клам্পінгом, що було пов'язане, на нашу думку, з порушенням білкового остову хромосом.

Таким чином, трансформуючі фактори у зазначених концентраціях негативно впливали на мейотичне дозрівання ооцитів, реалізуючи свою дію безпосередньо на клітинні структури ооцитів. Кумулюсні клітини певною мірою, хоч і не повністю, нівелювали цей вплив.

Наші дані деякою мірою корегують із результатами деяких дослідників. Так, у роботі Chang W.Y. зі співавт. (1996) доповнення культурального

середовища сумішшю TGF β 1 і активіном А пригнічувало стероїдогенез гранульозними клітинами свині та ініціювало атрезію фолікулів.

2. Вплив трансформуючих факторів TGF- α і TGF- β 1 на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro* (M $\pm$ m)

Група ооцитів	Кількість повторень	n	Частка ооцитів на стадії, %				Частка ооцитів на стадії M2 з дегенерацією хромосом
			диплота	діакінез – метафаза1	анафаза	тілофаза-метафаза2	
Ооцити з кумулюсом							
Контрольна	3	27	8,33±10,21	6,85±5,07	0,0	84,82±11,06	16,67±20,41
Дослідна	3	29	7,69±9,42	20,88±4,24	5,93±3,46	65,83±9,34	28,57±17,5
Оголені ооцити							
Контрольна	3	22	20,0±6,12	0,0	0,0	80,0±6,12	5,56±6,81
Дослідна	3	22	14,02±1,97	14,02±1,97	0,0	71,96±3,94	63,33±22,73

У дослідях Feng P. зі співавторами [2] додавання до середовища TGF- β у концентрації 100 pM удвічі прискорювало швидкість мейозу в ооцитах щурів, але не впливало на кінцевий результат культивування. При цьому під вплив підпадали лише ооцити з кумулюсом.

Результати останнього досліді дають змогу пояснити знижену здатність оголених ооцитів до культивування поза організмом. Так, одним із поширених прийомів збільшення результативності культивування є додавання до середовища сироватки крові, яка містить у собі різноманітні речовини і, за звичай, стимулює дозрівання ооцитів. Одними з таких речовин можуть бути трансформуючі фактори росту. Як показують результати другого досліді, вони і подібні ним речовини можуть сприяти підвищенню дегенерації хромосомного матеріалу в оголених ооцитах і обумовлювати їх знижену здатність до подальшого розвитку. Так, у згаданій вже роботі Feng P. зі співавторами трансформуючий фактор росту вета пригнічував позитивний вплив епідермального фактору, який, за деякими даними, обумовлює підвищення повноцінності дозрівання ооцитів [2].

Використане нами просте середовище сприяло дозріванню майже 70-80 % оголених ооцитів. При цьому більшість хромосом таких ооцитів не мали ознак дегенерації і не різнилися за морфологією від хромосом ооцитів із кумулюсом. Отримані дані будуть враховані при доопрацюванні системи культивування прижиттєво вилучених ооцитів. Окремим питанням при цьому стоїть якість таких ооцитів, зокрема, їх здатності до запліднення та подолання ранніх ембріональних стадій, що стане предметом наступних досліджень.

У наведених (див. у табл. 1 і 2) даних звертає увагу невелика розбіжність між показниками дозрівання ооцитів після культивування у контрольному середовищі. Для кращого розуміння результати культивування були проаналізовані з урахуванням вікової належності донорів ооцитів (табл. 3).

3. Результати мейотичного дозрівання ооцитів мишей різних вікових груп *in vitro* у контрольному середовищі ($M \pm m$)

Вікова група	Кількість повторень	n	Частка ооцитів на стадії, %			
			диплотена	діакінез–метафаза1	анафаза	тілофаза–метафаза2
Ооцити з кумулюсом						
Дорослі	4	32	22,27± 12,9	10,62± 4,52	0,0	67,11± 8,95
Ювенільні	2	20	12,5± 17,68	3,13± 4,42	0,0	84,38± 22,1*
Оголені ооцити						
Дорослі	4	30	6,07± 4,17	12,5± 14,43	0,0	81,43± 12,58**
Ювенільні	2	12	25,0± 1,25	0,0	0,0	75,0± 3,75

Примітка. * - $P > 0,95$; ** - $P > 0,99$.

Результати показали, що при використанні ювенільних тварин кращу здатність до мейотичного дозрівання мали ооцити з кумулюсом, тоді як оголені ооцити краще дозрівали при одержанні їх від дорослих тварин. На нашу думку, це свідчить про більшу “початкову” підготовленість цитоплазми ооцитів у дорослих тварин, а також про більшу розвиненість у кумулюсних клітин цих ооцитів механізму гальмування мейозу. Тобто, у дорослих тварин процеси “фази великого росту” йдуть інтенсивніше, при цьому більша ступінь підготовленості цитоплазми вимагає наявності більш дієвого механізму стримання мейозу для попередження передчасного вступу хромосом ооцитів у мейотичні перетворення.

Висновки:

1. Гонадотропні гормони сприяють підвищенню частки мейотично зрілих клітин в групі ооцитів, оточених кумулюсом, реалізуючи свою дію через кумулюсні клітини.
2. Трансформуючі фактори TGF- α і TGF- β 1 у використаних концентраціях негативно впливають на рівень і якість мейотичного дозрівання ооцитів мишей *in vitro*, реалізуючу свою дію безпосередньо на внутрішньоклітинні структури ооцитів. Кумулюсні клітини певною мірою нівелюють негативну дію цих речовин.

Бібліографічний список

1. Chang W.Y., Shidaifat F., Uzumcu M., Lin Y.C. Effects of transforming growth factor-beta 1 and activin-A on *in vitro* porcine granulosa cells steroidogenesis // Theriogenology. – 1996. – V. 45, N8. – P. 1463-1472.
2. Feng P., Catt K.J., Knecht M. Transforming growth factor-beta stimulates meiotic maturation of the rat oocyte // Endocrinology. – 1988. - V. 122. - P. 181-186.
3. Jiengel J.L., McNatty K.P. The role of proteins of the transforming growth factors- β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development // Human Reproduction Update. – 2005. – V. 11, N 2. – P. 144-161.
4. Moor R., Dai Y. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro* // Reproduction (Supplement). – 2001. – V. 58. – P. 91-104.
5. Straigmiller R.B., Moor R.M. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle // Gamete Res. – 1984. – V. 9. – P. 221-229.

6. Taft R.A., Denegre J.M., Pendola F.L., Eppig J.J. Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap // Biol. Reprod. – 2002. – V. 67. – P. 953-960.

7. Xu X., Faillace L.S., Harding R.T., Foxcroft G.R., Hunter M.G. Evidence that Meishan and Large White hybrid preovulatory follicles may differentially affect oocyte in vitro maturation and fertilization // Anim. Reprod. Sci. – 1998. – V. 51. – P. 307-319.

ВЛИЯНИЕ МОРФОЛОГИИ, ГОРМОНОВ И ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ НА МЕЙОТИЧЕСКОЕ СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ МЫШЕЙ IN VITRO

И.В. Лобачева, ИЖ степных районов им.М.Ф.Иванова "Аскания Нова" УААН

Изучена зависимость влияния фолликулостимулирующего (10 мкг/мл) и хорионического (10 мкг/мл) гормонов и трансформирующих факторов роста TGF- α (50 нг/мл) и TGF- β 1 (0,1 нг/мл) на мейотическое созревание ооцитов мышей in vitro от наличия окружающих кумулюсных клеток. Гонадотропные гормоны способствовали уменьшению мейозотормозящего влияния кумулюса, реализуя свое действие через фолликулярные клетки. Трансформирующие факторы, влияя непосредственно на внутриклеточные структуры ооцитов, обуславливали достоверное увеличение дегенерации хромосом у обнаженных ооцитов. Кумулюсные клетки способствовали снижению негативного влияния этих веществ на хромосомные преобразования.

Ключевые слова: ооцит, культивирование in vitro, гормоны, TGF

MORPHOLOGICAL, TRANSFORMING FACTORS & HORMONES IMPACT ON IN-VITRO MICE OOZYTE RIPENING

I. Lobatcheva, the Institute of animal science of the steppe regions "Askania Nova",
UAAS

This article highlights the experimental research results on follicle-stimulating, growth-promoting hormone & TGF- α , TGF- β transforming growth factor impact on in-vitro mice oocyte ripening. FSH, GPH, TGF- α , TGF- β 1 administration equals 10mcg/ml, 50ng/ml, 1ng/ml respectively. The surrounding cumulus cells affect the preparation activity. Gonadotropic hormones impaired cumulus activity. Gonadotropic hormones activated via follicle cells. Transforming factors effected intracellular oocyte structures. Gonadotropic hormones boosted chromosome degradation at the unprotected oocytes. The test data were obtained by significance test. The negative substance impact on chromosome transformation was impaired due to the cumulus cell processes.

Key words: oocyte, in-vitro cultivation, hormones, TGF.