

ВПЛИВ ІНСУЛІНУ ТА ЕПІДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТУ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ КУЛЬТУРИ ФІДЕРНИХ КЛІТИН ТА ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ КОРІВ *IN VITRO*

С.В.Федорова., А.В. Мадіч
Інститут біології тварин УААН,

Представлено результати досліджень впливу інсуліну та епідермального фактора росту на дозрівання in vitro ооцитів корів. Описана як поодинокі, так і комплексна їх дія. Отримано високоефективну культуру фідерних клітин з підвищеною проліферативною здатністю, яка стимулює процеси ядерного і цитоплазматичного дозрівання ооцитів.

інсулін, епідермальний фактор росту, фідерні клітини, ооцити, культивування *in vitro*

Клітинні культури маткового походження, так звані фідерні клітини, мають підтримуючу дію на розвиток *in vitro* ооцитів та ембріонів тварин ранніх стадій [1]. Епітеліальні клітини яйцепроводів володіють доброю адгезійною здатністю і проліферативною властивістю. У культурі вони розташовуються безперервним тонким шаром і створюють на своїй поверхні „мікроклімат”, який забезпечує оптимальні умови для культивування ооцитів та ембріонів.

За умов *in vivo*, під час підготовки репродуктивних органів самки до прийняття зиготи в дію вступають складні регуляторні системи, що пов'язані з білковими ростовими факторами [8]. Це низькомолекулярні сполуки, які специфічно впливають на проліферацію клітин. У результаті взаємодії ростових факторів з клітинними рецепторами активується комплекс клітинних реакцій. Відомо, що ростові фактори здатні вибірково стимулювати синтез ДНК і поділ клітин. Наприклад, дія інсуліноподібного фактора росту (ІФР) у більшості тварин починає проявлятися ще на стадії незаплідненої яйцеклітини. Інсулін стимулює мітотичне дроблення недиференційованих ембріональних бластомерів, коли виявлено тільки мРНК, але не виявлено інших ростових факторів [3,6]. Доведено вплив інсуліну на синтез естрадіолу і стимуляцію ембріобласту до синтезу інших білків, які беруть участь у механізмі створення ембріонально-маткового сигналу [2]. Припускають, що ці білки є медіаторами впливу яйцепроводів на ембріональний розвиток. Епідермальний ростовий фактор (ЕФР) відіграє суттєву роль у розвитку ембріона, має високу мітогенну активність, забезпечує міжклітинну взаємодію, а значить і активує клітинну проліферацію [5].

Відомо, що присутність інсуліну в середовищі за умов *in vitro* збільшує кількість епітеліальних клітин яйцепроводів, що відповідають за синтез ЕФР [4, 7]. Таким чином, додавання обох чинників до середовища для дозрівання ооцитів корів *in vitro* на культурі фідерних клітин було доціль-

ним, а розробка високоефективного середовища фідерних клітин, здатного підтримувати ранній ембріональний розвиток – актуальною.

Мета наших досліджень – дослідити вплив інсуліну та ЕФР на проліферацію клітин епітелію яйцепроводів та дозрівання ооцитів корів *in vitro*.

Результати досліджень. Для одержання культури фідерних клітин використовували яйцепроводи корів. Тканину яйцепроводів механічно подрібнювали і дезагрегували з використанням 0,5%-го трипсину у співвідношенні 1:3, або продушували крізь платинове сито у скляному шприці. Клітинну суспензію центрифугували при 1000 об/хв. протягом 10 хвилин у середовищі ДМЕМ. Цикли трипсинізації повторювали декілька разів до повної дезагрегації тканин. Концентрацію клітин у 1 мл суспензії визначали підрахунком у камері Горяєва і вносили у культуральні чашки в кількості $2,0-2,5 \times 10^6$ клітин епітелію яйцепроводів та $1,8-1,9 \times 10^6$ клітин ендометрію на 1 мл середовища.

У дослідних групах до середовища ДМЕМ+ 10%ФСТ+10мкг/мл ФСТ-П + 1 мкг/мл естрадіолу-17 β + 40 мкг/мл гентаміцину + 0,1%-го розчину глюкози та Na-пірувату (основне середовище – ОС) додавали інсулін у кінцевій концентрації 20 мкг/мл (1-а дослідна група) та епідермальний ростовий фактор у кінцевій концентрації 10 нг/мл. Клітини 3-ої дослідної групи культивувались у середовищі, що містило як інсулін, так і ЕФР у вищевказаних дозах. Культивування клітин контрольної групи відбувалось в основному середовищі без додаткових чинників. Одержану суспензію розсівали в культуральні чашки контрольної і дослідних груп з 250 мкл середовища ДМЕМ з вище наведеними складниками, або без них. Початкова концентрація клітин у кожній культуральній чашці становила $0,675 \times 10^6$ на 1мл середовища.

У кожену культуральну чашку додавали 4-5 якісних ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК), які одержували аспірацією антральних фолікулів корів і культивували 24 години при $t = 38^\circ\text{C}$, 5% CO_2 та максимальній вологості у повітрі. Через 24 години ОКК корів морфологічно оцінювали за станом грануляції ооплазми, її поляризації при світлі, проліферативним ростом клітин кумулюсу, формою променистого вінця та видаляли з культури.

Інтенсивність проліферації клітин епітелію яйцепроводів оцінювали підрахунком кількості клітин у камері Горяєва. Фідерні клітини механічно відокремлювали від дна культуральних чашок, піддавали дезагрегації піпетуванням та розмножували, розподіляючи популяцію клітин однієї чашки на три. Кількість середовища доводили до 250 мкл. Через одну добу після пересіву (48 годин з початку культивування) підраховували клітини у камері Горяєва. Для подальшого спостереження залишали по одній культуральній чашці в кожній групі та продовжували культивування без підрахунку клітин з візуальною оцінкою формування фідерними клітинами моношару по групах. Дослід повторювали три рази для підтвердження отриманих даних.

Вимірювання рівня проліферації епітеліальних клітин у культуральному середовищі контрольної і трьох дослідних груп проводили шляхом підрахунку клітин в 1 об'ємі середовища впродовж 24 (1 пасаж) та 48 (2 пасажі) годин культивування, що було використано як індикатор специфічного ефекту інсуліну, ЕФР та сумісної дії двох чинників (таблиця).

1. Вплив інсуліну та ЕФР на проліферацію культури фідерних клітин та якість ОКК корів

Групи та їх характеристика *	Концентрація клітин (x10 ⁶ /мл)				Якісних ОКК, %
	1-й пасаж		2-й пасаж		
	початок	кінець	початок	кінець	
Контроль ОС	0,675	0,795 ±0,052	0,265	0,436 ±0,045	53,33
1-а група ОС+інсулін	0,675	1,336±0,177	0,445	1,793 ±0,005	86,67
2-а група ОС+ЕФР	0,675	0,830±0,073	0,277	0,521±0,051	66,67
3-а група ОС+інсулін+ЕФР	0,675	1,867±0,109	0,622	2,589±0,067	93,33

Примітка. *) кількість культуральних чашок у кожній групі, n=3

Під впливом інсуліну концентрація епітеліальних клітин у 1-й групі збільшилась у 2 рази через 24 години, а після пересіву – у 4 рази, з 0,675 відповідно до 1,336 $\pm$ 0,179 $\times 10^6$ та з 0,445 до 1,793 $\pm$ 0,005 $\times 10^6$.

Аналіз дії ЕФР виявив, що додавання його до середовища суттєво не впливає на збільшення кількості клітин. Після першого пересіву клітинна популяція 2-ої групи зросла у 1,2 раза, а після другого – лише у 1,8 раза. Найкращий ефект стимуляції клітинної проліферації спостерігали за умов комплексного впливу обох чинників. Вже на протязі перших 24-х годин кількість клітин зросла у 2,8 раза, а через 48 годин культивування – у 4,2 раза, до 1,867 $\pm$ 0,109 $\times 10^6$ клітин на 1 мл середовища при 1-му пасажі і до 2,589 $\pm$ 0,067 $\times 10^6$ у 2-му пасажі. Спостерігалось значне покращення морфології ОКК. Так, якщо в контрольній групі було одержано 53,33% якісних ОКК, то у 1-й та 3-й дослідних групах під впливом інсуліну і за умов сумісної дії чинників – 86,67 і 93,53% якісних ооцитів корів відповідно (рисунок).



Ооцити цих груп відрізнялись чіткою грануляцією ооплазми, інтенсивним блиском кулюосу при поляризації світла, максимальним рівнем експансії клітин променистого вінця.

Рис. Стимуляція клітинної проліферації епітеліальних клітин і дозрівання ооцитів корів *in vitro* за умов сумісної дії інсуліну та EGF

Сумісна кумулятивна активуюча дія інсуліну та епідермального ростового фактора на ріст фідерних клітин може бути пояснена стимуляцією клітинного метаболізму, частковим зняттям стресу, пов'язаного із перебування ооцитів у культуральному середовищі поза живим організмом та одночасною активацією ЕФР-системи, контроль якою є вирішальним для дозрівання ооцитів як *in vivo*, так *in vitro*.

Висновки. Одержано культуру фідерних клітин з високим рівнем проліферації та достатньою функціональністю, про що свідчать результати підрахунків концентрації клітин та морфологічної оцінки якості ОКК корів. Одночасне використання інсуліну та епідермального фактору росту дає змогу прискорити утворення клітинного субстрату, для дозрівання та запліднення ооцитів, що є важливим при застосуванні технологій *in vitro*. Крім цього це дає можливість відмовитись у деяких випадках від використання сироваткових середовищ, що зменшує ризик контамінації мікроорганізмами середовищ для культивування ооцитів та ембріонів.

Бібліографічний список

- 1.Derrar N., Price S., Sirard N. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. // *Theriogenology*.-2000.-54(4).-P.587-598
- 2.Guler A., Poulin N., Mermillod P. Effect of growth factors EGF and IGF-I and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. // *Theriogenology*.-2000.-54(2).-P.209-218
- 3.Lackey B., Gray D., Henricks N. Physiological basis for use on IGFs in reproductive application: A Review // *Theriogenology*.-2000.-53(5).-P.1147-1156
- 4.Palma G.A., Brem G. Effect of growth factors IGF-I, TGF- α , EGF and PDGF on development of in vitro produced bovine blastocysts.// *Theriogenology*.-1995.-43(1).-P.291-305
- 5.Sirisatein S., Hernandez-Fonseca H. Influence of epidermal growth factor and insulin on bovine blastocysts development in vitro. // *Animal reproduction science*.-2003.-77(1-2).-P.21-32
- 6.Yang P., Roy S. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster prenatal follicles in vitro. // *Biology of reproduction*.- 2001.-65.-P.847-854
- 7.Thibodeaux J.K., Myers H.W., White K.L. Effect of a serum extender containing growth factors on development of IVM and IVF bovine embryos. // *Theriogenology* .-1995.- 44(3). -P.423-432
- 8.Monniaux D., Monget P., Besnard N. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants // *Theriogenology*.-1997.- 47(1).-P. 3-12

Представлены результаты исследований влияния инсулина и эпидермального фактора роста на дозревание in vitro ооцитов коров. Описано как индивидуальное, так и комплексное их действие. Получена высокоэффективная культура фидерных клеток с повышенными пролиферативными свойствами, которая стимулирует процессы ядерного и цитоплазматического дозревания ооцитов.

Demonstrated results influence of insulin and epidermal growth factor on oocyte maturation in vitro in bovine. Make in inventory as individual and combined action of their. Obtained high-

УДК.636.2.034.082.35.

РІСТ І РОЗВИТОК ТЕЛИЦЬ ЗАХІДНОГО ВНУТРІШНЬОПОРОДНОГО ТИПУ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ

Є.І.Федорович, Й.З.Сірацький

Інститут розведення і генетики тварин УААН

Викладено результати досліджень росту і розвитку телиць західного внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи.

телиці, ріст, розвиток, жива маса, швидкість росту, коефіцієнти росту

Жива маса тварин – об’єктивний показник росту організму в цілому [1–7]. У біологічному розумінні ріст як процес збільшення загальної маси клітин організму, його тканин і органів у часі може бути визначений на підставі зміни живої маси тварин з віком. Найважливішими показниками росту тварин є їх жива маса.

Метою наших досліджень було вивчити вікову динаміку живої маси новоствореного внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи.

Методика досліджень. Дослідження проведено на телицях новоствореного західного внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи в племзаводах Львівської області. Живу масу визначали шляхом щомісячного зважування телиць. Середньодобові прирости вираховували на підставі щомісячних зважувань тварин. Коефіцієнт кратності збільшення живої маси визначали шляхом ділення живої маси по кожному місячному відрізку на живу масу новонароджених телиць. Коефіцієнт приросту живої маси вираховували за формулою:

$$K=[(B_2-B_1) / B_1]*100\%,$$

де B_1 – жива маса на початку вікового періоду; B_2 – жива маса на кінець вікового періоду.

Відносну швидкість росту визначали за формулою:

$$П_3=[(B_2-B_1) / 0,5*(B_2+B_1)]*100, \%$$

Результати досліджень. Результати наших досліджень показують, що телички західного внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи мали високі показники живої маси (таблиця). Найбільшу живу масу новонароджені телиці мали у племзаводах “Радехівський” і “Селекціонер”, а найменшу – у племзаводі “Правда”. У 3-міс віці різниця за живою масою між теличками племзаводів “Селекціонер” і “Радехів-