

ОЦЕНКА СТИМУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ИМПУЛЬСНОГО ПОЛЯ И ФЕТАЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ ТЕЛЕНКА НА РАЗВИТИЕ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ

А.А. Колесникова, В.А. Шигимага
Институт животноводства УААН

В статье изложены результаты исследования развития in vitro ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) мыши и крупного рогатого скота после их стимуляции импульсным электрическим полем (ИЭП). Обнаружено повышение эффективности стимуляции созревания in vitro ооцитов при сочетании влияния ИЭП и факторов фетальной сыворотки теленка (ФСТ). Предложен объективный способ определения уровня экспансии кумулюса во время культивирования ОКК in vitro путем измерения площади кумулюса.

Ключевые слова: ооцит-кумулюсный комплекс, ооцит, кумулюс, созревание in vitro, фетальная сыворотка теленка, импульсное электрическое поле, экспансия кумулюса.

Созревание ооцитов млекопитающих in vitro в настоящее время представляет собой базовый метод получения биологических объектов для клеточных репродуктивных технологий (клонирования, трансгенеза и т.п.) и для вспомогательной репродукции высокоценных животных. Известно, что результативность созревания ооцита зависит от взаимодействия всех клеток в ооцит-кумулюсных комплексах (ОКК). Предложенный нами способ стимуляции развития ОКК in vitro при помощи импульсного электрического поля [1] повышает уровень созревания ооцитов, оказывая положительное влияние, как на ооцит, так и на клетки кумулюса. Дополнительно к импульсной стимуляции мы не применяли ни гормональных, ни ростовых добавок к среде, в которой проводили стимуляцию. Подобные исследования при культивировании фидерных клеток яйцевода крупного рогатого скота проводили с целью найти способ обеспечения пролиферации клеток в культуре in vitro аналогичный действию ростовых факторов [2].

Поскольку процесс созревания ооцита in vitro требователен к физико-химическим условиям и, как правило, нуждается в добавках определенных гормонов и ростовых факторов к питательным средам, мы предположили, что дополнение среды для импульсной стимуляции ОКК фетальной сывороткой теленка будет повышать эффективность стимуляции. Кроме того, в наших ранних работах морфологические признаки развития in vitro стимулированных ОКК наблюдали и определяли только визуально. В этой работе мы предлагаем простой инструментальный способ определения стимулирующего влияния на ОКК путем измерения площади кумулюса в ОКК.

Целью настоящей работы было исследование и количественная оценка комплексного стимулирующего влияния импульсного электрического поля и фетальной сыворотки теленка на развитие ооцит-кумулюсных комплексов in vitro.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на ооцитах мыши и крупного рогатого скота. Ооциты в составе ОКК выделяли методом разрезания внешних стенок антральных фолликулов яичников в фосфатно-буферной среде Дюльбекко (ФБС Дюльбекко "Sigma") с добавлением

или без добавления 10 % фетальной сыворотки телят (ФСТ, “Sigma”). Для дальнейшей работы отбирали ОКК только хорошего и отличного качества с многослойным компактным кумулюсом и равномерно гранулированной ооплазмой. Стимуляция выполнялась путем влияния на ОКК импульсного электрического поля в ФБС Дюльбекко с добавлением или без добавления 10 % ФСТ. После стимуляции ОКК мыши культивировали индивидуально в каплях среды Waymouth MB 752/1 с 15 % ФСТ и с добавлением пирувата натрия (“Sigma”), бикарбоната натрия (“Sigma”) и гентамицина под минеральным маслом в течение 15-17 часов по общепринятой методике [3]. Ооциты крупного рогатого скота культивировали в каплях среды TCM-199 с теми же добавками в течение 24 часов. Для оценки созревания ооцитов использовали анализ по морфологическим признакам и цитогенетический анализ по методу Тарковского [4]. Импульсную стимуляцию ОКК проводили электрическим полем напряженностью 1,3-1,4 кВ/см с помощью аппаратуры и по методике, подробно описанной ранее [1].

Для наблюдения и видеозаписи ооцитов использовали видеокамеру, вмонтированную нами в микроскоп AXIOVERT-35 (фирма OPTON, Германия), видеомагнитофон и монитор. Видеоизображения оцифровывали при помощи программы видеозахвата ATI Video in 6.3 и видеоадаптера ATI Rage Fury Pro/Xpert 2000 Pro на компьютере Pentium II-350 МГц.

Критерием уровня экспансии клеток кумулюса использовали площадь кумулюса. Для объективной оценки экспансии кумулюса нами использована стандартная процедура, выполняемая с растровыми изображениями криволинейных объектов при помощи инженерно-конструкторской программы AutoCAD 2004.0.0. Посредством этой программы выполнено измерение площади кумулюса каждого ОКК сразу после выделения из яичника и после индивидуального культивирования.

Результаты исследований. Ранее нами обнаружено стимулирующее влияние ИЭП на созревание ОКК *in vitro* без добавления ростовых факторов в среду для стимуляции [1]. В этих исследованиях было установлено, что действие импульсного электрического поля с суммарной энергией от 1,4 до 2,8 мкДж на ОКК повышает уровень созревания ооцитов мыши до стадии метафазы II в среднем на 17,3 %.

В последующих поисковых экспериментах было обнаружено, что для ооцитов крупного рогатого скота, по-видимому, стимулирующие энергии лежат в другом диапазоне значений, поскольку по предварительным данным импульсное электрическое поле с энергией 2,2 мкДж на ОКК имело наиболее эффективное влияние на уровень созревания этих ооцитов.

В дальнейших исследованиях нами было обнаружено, что ФСТ, содержащая необходимые для развития ооцита ростовые факторы, усиливает стимулирующее действие ИЭП на созревание ОКК, (рис.1). Так, результативность достижения ооцитами мыши метафазы II при стимуляции импульсным полем при отсутствии ФСТ составила 46,0 % (n=50), что на 7,5 % превысило уровень созревания в группе ооцитов, которые культивировались с ФСТ без импульсной стимуляции (n=52, $p<0,1$). Комплексное влияние импульсного поля и компонентов ФСТ на ооциты мыши создало наилучшие условия для завершения мейотических преобразований. Эффективность созревания ооцитов этой группы до стадии метафазы II составила 62,1% (n=74, $p<0,01$).

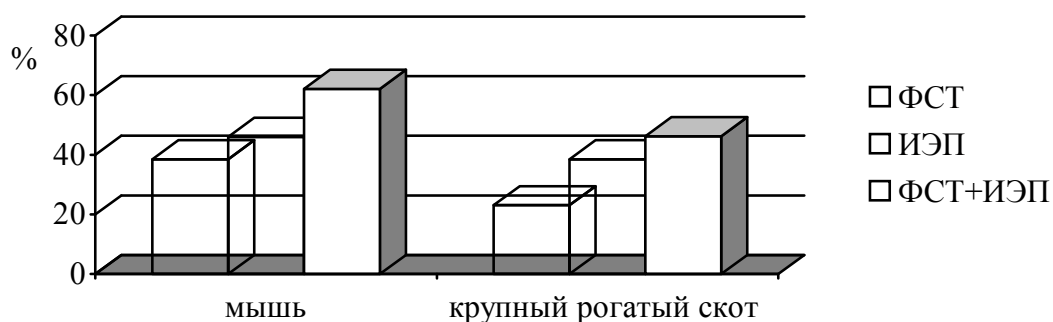


Рис. 1. Влияние ФСТ и ИЭП на созревание *in vitro* ооцит-кумулюсных комплексов мыши и крупного рогатого скота.

Для ооцитов крупного рогатого скота наблюдали подобную зависимость результативности импульсной стимуляции созревания от наличия ФСТ в среде для стимуляции, (рис.1). В поисковом эксперименте (n=13) определено, что, несмотря на отсутствие ФСТ, действие ИЭП на 15,4 % повысило уровень созревания ооцитов крупного рогатого скота по сравнению с группой ооцитов, подвергавшихся действию ФСТ без стимуляции ИЭП, уровень созревания в которой составил 23,1 %. При сочетании влияния ФСТ и импульсного поля уровень созревания ооцитов повысился на 7,7 %, относительно группы ооцитов, импульсно стимулированных без ФСТ (38,5 %). Следовательно, стимуляция созревания *in vitro* ооцитов мыши и крупного рогатого скота является более эффективной при сочетании влияния факторов ФСТ и импульсного электрического поля.

Установлено, что кроме влияния на достижение ооцитами стадии метафазы II в условиях *in vitro*, наличие ФСТ в среде при импульсном воздействии на ОКК имело также стимулирующий эффект и на уровень экспансии клеток кумулюса. Отличия в уровне экспансии кумулюса были отмечены нами ранее визуально [1, 5], а в настоящем исследовании зафиксированы полуавтоматически - при помощи программы AutoCAD, которая позволяет вычислять площадь произвольно обведенных криволинейных контуров.

С этой целью оцифрованное растровое изображение ОКК, (рис. 2), помещали на рабочий лист в окне этой программы и путем кусочно-линейного передвижения мышью с фиксацией промежуточных точек совершали плавную обводку контура клетки, (рис. 3). Для повышения точности измерения обводку контура площади проводили трижды с усреднением значения полученных результатов.

Далее, выполняя стандартную программную команду, получали список координат всех введенных точек, периметр и площадь очерченных контуров, а также служебную программную информацию. Из этого набора данных извлекали только значения площади ОКК и ооцита, причем единицы измерения выбирали заранее в предустановках. В целях прямой совместимости с другими программами для обработки растровых изображений без пересчета удобно выбрать в качестве единицы измерения пиксель, особенно для определения относительных изменений площади.

Предложенным способом удалось установить, например, что после культивирования одного из стимулированных ОКК в результате совместного действия ИЭП и ФСТ площадь кумулюса относительно исходной величины увеличилась в 4,5 раза, в то время как для одного из ооцитов в контроле относительное изменение площади ОКК составило 2,1 раза, (рис. 3, 4).

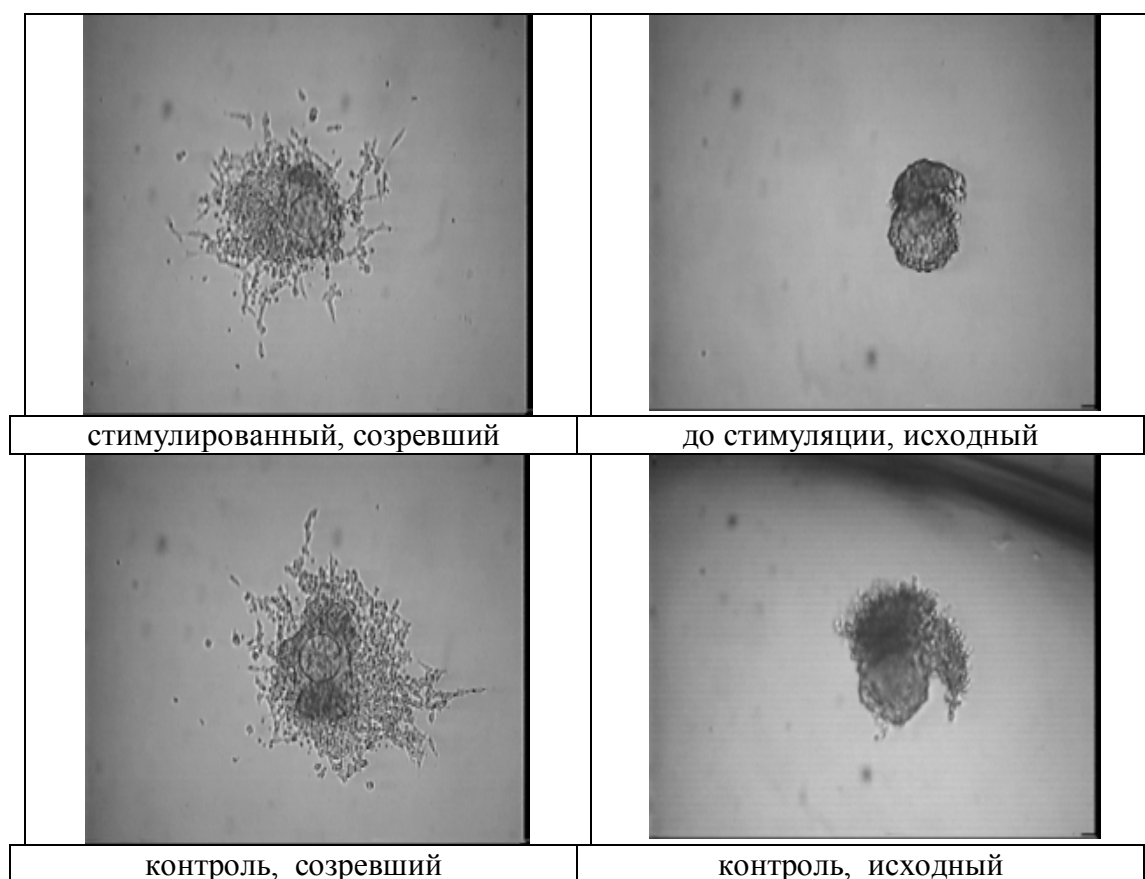
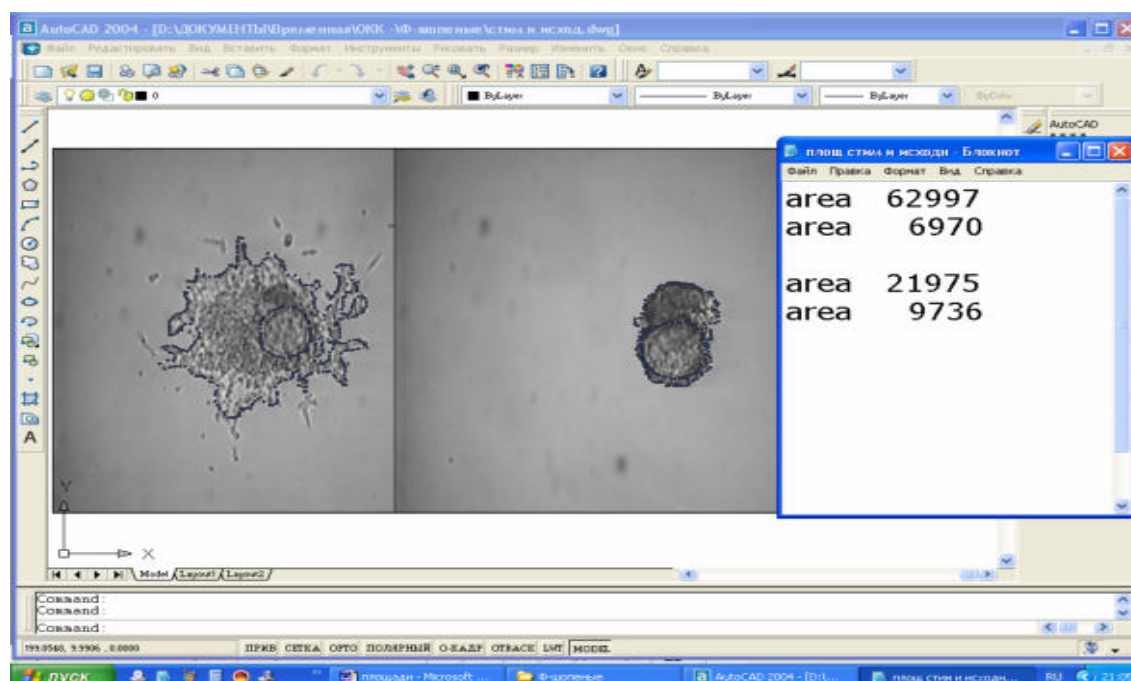
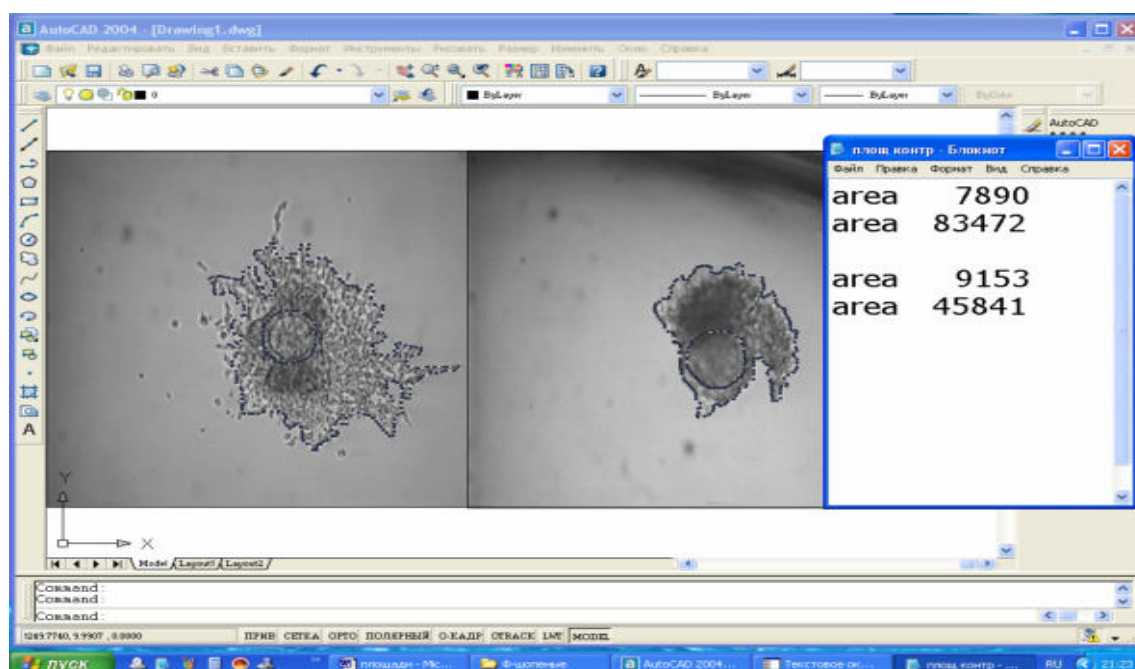


Рис. 2. Изображение ОКК мыши (x150).



Стимулированный ОКК



Контрольный ОКК

Рис. 3. Окна программы AutoCAD с обведенными изображениями ОКК и вычисленными значениями площадей внешнего и внутреннего контуров.

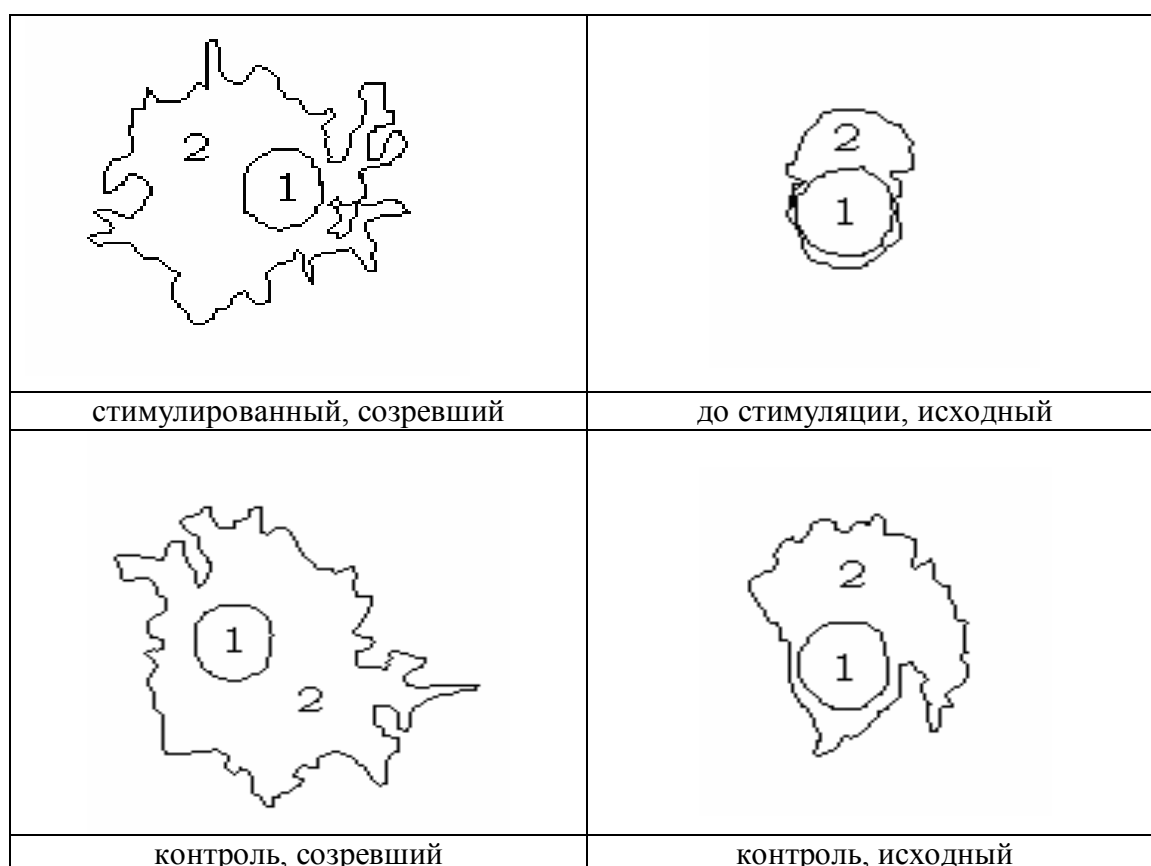


Рис. 4. Изображения контуров ОКК, полученных с помощью программы AutoCAD : 1 – ооцит, 2 - кумулюс.

Для объяснения полученных результатов предложен следующий механизм. Мы полагаем, что ИЭП действует двояко. Во-первых, происходит усиление процесса реинициации ядерных преобразований в ооците, находящемся в состоянии паузы развития на стадии диплотены мейоза. Во-вторых, в момент импульсной электропорации цитоплазматических мембран клеток ооцит-кумулюсного комплекса улучшается снабжение ооцита и клеток кумулюса веществами из питательной среды в результате повышения проницаемости цитоплазматических мембран клеток для питательных веществ (так называемый эффект электропермеабилзации) [6-7]. Вероятно, факторы сыворотки, попадая внутрь клеток ОКК через их электропермеабилзованные мембраны, оказывают стимулирующее влияние на созревание ооцита и экспансию кумулюса.

Выводы:

1. Стимуляция созревания *in vitro* ооцитов мыши и крупного рогатого скота является более эффективной при сочетании влияния факторов ФСТ и импульсного электрического поля.
2. Факторы фетальной сыворотки теленка оказывают стимулирующее влияние на созревание ооцита и экспансию кумулюса, предположительно, вследствие электропермеабилзации цитоплазматических мембран клеток ОКК при действии ИЭП.
3. Выполняя стандартные программные процедуры AutoCAD, можно получить значения площади экспансии кумулюса ОКК, а также определить их изменения при разных стимулирующих воздействиях.

Авторы выражают большую благодарность к.т.н. Пенцову В.М. за идею использования программы AutoCAD для вычисления площади клеток.

Библиографический список

1. Шигимага В.О., Колесникова А.О. Эффект імпульсної стимуляції розвитку ОКК миші *in vitro* // Наук. Вісник ЛДАВМ ім. Гжицького.-Львів, 2005.-Т.7, №4. (27, Ч. 2).-С.172-176.
2. Гевкан І.І., Мадіч А.В., Штапенко О.В., Сливчук Ю.І., Федорова С.В., Шаран У.Р. Вплив електромагнітного поля надвисокої частоти на інтенсивність проліферації фідернихклітин //НТБ Інституту біології тварин та ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок .- 2005. – Вип.6, №.2.- С.45-48.
3. Биология развития млекопитающих. Методы /Пер. с англ. под ред. М. Манк.- Москва: Мир. - 1990. - 406 с.
4. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetics.-1966.-№5.-Р. 394-400.
5. Колесникова А.А., Шигимага В.А. Стимуляция развития ооцитов млекопитающих *in vitro* // Материалы. 6-й междунар. науч. конф. “Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных”, Дубровицы, 19-20 декабря 2006. – С.85-87.
6. Pavlin M., Kanduser M., Rebersek M., Pucihar G., Hart F.X., Magjarevic R., Miklavcic D. Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension // Biophys J. – 2005. – 88(6). – P.4378-4390.
7. Ghartley-Tagoe E.B., Morgan J.S., Neish A.S., Prausnitz M.R. Increased permeability of intestinal epithelial monolayers mediated by electroporation // J Control Release. – 2005. – 103(1). – P.177-190.

ОЦІНКА СТИМУЛЮЮЧОГО ВПЛИВУ ІМПУЛЬСНОГО ПОЛЯ І ФЕТАЛЬНОЇ СІРОВАТКИ ТЕЛЯТИ НА РОЗВИТОК ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ

А.О. Колеснікова, В.О. Шигимага, Інститут тваринництва УААН

У статті викладено результати дослідження розвитку in vitro ооцит-кумулусних комплексів (ОКК) миші та великої рогатої худоби після їх стимуляції імпульсним електричним полем (ІЕП). Виявлено підвищення ефективності стимуляції дозрівання in vitro ооцитів при поєднанні впливу ІЕП та факторів фетальної сироватки теляти (ФСТ). Запропоновано об'єктивний спосіб визначення рівня експансії кумулюсу під час культивування ОКК in vitro шляхом вимірювання площі кумулюсу.

Ключові слова: ооцит-кумулусний комплекс, ооцит, кумулюс, дозрівання in vitro, фетальна сироватка теляти, імпульсне електричне поле, експансія кумулюса

THE EVALUATION OF STIMULATIVE INFLUENCE OF PULSE FIELD AND FETAL COW SERUM ON OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES DEVELOPMENT

A. Kolesnikova, V. Shigimaga, the Institute of animal science, UAAS

The results of murine and bovine oocyte-cumulus complexes (OCC) development in vitro after their stimulation by pulse electric field are described in the article. It was found that the rate of stimulation of oocytes maturation in vitro was increased at combination the pulse field and fetal cow serum (FCS) factors action. The objective method of determination of cumulus expansion rate during culture of OCC by cumulus area measuring is proposed.

Key words: Oocyte-cumulus complexe, oocyte, cumulus, maturation in vitro, fetal cow serum, pulse electric field, cumulus expansion

УДК 636.2.082.453.5

ДИНАМИКА СПЕРМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕМЕНИ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ РОССИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е.В. Колосова, А.И. Абилов, Г.В. Ескин

ГНУ ВИЖ Россельхозакадемия, ОАО «ЦСИО»

В статье представлены материалы количественных и качественных характеристик спермопродукции быков-производителей черно-пестрой породы Российского происхождения в зависимости от их возраста. Установлено, что продуктивность быков-производителей в возрасте пять-семь лет находится на максимальном уровне: увеличение числа живчиков в эякуляте происходило до пятого года использования до 8,1 млрд (в 1,8 раза), с последующим некоторым снижением к седьмому – восьмому году до 6,4 -5,4 млрд. Самый высокий процент выбраковки эякулятов наблюдается в старшем возрасте (в 6 – 9 лет 8,3-11,2 %).

Ключевые слова: быки-спермодоноры, живчик, эякулят, качество спермопродукции.

Генофонд животноводства России превосходит генетические ресурсы любой страны мира. Решающую роль в высоком темпе пороодообразования сыграли исследования в области искусственного осеменения сельскохозяйственных