

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ В ООЦИТАХ КОРОВ, ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА IN VIVO ИЛИ IN VITRO

Т.И. Кузьмина¹, Х.М. Мутиева², Л.Н. Ротарь¹

¹ – ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных»,

г. Санкт-Петербург – Пушкин, Россия

² – Чеченский государственный университет,

г. Грозный, Россия

(Поступила в редакцию 08.07.2014 г.)

Аннотация. С использованием модели экстракорпорального созревания ооцитов коров *in vitro*, витального красителя бриллиантового кристаллического голубого (BCB) и флуоресцентного зонда MitoTracker Orange CMTMRos оценен уровень митохондриальной активности в донорских ооцитах в зависимости от их функционального статуса (растущие –BCB (-) и завершившие фазу роста –BCB(+) ооциты). Уровень митохондриальной активности в BCB(-) ооцитах значительно превышает таковую в BCB(+) ооцитах до культивирования, что априори свидетельствует о завершенности фазы роста BCB(+) ооцитов. Выявленные факты могут служить объяснением высокой компетентности ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo*, к созреванию *in vitro*, оплодотворению и формированию из них доимплантационных эмбрионов, вплоть до стадии бластоцисты. Подтверждена эффективность превентивной BCB-диагностики донорских ооцитов, используемых в клеточных репродуктивных технологиях.

Summary. Using the model of *in vitro* maturation of cattle oocyte, vital dye brilliant cresyl blue (BCB) and the fluorescent probe MitoTracker Orange CMTMRos level of mitochondrial activity in donor's oocytes, depending on their functional status (growing oocyte - BCB (-) or BCB (+) oocyte that have finished growth phase) was assessed. Level of mitochondrial activity in BCB (-) oocytes before culturing was significantly higher than in BCB (+) oocytes, that a priori evidence of completion of the growth phase of BCB (+) oocytes. Revealed facts may explain the high competence of oocytes completing growth phase *in vivo*, to the maturation *in vitro*, fertilization and the formation of pre-implantation embryos up to the blastocyst stage. Efficiency of preventive BCB-diagnostics of donor's oocytes used in cellular reproductive technologies has been confirmed.

Введение. Интенсификация внедрения клеточных репродуктивных технологий в практику разведения крупного рогатого скота, в частности получение эмбрионов *in vitro* из донорских ооцитов животных, позволит значительно повысить эффективность племенной работы, а также решить ряд проблем, связанных с воспроизводством.

Хорошо известно, что яйцеклетки, полученные при суперовуляции животных, имеют более высокие потенции к дальнейшему оплодотворе-

нию и развитию сформировавшихся из них эмбрионов [1], чем ооциты созревшие *in vitro*. Причины этого явления исследователи склонны видеть в недостаточной степени зрелости цитоплазмы ооцитов, которые завершали мейотического созревание вне организма. Синхронизация цитоплазматического и ядерного созревания – один из важных факторов, определяющих эффективность биотехнологии получения эмбрионов млекопитающих *in vitro*. Популяция донорских ооцитов, выделяемых из яичников животных, гетерогенна как по морфологическим параметрам (количество слоев окружающих ооцит клеток кумулюса, структура ооплазмы, степень экспансии клеток кумулюса), так и по функциональному состоянию. Применение в качестве зонда для прижизненного тестирования ооцитов красителя бриллиантового кристаллического голубого (BCB) – индикатора активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы позволяет оценивать функциональный статус донорских ооцитов животных: растущие или завершившие фазу роста [2, 3], обеспечивает возможность использования женских гамет для дальнейшего культивирования, их оплодотворения и получения эмбрионов [4]. Активность фермента возрастает в растущем ооците, к моменту завершения роста – снижается. Митохондрии (цитоплазматические органеллы) – энергетические субстанции клетки – играют важную роль в обеспечении АТФ при созревании ооцитов, оплодотворении и доимплантационном развитии эмбрионов. Данные, полученные на ооцитах человека и коров, подтверждают, что интенсивность митохондриального дыхания в ооцитах тесно связана с развитием эмбрионов после оплодотворения [5].

Цель работы – оценить митохондриальную активность в донорских ооцитах коров, завершивших фазу роста *in vitro* или *in vivo*, и сравнить их потенции к созреванию, оплодотворению и развитию эмбрионов *in vitro*.

Материал и методика исследований. Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) из антральных фолликулов *post mortem* яичников коров и половозрелых телок. Оценку функционального состояния исходной популяции ооцитов проводили на основе BCB-теста. После извлечения ооцит-кумулюсных комплексов из фолликулов 3-6 мм проводили их морфологическую оценку: в экспериментах использовали только ооциты, окруженные не менее чем 5-6 слоями кумулюса, с равномерной по ширине зоной пеллюцида, гомогенной ооплазмой. Для проведения BCB-диагностики ооцит-кумулюсные комплексы коров отмывали в растворе Дюльбекко с 0,4% бычьего сывороточного альбумина. Затем 90 минут подвергали воздействию раствора 26 μM BCB (B-5388, Sigma) в Дюльбекко, ооцит-кумулюсные комплексы отмывали в растворе Дюльбекко трижды и разделяли на следующие: ооциты с голубой окраской – завершившие фазу роста [BCB(+)], и без окраски цитоплазмы – рас-

тушие [BCB(-)]. Выбор концентрации основывался на данных, полученных Rodriguez-Gonzales et al [2]. При исследовании влияния различных концентраций BCB на ооциты коз. Альм и др. показали, что концентрация 26 μ M BCB эффективна и для оценки качества донорских ооцитов коров без потери её жизнеспособности [4].

Ооцит-кумулюсные комплексы культивировали в течение 24 часов совместно с клетками гранулезы (10^6 клеток/мл) в ТС-199 с 10% фетальной сыворотки коров и 10 нг/мл рекомбинантного бычьего соматотропина («Monsanto»).

Клетки гранулезы получали аспирацией жидкости из фолликулов диаметром 3-5 мм и последующим центрифугированием суспензии при 250 g 10 мин. После удаления супернатанта клетки дважды отмывали путем ресуспендирования в среде ТС-199, содержащей 3% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Жизнеспособность клеток гранулезы определяли окрашиванием трипановым синим (0,1%-й раствор). С этой целью к 80 мкл клеточной суспензии добавляли 20 мкл 0,5%-го раствора красителя, смесь инкубировали 10-15 минут при температуре 37 °С. Количество окрашенных и неокрашенных клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева. Жизнеспособность гранулезных клеток определяли по процентному отношению числа неокрашенных клеток к общему числу клеток. Для культивирования ооцитов совместно с клетками гранулезы использовали суспензию клеток гранулезы, в которой доля живых клеток составляла не менее 50-60%. Подготовленные клетки ресуспендировали в среде для культивирования ооцитов и добавляли в капли с ооцит-кумулюсными комплексами до конечной концентрации 1×10^6 клеток на 1 мл.

Оплодотворение *in vitro*, культивирование эмбрионов проводили в соответствии с методом Lu et al. [6]. Режим культивирования и оплодотворения ооцитов *in vitro*, культивирование доимплантационных эмбрионов соответствовал изложенному в методических рекомендациях, разработанных в лаборатории биологии развития ГНУ ВНИИГРЖ [7].

Для оценки уровня митохондриальной активности в ооцитах на стадии диплотены и метафазы-II использовали флуоресцентный зонд MitoTracker Orange CMTM Ros (Molecular Probes M-7510, Oregon, USA). Ооцит-кумулюсные комплексы по 15-20 штук помещали в капли 500 нМ раствора MitoTracker Orange CMTM Ros объемом 500 мкл и инкубировали в темноте при температуре 37 °С в течение 30 минут. Затем ооцит-кумулюсные комплексы отмывали от красителя в фосфатном буферном растворе, содержащем 3% сыворотки или 0,3% бычьего сывороточного альбумина. Отмытые ооциты очищали от кумулюсных клеток путем инкубации в 0,1%-м растворе трипсина при 37 °С в течение 5-10 минут. Оо-

циты переносили в раствор Хенкса, содержащий 3,7% параформальдегида, и фиксировали в течение 15 минут при 37⁰С. После фиксации ооциты отмывали от параформальдегида фосфатным буферным раствором, затем переносили на стекло Super frost в капли раствора Хехст 33258 (2,5 мкг/мл). Препараты хранили в холодильнике при 0⁰-4 °С. Просмотр проводили на флуоресцентном микроскопе (длины волн возбуждения и эмиссии соответственно 540 нм, 570 нм).

Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерий χ^2 или t-критерия Стьюдента с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$ для 3-5 независимых экспериментов.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты экспериментов по оплодотворению предварительно ВСВ-тестированных ооцитов, созревших в системе дозревания с клетками гранулезы и рекомбинантным бычьим соматотропином, показали высокую эффективность ВСВ-теста (табл. 1). Выход 8-16 клеточных эмбрионов, развившихся из ооцитов, завершивших фазу роста *in vitro*, значительно превысил таковой в группе, где осеменению подверглись ооциты, извлеченные из антральных фолликулов на стадии роста (77% против 60%, $P < 0,05$). Та же тенденция отмечена при анализе долей эмбрионов, достигших стадии бластоцисты. В результате оценки морфологии доимплантационных эмбрионов не установлено достоверных различий по уровню дегенераций во всех исследуемых группах. При морфологическом анализе эмбрионов учитывали следующие параметры: правильность формы эмбриона, компактность, отклонение в размере клеток, цвет и структура эмбриона, наличие больших везикул, форма зоны пеллюцида, наличие фрагментов клеток.

Таблица 1 – Развитие доимплантационных эмбрионов коров, полученных при оплодотворении ВСВ(+) или ВСВ(-)ооцитов (n ооцитов = 288)

ВСВ-тест	Число ооцитов, n	8-16 клеточные эмбрионы, n (%)	Бластоцисты, n (%)
+	149	115(77) ^a	58(39) ^c
-	139	83(60) ^b	19(14) ^d

a,b, c,d $P < 0,05$

Для выяснения причин выявленных фактов проверке подверглась гипотеза о незавершенности цитоплазматического созревания в ооцитах, находящихся в фазе роста при их выделении из фолликулов. В качестве маркера цитоплазматического созревания предложен уровень митохондриальной активности в ооцитах до начала и после культивирования в течение 24 часов. Использование MitoTracker Orange CMTM Ros, специфически связывающегося с функционально активными митохондриями, позволяет применять его для оценки митохондриальной активности. Из-

мерения показателей интенсивности флуоресценции в ооцитах MitoTracker Orange CMTM Ros, предварительно подвергнутых ВСВ-диагностике, были проведены на стадии диплотены (до культивирования) и через 24 часа культивирования, когда хроматин ооцитов обеих исследуемых групп находился на стадии метафазы-II (оценку статуса хроматина проводили путем окрашивания Хехстом 33258). Результаты представлены в таблице 2. Выявлены достоверные различия в интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTM Ros ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo*, и ооцитов на стадии диплотены. Митохондриальная активность в ооцитах обеих групп при созревании возростала.

Таблица 2 – Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTM Ros (μA) в ВСВ(+) и ВСВ(-) ооцитах коров (n ооцитов = 573)

ВСВ - тест	Время культивирования (часы)	Число ооцитов (n)	Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTM Ros в ооците ($\mu\text{A} \pm \text{S.E.M.}$)
+	0	153	370, 8 \pm 23,7 ^a
-	0	139	482,2 \pm 24,27 ^b
+	24	144	601,8 \pm 21,2 ^c
-	24	137	588,3 \pm 18,7 ^d

a, b, b, d P < 0,05, a, c, a, d P < 0,01 (Критерий Стьюдента)

Заключение. С использованием модели экстракорпорального созревания ооцитов коров *in vitro* и флуоресцентного зонда MitoTracker Orange CMTMRos оценен уровень митохондриальной активности в ооцитах коров, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro*. Обнаружены достоверные различия в уровне митохондриальной активности ооцитов, завершивших фазу роста, и растущих ооцитов перед началом культивирования. Показатели интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos в растущих ооцитах превышали таковые в ооцитах, завершивших фазу роста *in vivo*. Полученные эффекты свидетельствуют о замедлении или завершении цитоплазматического созревания в ооцитах, завершивших фазу роста *in vivo*, до блока мейоза перед его реинициацией. После культивирования ооцитов в течение 24 часов показатели интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos в обеих исследуемых группах повышались, однако достоверных различий в уровне митохондриальной активности между группами не обнаружено. Последнее предполагает, что времени для завершения цитоплазматического созревания ооцитов, до начала культивирования тестированных как растущих, недостаточно. Выявленные факты могут служить объяснением высокой компетентности ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo*, к созреванию *in vitro*, оплодотворению и формированию из них доимплантационных эмбрионов, вплоть до стадии бластоцисты. А также об эффективности превентивной

ВСВ-диагностики донорских ооцитов, используемых в клеточных репродуктивных технологиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-90038 Бел_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sirard M.A., Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. Anim. Reprod. Sci. – 1996. V. 42. 417-426 p.
2. Rodri'guez-Gonza'lez, E. Selection of prepuberal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test / E. Rodri'guez-Gonza'lez, M. Lopez-Be'jar, E. Velilla, M.T. Paramio // Theriogenology. – 2002. – V. 57. 1397-1409 p.
3. Bhojwani S., Alm H., Torner H., Kanitz W., Poehland R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer // Theriogenology. – 2007. Vol. 67. 341-5 p.
4. Alm H., Torner H., Lohrke B., Viergutz T., Ghoneim I.M., Kanitz W. // Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity Theriogenology. – 2005. Vol. 63. 2194-2205 p.
5. M.Wilding et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. Hum Reprod – 2001. Vol.16, N5, 909-917 p.
6. Lu K.H., Gordon I., Gallagher M., McGover N.H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. Veterinary Record – 1987. V. 121. 259-260 p.
7. Кузьмина, Т.И., Багиров, В.А., Егиазарян, А.В., Альм, Х., Торнер, Х. Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота in vitro. – Санкт-Петербург–Пушкин, 2009. – 44 с.

УДК 638.141

ВАРИАНТЫ МОДЕРНИЗИРОВАННЫХ МЕДОГОНОК

С.Н. Ладутько, Н.В. Халько, В.К. Пестис

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 14.07.2014 г.)

Аннотация. Откачивание меда из сотов производится медогонками с ручной приводом. Имеются медогонки с электрическим приводом, которые целесообразно применять на больших пасеках. Температура сотов оказывает значительное влияние на полное извлечение из них меда. Вибрация медогонки также оказывает заметное влияние на состояние сотов для их дальнейшего использования. По названному вопросу нами предложены и защищены патентами варианты модернизированных медогонок.

Summary. Honey pumping out from the combs is made by extractors with manual transmission. It is advisable to use the honey extractors with electric drive on large apiaries. Temperature of honeycombs has a significant influence on complete extraction