

КОВТУН С.І., ЗЮЗІОН А.Б., ЩЕРБАК О.В., ГОНЧАРЕНКО Л.М.

Інститут розведення і генетики тварин НААН України

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н.,

с. Чубинське, вул. Погребняка, 1, e-mail: kovtun_si@gala.net

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ КРОЛІВ *IN VITRO*

Одним із етапів технології формування ембріонів ссавців *in vitro* є забезпечення ядерного та цитоплазматичного дозрівання ооцитів для більш повного використання генетичного потенціалу самиць. Сучасні репродуктивні технології, які ґрунтуються на розумінні закономірностей біології розвитку, ембріологічної генетики, забезпечують одержання тварин із бажаними та якісно новими ознаками. Клонування шляхом переносу ядер клітин з бажаними генетичними характеристиками дозволяє створювати трансгенних тварин, які продукують біологічно активні речовини [1, 2]. Наразі одним із методів отримання трансгенних тварин є мікроін'єкція розчину генних конструкцій у чоловічий пронуклеус зигот. Хоча цей підхід широко розповсюджений, ефективність переносу генів залишається на досить низькому рівні, що створює проблеми в отриманні трансгенних тварин [3].

В якості клітин-реципієнтів при клонуванні кролів слугують дозрілі *in vivo* яйцеклітини після гормональної обробки самиць, проте синхронізація овуляції гамет ускладнюється часовими параметрами від 10,5 до 14 годин після ін'єкції лютеїнізуючого гормону (ЛГ) [2]. Тому існує необхідність удосконалення методик одержання *in vitro* дозрілих яйцеклітини кролів для вивчення генетичних закономірностей проходження мейозу поза організмом, формування ембріонів та застосування їх для удосконалення методичних підходів щодо одержання клонованих та трансгенних особин.

Практичне застосування методу одержання ембріонів *in vitro* неможливе без відпрацювань методик оцінки ефективності дозрівання та запліднення *in vitro* гамет самиць. Метою наших досліджень було вивчити ефективність дозрівання *in vitro* ооцитів кролиць до стадії метафази II мейозу і проаналізувати сформовані поза організмом ембріони кролів.

Матеріали і методи

Яєчники отримували від забитих клінічно здорових кролиць віком 7,5 міс. Відібрані яєчники не мали ознак патології та знаходились на стадії фолікулярного росту. Ооцит-кумулясні комплекси вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Гамети із розпушеним кумулюсом, темною гомогенною ооплазмою дозрівали *in vitro* в середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 20% еструсної сироватки корів і $3-5 \times 10^6$ клітин гранулози в 1 мл. Для вивчення дозрівання ооцитів кролиць до стадії метафази II мейозу культивування *in vitro* проводили 6 та 24 години при температурі $+38,8 \text{ }^\circ\text{C}$ і 4% CO_2 у повітрі. Після 24 годин дозрівання поза організмом яйцеклітини осіменяли свіжоотриманими сперматозоїдами, які вилучали із хвостової частини придатка сім'яника кроля. Капацитовані поза організмом

епідидимальні сперматозоїди (концентрація — $1,5 \times 10^6$ в 1 мл) та ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну, 10 мкМ гіпотаурину та 1 мкМ епінефрину) упродовж 22 годин. Культивування ембріонів проводили у середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 10% фетальної сироватки теляти (Sigma, F-9665) на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводу кроля. Для дослідження стану мейотичних хромосом ооцитів кролиць та хроматину ядер ембріонів готували сухоповітряні препарати за модифікованим методом А. Тарковського [4]. Препарати фарбували з використанням 2%-го розчину барвника Гімза і аналізували їх під світловим мікроскопом.

Результати та обговорення

Відомо, що овуляція ооцитів ссавців із фолікулів яєчників співпадає з часом дозрівання гамет. Морфологічними ознаками дозрівання ядра ооцитів є досягнення ними стадії метафази II мейозу. Дозрівання цитоплазми полягає у синтезі РНК і білків, які необхідні для повноцінного запліднення та здійснення перших поділів дроблення зародків. Також відбувається синтез факторів руйнування ядерної оболонки незрілих ооцитів, синтез фактора деконденсації хроматину головки сперматозоїда, фактора формування чоловічого пронуклеуса та інше. Дозрівання ядра і дозрівання цитоплазми ооцитів ссавців є відносно незалежними процесами, тому розвиток ооцитів до метафази II мейозу не може вказувати на достатню їх зрілість і готовність до запліднення.

У деяких тварин, зокрема кролів, процес парування індукує виділення ЛГ, що викликає овуляцію. Відомо, що часові параметри дозрівання ооцитів кролів від піку ЛГ до овуляції становить 10–12 годин [5]. Для вивчення генетичних закономірностей проходження мейозу в ооцитах кролів поза організмом проводили їх культивування упродовж 6 годин. Аналіз цитогенетичних препаратів показав, що через 6 годин дозрівання *in vitro* у 70% ооцитів відбулось руйнування цілісності ядерної мембрани і такі клітини перебували на стадії діакінезу і метафази I мейозу (табл. 1). Решта ооцитів кролів залишалась на стадії диплотени. Отже, 6-годинне культивування незрілих ооцитів кролів забезпечує ініціацію їх дозрівання *in vitro*, а подовження часу їх куль-

Таблиця 1

Вплив тривалості культивування ооцит-кумулясних комплексів на дозрівання ооцитів кролів *in vitro*

Час культивування ОКК (год.)	Кількість ооцитів	Ооцити на стадії				Кількість ооцитів з хромосомними порушеннями, n (%)
		диплотени, n (%)	діакінезу, n (%)	метафази I, n (%)	метафази II, n (%)	
6	50	15 ^a (30,0±6,48)	23 (46,0±7,05)	12 (24,0±6,04)	-	8 ^b (16,0±5,18)
24	38	4 ^b (10,5±4,97)	-	-	34 (89,5±4,97)	4 ^b (10,5±4,97)

a:b — $p = 0,05$, критерій χ^2 .

тивування необхідне для виявлення повного дозрівання *in vitro* гамет кролиць до стадії метафази II мейозу та забезпечення цитоплазматичного дозрівання.

У дослідження С. Стайса і Дж. Робла при одержанні клонованих ембріонів кролів після використання ооцитів, які вилучали через 16–20 годин після ін'єкції хоріонічного гонадотропіну людини, рівень активації реконструйованих зародків кролів становив лише 4%. З використанням ооцитів, які одержували через 20–24 години після ін'єкції гормону рівень активації ембріонів був 52% [6]. Тому в наступних дослідженнях час культивування *in vitro* незрілих ооцитів кролів нами був подовжений до 24 годин.

За результатами морфоцитогенетичного аналізу встановлено, що рівень дозрівання *in vitro* ооцитів кролів до стадії метафази II мейозу досягає 89,5% (табл. 1). Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільца (рис. 1).

За даними цитогенетичного аналізу ооцитів кролів виявлено, що через 24 години дозрівання *in vitro* лише 10,5% гамет знаходилось на стадії диплотени. Кількість ооцитів із хромосомними порушеннями суттєво не відрізнявся, коли їх культивували поза організмом 6 і 24 години (16,0% та 10,5%, відповідно).

Через 24 години дозрівання *in vitro* яйцеклітини кролів співкультивували із свіжовилученими епідидимальними сперматозоїдами кроля. Встановлено, що такі сперматозоїди кролів проявляють рухливість на рівні 80%. Після 22 годин сумісного культивування яйцеклітини відмили від сперматозоїдів і розмістили на подальше культивування.

За даними морфологічного аналізу рівень дроблення ембріонів кролів *in vitro* становив 84,2% (32/38). Сформовані 2-клітинні ембріони проявляли ознаки повноцінного розвитку (рис. 2). Слід зазначити, що одержаний нами рівень дроблення ембріонів кролів поза організмом є вірогідно вищим, порівняно із формуванням таких ембріонів великої рогатої худоби ($p < 0,05$, крите-



Рис. 1. Зажиттєве фото яйцеклітини кроля після культивування *in vitro*.

Ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка). Об.10х, ок. 10х

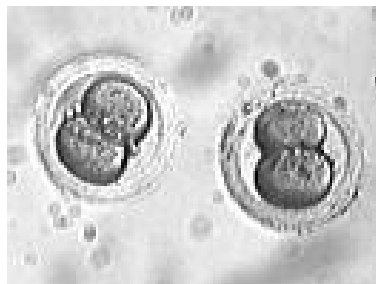


Рис. 2. Двоклітинні ембріони кроля, сформовані *in vitro*.

Збільшення у 100 разів

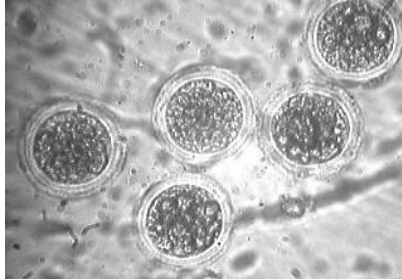


Рис. 3. **Зажиттєве фото сформованих поза організмом раних морул кроля.**
Збільшення у 100 разів

рій χ^2) та свиней ($p < 0,001$) [7]. Відсоток роздроблених ембріонів великої рогатої худоби був 62,9% (180/286), а свиней — 52,8% (75/142) [7].

Одержаний нами відсоток дроблення *in vitro* ембріонів кролів (84,2%) також вищий, порівняно із одержаними шляхом вимивання через 48 годин після осіменіння кролиць (64,4%, 38/59) [8]. На п'ятий день розвитку ембріонів кролів поза організмом до стадії ранньої морули (рис. 3) розвинулось 18,8% (6/32).

Після цитогенетичного аналізу препаратів ембріонів кролів на різних стадіях розвитку (від двох бластомерів до ранньої морули) встановлено, що ембріони які за візуальною оцінкою були визначені як морфологічно нормальні містили повноцінні ядра із ядерцями, кількість яких відповідала кількості бластомерів ембріонів, хроматин цих ядер теж відповідав стадії розвитку зародка.

Висновки

Отже, використання ооцит-кумулюсних комплексів кролів забезпечує ефективне формування ембріонів *in vitro*. За умови використання епідидимальних сперматозоїдів для запліднення дозрілих поза організмом яйцеклітин кролів рівень розвитку ембріонів дозволяє додатково використовувати генетичний потенціал тварин і удосконалювати вітчизняні біотехнологічні методи.

Література

1. *Challah-Jacques M., Chesne P., Renard J.P.* Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer // Cloning and stem cells.— 2003.— №5 (4).— P. 295–299.
2. *Kosenyuk Y.* Nuclear transfer in rabbit: the state of the art // Ann. Anim. Sci.— 2006.— Suppl., No1.— P. 109–122.
3. *Эрнст Л.К., Прокофьев М.И.* Биотехнология — новый этап развития генетики, биохимии и физиологии сельскохозяйственных животных. В сб.: Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Мат. II Междунар. конф., 5–8 сентября 1995 года. Боровск.—1997.— С. 232–240.
4. *Tarkowski A.K.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetics.— 1966.— Vol.5, №3.— P. 394–400.
5. *Дыбан А. П.* Раннее развитие млекопитающих.— Л.: Наука, 1988.— 228 с.

6. Stice S.L., Robl J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos // Biol. Reprod.— 1988.— №39 (3).— P. 657–664.

7. Ковтун С.І. Одержання зародків свиней *in vitro*: стан та перспективи використання / С.І. Ковтун // Вісн. аграр. науки.— 2004.— №5.— С. 52–54.

8. Щит И.Ю., Кузнецов А.В., Каурова С.А. и др. Негативное действие экзогенной ДНК на оплодотворение // Проблемы репродукции.— 1998.— №4.— С. 5–10.

Резюме

Обсуждается эффективность получения эмбрионов кроликов *in vitro* с использованием эпидидимальных сперматозоидов для оплодотворения яйцеклеток вне организма. Установлено, что высокий уровень формирования эмбрионов кроликов *in vitro* позволяет использовать их в исследованиях по трансгенезу и клонированию животных.

Обговорюється ефективність одержання ембріонів кролів *in vitro* з використанням епідидимальних сперматозоїдів для запліднення яйцеклітин поза організмом. Встановлено, що високий рівень формування ембріонів кролів *in vitro* дозволяє застосовувати їх у дослідженнях з трансгенезу та клонування тварин.

It is discussed effects of production rabbit embryo *in vitro* with using epididymal spermatozoa for *in vitro* ova fertilization. It is set high level forming *in vitro* rabbit embryos allows to using them in researches of animal transgenic and cloning.

КОЛОМІЄЦЬ Ю.В.¹, БУЦЕНКО Л.М.²

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: julyja@i.ua

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Україна, Д 03680, Київ, вул. Заболотного, 154, e-mail: plant_path@ukr.net

КАЛЮСОГЕНЕЗ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ ЯРОЇ: ПЕРЕДУМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН І РЕПРОДУКЦІЇ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ

Найпріоритетнішим завданням усіх цивілізованих країн є забезпечення своїх громадян продуктами харчування, вживання яких у фізіологічно необхідних нормах і асортименті сприяє нормальному функціонуванню організму та його працездатності. З багатющого набору продуктів харчування, що входять до споживчого кошика, найбільшої уваги заслуговують зернові культури, адже їхнє безпосереднє споживання та споживання продуктів їхньої переробки посідають чільне місце у раціоні харчування людини. Саме до таких культур належить пшениця.

Пшениця займає провідне місце серед оброблених у всьому світі культур за посівними площами. Таке її розповсюдження пояснюється високою поживністю та можливістю різностороннього використання і переробки. Зерно пшениці використовується для виготовлення найбільш масових про-