

УДК 591.465.12:57.085.23:57.08:57.04

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ НА ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ И ОПЛОДОТВОРЯЕМОСТЬ ООЦИТОВ МЫШИ

¹Колесникова А.А., ¹Шигимага В.А., ²Смолянинова Е.И.

¹*Институт животноводства НААН Украины, Харьков,
e-mail: kolesnikovaa@list.ru, vash105@gmail.com;*

²*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
Харьков, e-mail: esmolyaninova@rambler.ru*

Изучено влияние различных видов стимуляции созревания (гормональной стимуляции и стимуляции импульсным электрическим полем) на морфофункциональные особенности ооцитов мыши. Стимулированные ооциты сравнены со спонтанно созревшими в естественном половом цикле ооцитами по морфологическому состоянию, электропроводности и компетентности к оплодотворению в системе *in vitro*. Установлено, что гормонально стимулированные к созреванию ооциты неоднородны по качеству внутри пула и разделяются на две группы по электропроводности. Импульсно стимулированные ооциты по значениям электропроводности подобны спонтанно созревшим ооцитам и деления на группы не имеют. Стимулированные импульсным полем ооциты не отличаются достоверно по оплодотворяемости от спонтанно созревших ооцитов. Уровень оплодотворения гормонально стимулированных ооцитов является достоверно более низким по сравнению с ооцитами, созревшими в естественном половом цикле.

Ключевые слова: ооцит, спонтанная овуляция, суперовуляция, импульсная стимуляция созревания, электропроводность, оплодотворение *in vitro*

THE INFLUENCE OF STIMULATION OF MATURATION ON ELECTROCONDUCTIVITY AND FERTILIZATION RATE OF MOUSE OOCYTES

¹Kolesnikova A.A., ¹Shigimaga V.A., ²Smolyaninova E.I.

¹*Institute of Animal Sciences of NAAS of Ukraine, Kharkov,
e-mail: kolesnikovaa@list.ru, vash105@gmail.com;*

²*Institute of Problem Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine,
Kharkov, e-mail: esmolyaninova@rambler.ru*

The influence of different kinds of stimulation of maturation (hormonal stimulation and stimulation by pulse electric field) on morphofunctional features of murine oocytes was studied. Stimulated oocytes was compared with spontaneously matured in natural estrus cycle oocytes by their morphological status, conductivity and competence to fertilization *in vitro*. Hormonal stimulated oocytes was dissimilar by their quality among the pool and divided into two groups by conductivity in isotonic solution of sucrose. The values of conductivity of pulse stimulated oocytes was similar to those of spontaneously matured oocytes. Pulse stimulated oocytes did not differ from spontaneous matured oocytes by the rate of fertilization *in vitro*. Rate of fertilization *in vitro* of hormonal stimulated oocytes was reliable lower compared to matured in natural estrus cycle oocytes.

Keywords: oocyte, natural ovulation, superovulation, pulse stimulation of maturation, conductivity, fertilization *in vitro*

Традиционно в экспериментальной и прикладной репродукции лабораторных и сельскохозяйственных животных используют стимуляцию созревания ооцитов с применением гонадотропных гормонов (суперовуляция). Целью такой стимуляции является получение большего количества зрелых ооцитов для оплодотворения, дальнейшей трансплантации или криоконсервирования эмбрионов. Известно, что гормональная стимуляция влияет на характер овуляции и качество полученных ооцитов [1, 8–10, 12], что, в свою очередь, отражается на качестве эмбрионов и их способности к дальнейшему развитию. Альтернативным подходом к повышению выхода созревших *in vitro* ооцитов животных являются методы стимуляции их развития действием физических факторов [3, 5]. Существующие данные о влиянии стимуляции на морфоло-

гическую и функциональную целостность ооцитов животных требуют дополнительных методов оценки их качества. Целью исследования было изучение влияния импульсной и гормональной стимуляции созревания на качество ооцитов мыши, оцененное по их морфологическим признакам, электропроводности и уровню оплодотворения *in vitro*.

Материалы и методы исследований

Эксперименты с животными выполняли согласно требованиям «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых с экспериментальной и другой научной целью». Мыши были распределены на три группы. Первую группу (контроль) составили самки ($n = 8$) с установленной по вагинальным мазкам стадией эструса, которая соответствует спонтанной овуляции. У самок второй группы ($n = 13$), не определяя стадии полового цикла, вызывали суперовуляцию путем введения гонадотропных

гормонов: 5 МЕ ГСЖК («Folligon», Голландия) и через 46–48 ч. 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (чХГ, «Прегнил», «Органон», Голландия). Из антральных фолликулов самок третьей группы ($n = 6$) выделяли ооцит-кумулясные комплексы (ОКК), которые импульсно стимулировали и осуществляли культивирование для созревания ооцитов в условиях *in vitro* [5]. Электропроводность зрелых ооцитов трех экспериментальных групп определяли в изотоническом для ооцитов 0,3 М растворе сахарозы, который является непроводящей средой и при его использовании может быть определена собственная электропроводность ооцитов [6]. Оплодотворение созревших ооцитов проводили по общепринятой методике [2, 4].

Результаты исследований и их обсуждение

Уровень выхода зрелых ооцитов со сформированным первым полярным тельцем в группе гормонально стимулированных ооцитов был достоверно ниже, чем при спонтанной овуляции, и достоверно не отличался для импульсно стимулированных ооцитов (табл. 1). В отличие от стимулированных ооцитов в группе спонтанно овулировавших ооцитов отсутствовали ооциты

с морфологическими признаками дегенерации. Среди ооцитов, подвергавшихся гормональной стимуляции, преимущественным видом дегенерации была фрагментация и отсутствие кумулюса на время выделения ооцитов из яйцеводов, а среди импульсно стимулированных ооцитов к этой категории было отнесены клетки, имевшие грануляцию цитоплазмы.

Для выявления скрытых нарушений у морфологически нормальных ооцитов использовали их удельную электропроводность, которую измеряли при помощи метода импульсной кондуктометрии [6]. Во всех трех группах удельная электропроводность ооцитов возрастала с увеличением величины напряженности приложенного электрического поля. Для спонтанно созревших ооцитов ($n = 45$) электропроводность отдельных клеток характеризовалась близкими значениями (рис. 1). Необратимый электрический пробой мембраны ооцитов этой группы не наблюдался, что свидетельствовало о высокой стойкости к действию электрического импульса ооцитов, полученных в естественном половом цикле.

Таблица 1

Влияние гормональной и импульсной стимуляции на морфологическое состояние ооцитов мыши

Группа	Количество животных, гол.	Количество ооцитов						
		Общее, n	с полярным тельцем		без полярного тельца		с дегенерацией	
			n	%	n	%	n	%
I	8	34	27	79,4 ± 6,9 ^a	7	20,6 ± 6,9 ^d	0	0
II	13	138	76	55,1 ± 4,2 ^b	56	40,6 ± 4,2 ^e	6	4,3 ± 1,7
III	6	36	26	72,2 ± 7,5 ^c	8	22,2 ± 6,9 ^f	1	2,8 ± 2,7

Примечание. $a:b - p < 0,01$; $b:c, d:e, e:f - p < 0,05$.

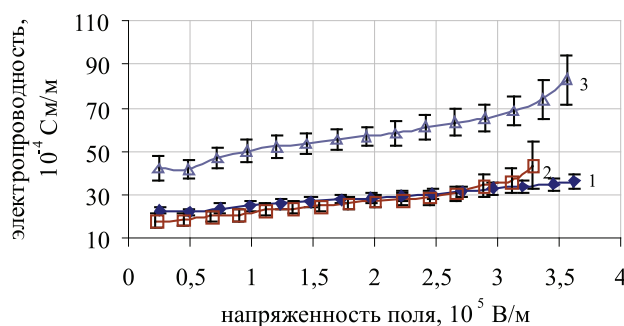


Рис. 1. Зависимость удельной электропроводности ооцитов мыши от напряженности электрического поля в 0,3 М растворе сахарозы. Ооциты получены в результате: 1 — спонтанной овуляции; 2 и 3 — стимуляции ГСЖК + чХГ (суперовуляция)

Среди морфологически нормальных, зрелых ооцитов, полученных в результате индукции суперовуляции, выявлены две группы клеток, существенно отличавшихся по электропроводности (рис. 1). Ооци-

ты одной группы характеризовались более низкими значениями электропроводности и большей стойкостью к электрическому пробую, причем в общем пуле зрелых ооцитов ($n = 33$) количество таких клеток со-

ставило 57,6%. Вторая группа клеток была менее численной (соответственно 42,4%), и ооциты этой группы характеризовались более высокими значениями электропроводности и были менее стойкими к электрическому пробю. Электропроводность ооцитов с меньшими значениями была подобна электропроводности спонтанно овулировавших ооцитов. Значения электропроводности других ооцитов этой экспериментальной группы были более высокими, и при увеличении напряженности поля до 3,5 кВ/см в отдельных случаях для них регистрировали необратимый электропробой мембраны с разрушением ооцита,

вероятно, в результате коллоидно-осмотического лизиса.

В группе импульсно стимулированных перед созреванием *in vitro* ооцитов мыши ($n = 13$) не наблюдалось разделения на группы по электропроводности, хотя имел место больший разброс значений этого показателя по сравнению с группой спонтанно овулировавших ооцитов. Необратимый электропробой цитоплазматической мембраны в ооцитах этой группы зафиксирован для одной клетки (7,7%). Это может указывать на большее подобие качества импульсно стимулированных ооцитов ооцитам, полученным в естественном половом цикле.

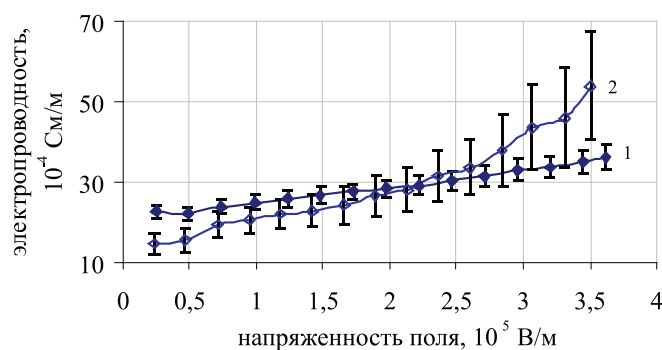


Рис. 2. Зависимость удельной электропроводности ооцитов мыши от напряженности электрического поля в 0,3 М растворе сахарозы. Ооциты получены в результате: 1 – спонтанной овуляции; 2 – созревания *in vitro* после импульсной стимуляции незрелых ОКК

Способность ооцитов к оплодотворению изучали как интегральный показатель

их качества после гормональной и импульсной стимуляции созревания (табл. 2).

Таблица 2

Влияние гормональной и импульсной стимуляции на уровень оплодотворения *in vitro* ооцитов мыши

Группа	Количество ооцитов						
	общее, n	оплодотворенных		неоплодотворенных		дегенерированных	
		n	%	n	%	n	%
I	51	38	$74,5 \pm 6,1^a$	10	$19,6 \pm 5,6$	3	$5,9 \pm 3,3^c$
II	48	26	$54,2 \pm 7,2^b$	12	$25,0 \pm 6,3$	10	$20,8 \pm 5,9^d$
III	52	35	$67,3 \pm 6,5^{ab}$	12	$23,1 \pm 5,8$	5	$9,6 \pm 4,1^{cd}$

Примечание. $a:b, c:d - p < 0,05$.

Ооциты, подвергавшиеся гормональной стимуляции, показали наиболее низкий уровень оплодотворения среди трех экспериментальных групп. В этой группе оплодотворяемость была на 20,3% ($p < 0,05$) и на 13,1% ниже аналогичного показателя в группах спонтанно созревших и импульсно стимулированных к созреванию ооцитов соответственно. Уровень оплодотворения импульсно стимулированных ооцитов был ниже уровня оплодотворения спонтанно созревших в естественном половом цикле ооцитов мыши, хотя достоверно не

отличался от него. Это может свидетельствовать о наиболее выраженной неоднородности по качеству гормонально стимулированных к созреванию ооцитов.

Из полученных данных следует, что гормональная стимуляция созревания существенно влияет на морфологические признаки ооцитов, что согласуется с результатами других авторов [1, 8, 13]. Известно, что при гормональной суперовуляционной обработке общее количество созревающих ооцитов возрастает за счет увеличения митотической активности в меньших фолли-

кулах и предотвращения атрезии больших фолликулов или возвращения некоторых атретических фолликулов в состояние созревания [1, 9, 11]. Это является вероятной причиной морфофункциональных различий ооцитов, полученных в результате индукции суперовуляции. Возможно, именно поэтому увеличивается также и количество дегенерированных ооцитов. Причиной морфофункциональных нарушений и снижения жизнеспособности полученных эмбрионов могут быть также нарушения биосинтеза, имеющие место при экзогенной гормональной стимуляции созревания [7, 11].

Заключение

Таким образом, зрелые, морфологически нормальные ооциты мыши, полученные в результате индукции суперовуляции с использованием последовательных инъекций животным ГСЖК и чХГ, разделяются на две группы по электропроводности в изотоническом 0,3 М растворе сахарозы. Импульсно стимулированные перед созревани-ем *in vitro* ооциты и созревшие спонтанно в естественном половом цикле имеют подобную по значениям электропроводность и разделения на группы по этому показателю не имеют. Уровень оплодотворения вне организма гормонально стимулированных ооцитов мыши является достоверно более низким по сравнению с уровнем оплодотворения спонтанно овулировавших ооцитов. Импульсно стимулированные ооциты мыши не отличаются по уровню оплодотворения *in vitro* от ооцитов, полученных в естественном половом цикле мышей.

Список литературы

1. Суперовуляция, вызванная введением ГСЖК у кунцеобразных / С.Я. Амстиславский, Л.Ф. Максимовский, Г.А. Зудова и др. // *Онтогенез*. – 1997. – Т. 28, № 5. – С. 359–366.
2. Биология развития млекопитающих: Методы: пер. с англ.; под ред. М. Манк. – М.: Мир. – 1990. – 406 с.
3. Вєсїч Т.Л. Вплив лазерного випромїнювання на морфофункціональні властивості нативних гамет та гамет, що перенесли кріоконсервування: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харків, 1994. – 21 с.
4. Методические особенности оплодотворения *in vitro* ооцитов лабораторных мышей / Н.Г. Грищенко, Е.И. Смольянинова, А.А. Колесникова и др. // *Експериментальна і клінічна медицина*. – 2010. – № 3 (48). – С. 59–64.
5. Шигимага В.О., Колеснікова А.О. Спосіб активації розвитку *in vitro* ооцит-кумулясних комплексів ссавців // Патент України № 19077, 2006, Бюл. № 12.
6. Шигимага В.А. Импульсный кондуктометр для биологических клеток и жидких сред // *Измерительная техника*. – М.: ФГУП Стандартинформ, 2012. – № 11. – С. 45–49.
7. Dhanju C.K., Sangha G.K., Sekhon P.K. Biochemical status of ovarian after induction of superovulation on different days of estrus cycle in mice // *Indian J. Exp. Biol.* – 2001. – Vol. 39, № 8. – P. 777–780.
8. Ertizeid G., Storeng R. Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice // *J. Reprod. Fert.* – 1992. – Vol. 96. – P. 649–655.
9. Fortier A.L., Lopes F.L., Darricarrere N. et al. Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – Vol. 17, № 11. – P. 1653–1656.
10. Liu Z.H., Yue K.Z., Ma S.F. et al. Effect of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and

granulosa-cell apoptosis in the pig // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 59, I. 3–4. – P. 775–785.

11. Saftro E., O'Neill C., Saunders D.M. Elevated luteal phase estradiol: progesterone ratio in mice causes implantation failure by creating a uterine environment that suppresses embryonic metabolism // *Fertility and Sterility*. – 1990. – Vol. 54. – P. 1150–1153.
12. Veiga-Lopez A., Gonzales-Bulnes A., Garcia-Garcia R.M. et al. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 63, I. 7. – P. 1973–1983.
13. Wang Y., Osk S.A., Chian R.C. Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embryonic development *in vitro* // *Reprod. Biomed. Online*. – 2006. – Vol. 12, № 3. – P. 304–314.

References

1. Amstislavskiy S.Ya., Maksimovskiy L.F., Zudova G.A. et al. Superovulyatsiya, vyzvannaya vvedeniyem GSZHk u kunitseobraznykh (Superovulation induced by PMSG administration of weasel) // *Ontogenez*. 1997. Vol. 28, no. 5. pp. 359–366.
2. Mammalian development: A practical approach / [edited by M. Monk]. M.: Mir. 1990. 406 p.
3. Vesich T.L. Vplyv lazernogo vyprominyuvannya na morfofunktsionalni vlastyivosti natyvnykh gamet, scho perenesly kriokonservuvannya (Effect of laser radiation on morphofunctional property of native gametes and gametes, which underwent of cryopreservation): Avtofef. dys. kand. med. nauk. Kharkiv, 1994. 21 p.
4. Grischenko N.G., Smolyaninova E.I., Kolesnikova A.A. [et al.] Metodicheskiye osobennosti oplodotvoreniya *in vitro* ootsytov laboratornykh myshey (Methodical features of fertilization *in vitro* of laboratory mice oocytes // *Eksperimentalna i klinichna medytsina*. 2010. no. 3 (48). pp. 59–64.
5. Shigimaga V.A., Kolesnikova A.A. Sposib actyvatsiyi rozvytku *in vitro* ootsyt-kumulyusnykh kompleksiv ssavtsiv (Method of activation of mammals oocyte-cumulus complexes development *in vitro* // Patent of Ukraine no. 19077, 2006, Byul. no. 12.
6. Shigimaga V.A. Impulsnyy konduktometr dlya biologicheskikh kletok i zhidkikh sred (Pulse conductometer for biological cells and liquid media // *Izmeritelnaia tekhnika*. M.: FGUP Standartinform. 2012. no. 11. pp. 45–49.
7. Dhanju C.K., Sangha G.K., Sekhon P.K. Biochemical status of ovarian after induction of superovulation on different days of estrus cycle in mice // *Indian J. Exp. Biol.* 2001. Vol. 39, no. 8. pp. 777–780.
8. Ertizeid G., Storeng R. Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice // *J. Reprod. Fert.* 1992. Vol. 96. pp. 649–655.
9. Fortier A.L., Lopes F.L., Darricarrere N. et al. Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta // *Hum. Mol. Genet.* 2008. Vol. 17, no. 11. pp. 1653–1656.
10. Liu Z.H., Yue K.Z., Ma S.F. et al. Effect of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and granulosa-cell apoptosis in the pig // *Theriogenology*. 2003. Vol. 59, I. 3–4. pp. 775–785.
11. Saftro E., O'Neill C., Saunders D.M. Elevated luteal phase estradiol: progesterone ratio in mice causes implantation failure by creating a uterine environment that suppresses embryonic metabolism // *Fertility and Sterility*. 1990. Vol. 54. pp. 1150–1153.
12. Veiga-Lopez A., Gonzales-Bulnes A., Garcia-Garcia R.M. et al. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep // *Theriogenology*. 2005. Vol. 63, I. 7. pp. 1973–1983.
13. Wang Y., Osk S.A., Chian R.C. Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embryonic development *in vitro* // *Reprod. Biomed. Online*. 2006. Vol. 12, no. 3. pp. 304–314.

Рецензенты:

Лиманский А.П., д.б.н., главный научный сотрудник ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова НАМН Украины», г. Харьков;

Гордиенко Е.А., д.б.н., профессор, зам. директора Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков.

Работа поступила в редакцию 22.02.2013.