

остков. — М.: Меди-
чних врачебных иссле-
и спорта // Сост.
спортсменов. — М.:

ического и среднего в
оциальное в развитии
ического развития де-
ния. — 1983, № 3. —

ков. — М.: Педагоги-

остков: информатив-
№ 12. — С. 50-53.

ростного бега у детей
пед. наук. — Омск,

кого развития детей и

Осібник для вчителів.

и школьников. — М.:

ортивной ориентации

Матеріал надійшов
о редакції 31.03.99

УДК 591.465.1

І. М. Алексеева, Т. Ю. Вознесенська, Т. В. Блашків, Р. І. Янчій

Відновлення *in vitro* мейотичного дозрівання та формування першого полярного тільця ооцитами мишей на різних стадіях естрального циклу

Регистрировалось возобновление мейотического созревания ооцитов мыши после 2 и 14 ч их культивирования в среде с физиологической концентрации ионов кальция. Установлено, что количество ооцитов, находящихся на стадии ЗП+ (с зародышевым пузырьком), способных осуществить переход на следующую мейотическую стадию ЗП- (разрушенного зародышевого пузырька) после 2 ч культивирования был 22,2% от «малых» и 32,4% от «больших» фолликулов яичника мышей в диэструсе и соответственно 28,1 и 41,8% из фолликулов яичника в установившемся эструсе. Количество же ооцитов перешедших на стадию ЗП-, а затем сформировавших первое полярное тельце (стадия ПТ) после 14 ч культивирования был 21,4 % от «малых» и 30,3 % из «больших» фолликулов яичника мышей в диэструсе и 26,1 % и 43,6 % в эструсе соответственно.

Вступ

Регулювання розвитку ооцитів савців та їх мейотичне дозрівання відбувається під контролем низки гормонів, в тому числі і тих які продукує фолікулярне оточення ооцита. Коли призупиняється мейотичне дозрівання ооцита в середині фолікула його відновлення можливе лише після припинення дії факторів, що його пригнічують [4]. З іншого боку ріст і мейотичне дозрівання ооцитів залежить від деяких гонадотропних гормонів гіпофіза, під контролем яких відбуваються процеси фолікулогенезу в яєчниках. Значну роль у відновленні мейотичного дозрівання відіграє лютеїнізуючий гормон (ЛГ), проте його роль і фізіологічна дія на ооцити виявлені ще недостатньо. Тому метою нашої роботи було встановлення здатності відновлювати мейотичне дозрівання та формувати перше полярне тільце ооцитами мишей *in vitro*, неферментативно виділених на різних стадіях естрального циклу із фолікулів різних розмірів.

Методика

У дослідах використовували самок білих безпородних мишей віком 8 тиж, розділених на дві групи. Для першої групи відбирали самок на стадії дієстус естрального циклу, яку контролювали за допомогою вагінальних мазків. Для другої — самок на стадії еструс, яку індукували присутністю самця в клітці, розділених перегородкою [1]. Досліди проводили в одну пору року, світловий режим і умови утримування всіх тварин були однаковими і відповідали нормам, прийнятим в Інституті фізіології НАН України ім. О. О. Богомольця.

Під ефірним наркозом тварин забивали методом зміщування шийних хребців, відпрепаровували яєчники мишей, які одразу переносили в середовище

© І. М. Алексеева, Т. Ю. Вознесенська, Т. В. Блашків, Р. І. Янчій, 1999

ДМЕМ при 37 °С. Під мікроскопом МБС-9 із яєчників виділяли фолікули, звільняючи їх від стромальної тканини. Мікропіпетками з різним діаметром кінчика фолікула розділяли за розмірами і переносили в свіже середовище М2 (37 °С) з 0,5 %-м розчином (БСА). Розміри фолікулів визначали мікрометричним методом. Фолікули яєчника миші розподіляли за розміром таким чином: «малі» — 143–151 мкм, «великі» — 329–337 мкм. Такий розподіл фолікулів мишей за розміром є загальноприйнятим [12]. Ооцити із фолікулів видаляли руйнуванням фолікулярної стінки з наступним витягуванням піпеткою, звільняючи їх від фолікулярних і кумулюсних клітин. Ферментативні методи не використовували. Вимірювали діаметр ооцитів із врахуванням розмірів прозорої оболонки. Культивування ооцитів проводили в пластикових чашках Петрі в середовищі ДМЕМ з 15 ммол/л HEPES з фізіологічною концентрацією Ca^{2+} — 1,7 ммоль/л, з додаванням антибіотиків (по 0,1 мг/мл стрептоміцину та пеніциліну), в термостаті при 37 °С у стерильному боксі. Підраховували кількість ооцитів на стадії «зародкового пухирця» (ЗП+) і ооцитів, що відновлювали мейоз — стадія розчинення «зародкового пухирця» (ЗП–), а також кількість ооцитів з розчиненим «зародковим пухирцем» (ЗП–), а також кількість ооцитів, що сформували перше полярне тільце (ПТ) — стадія метафази II. Такі результати одержували у всіх експериментальних групах із «малих» і «великих» фолікулів яєчника мишей на стадії дієструсу та індукованого еструсу. Тривалість культивування ооцитів (2 і 14 год) вибрали враховуючи, що для спонтанного розчинення ядерної оболонки ооцитів гризунів (стадія ЗП–) становить 2–4 год після звільнення із фолікула [3], а формування полярного тільця (стадія ПТ) у гризунів відбувається протягом 12 год культивування [11]. Для статистичної обробки результатів використовували критерій *t* Стюдента.

Результати та їх обговорення

Як видно із представлених (таблиця) результатів, розмір ооцитів на стадії індукованого еструсу достовірно ($P < 0,01$) більший, ніж на стадії дієструсу у таких же об'ємом фолікулів. Встановлено, що кількість ооцитів на стадії ЗП+, що здатні здійснити перехід на наступну мейотичну стадію ЗП– після 2 год культивування із «малих» фолікулів мишей у дієструсі становить $22,2 \pm 0,2 \%$ ($n = 18$) та $28,1 \pm 0,2 \%$ ($n = 18$) в індукованому еструсі, а також — $32,4 \pm 0,3 \%$ ($n = 16$) з «великих» фолікулів мишей у дієструсі та $41,8 \pm 0,2 \%$ ($n = 15$) — в індукованому еструсі. Кількість ооцитів, що досягали стадії ЗП–, а потім формували перше ПТ після 14 год культивування була $21,4 \pm 0,2 \%$ ($n = 18$) з «малих» фолікулів мишей в дієструсі та $26,1 \pm 0,2 \%$ ($n = 18$) — в індукованому еструсі, а також $30,3 \pm 0,3 \%$ ($n = 15$) з «великих» фолікулів мишей в дієструсі та $43,6 \pm 0,2 \%$ ($n = 14$) індукованому еструсі (рисунок).

Відомо, що ріст і диференціювання ооцита переважно скоординовано з розвитком соматичних компонентів фолікула. Збільшення ооцита в об'ємі корелює

Розмір (мкм) ооцитів мишей

Фолікули	Дієструс	Індукований еструс
«Малі»	$70,0 \pm 0,2$ ($n = 84$)	$74,0 \pm 0,2^*$ ($n = 72$)
«Великі»	$72,0 \pm 0,3$ ($n = 66$)	$76,0 \pm 0,2^*$ ($n = 88$)

* $P < 0,01$.

Мейотичне дозрівання. По осі абсцис — мейотичного розвитку ооцита; ординат — відсоток ооцитів на стадії: I — культивування в середовищі ДМЕМ протягом двох годин; II — культивування впродовж 14 год в дієструсі; б — стадія мейозу ооцита з «малого» фолікула; в — стадія мейозу ооцита з «великого» фолікула. * $P < 0,01$ — достовірність показників мейозу між ооцитами з «малих» та з «великих» фолікулів на стадії естрального циклу.

зі збільшенням мейотичних ресурси необхідні для розвитку ембріона [5]. Крім того, внаслідок усього цього

Розмір ооцита в середовищі *in vitro* [7, 13], а також вплив стимулюючого гормону на ооцитів з прозорою оболонкою є показником цитоплазматичного розвитку фолікули від стадії антраля до стадії антраля, збільшуючи об'єм, закінчити цитоплазматичного дозрівання в фолікулі. Однак вважають, що розвиток фолікула фактично залежить від малого антраля до стадії антраля дозрівання, розвитку фолікула [16]. Такі ооцити з «малих» антраля фолікулів здатні розвинути.

Ооцити на стадії антраля фолікула денсованими хромосомами названою «зародковим

яли фолікули, ним діаметром середовище М2 мікрометричним інном: «малі» — кулів мишей за яли руйнуван- звільняючи їх не використову- рої оболонки. і в середовищі — 1,7 ммоль/л, пеніциліну), в ість ооцитів на мейоз — стадія оцитів з розчи- ів, що сформу- зультати одер- «маліх» фолікулів валість культи- танного розчи- 2–4 год після (ПТ) у гризунів гичної обробки

цитів на стадії адії дієструс у на стадії ЗП+, І— після 2 год 22,2 % ± 0,2 % — 32,4 ± 0,3 % 2 % (n = 15) — ЗП-, а потім 0,2 (n = 18) з в індукованому кулів мишей в (нок).

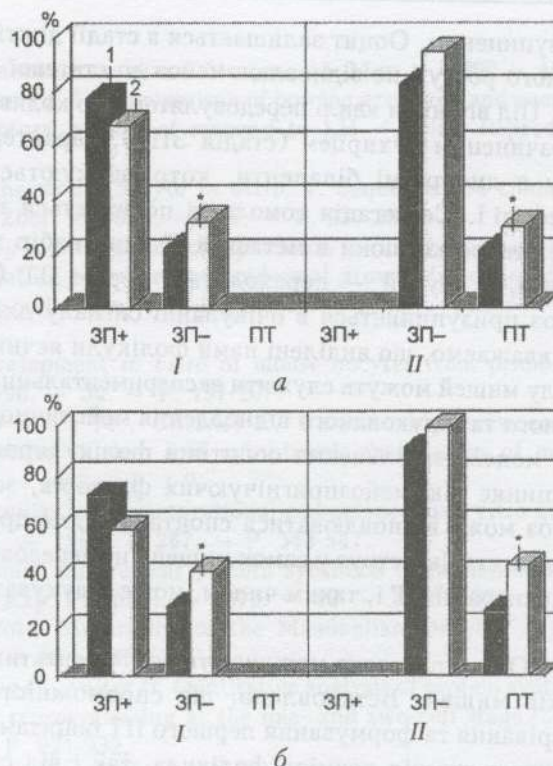
ординовано з об'ємі корелює

ий еструс

* (n = 72)

(n = 88)

Мейотичне дозрівання ооцитів миші. По осі абсцис — стадія мейотичного розвитку ооцитів; по осі ординат — відсоток ооцитів на цій стадії: I — культивування протягом двох годин; II — культивування впродовж 14 год, а — стадія дієструс; б — стадія еструс; 1 — ооцити з «малого» фолікула; 2 — ооцити з «великого» фолікула. *P < 0,01 — достовірність відмінностей показників відновлення мейозу між ооцитами з «малих» та з «великих» фолікулів в одній стадії естрального циклу.



зі збільшенням вмісту білків [14]. Ооцит у преантральному фолікулі накопичує ресурси необхідні для дозрівання, запліднення та доімплантаційного розвитку ембріона [5]. Крім того, білки синтезовані протягом розвитку ооцита, збігаються внаслідок усього доімплантаційного розвитку [8, 10].

Розмір ооцита лише визначали при вивченні його мейотичної здатності *in vitro* [7, 13], а також при вивченні впливу на об'єм ооцитів різних доз фолікуло-стимулюючого гормону і росту факторів в культуральному середовищі [5]. Розмір ооцитів з прозорою оболонкою на момент виділення з фолікулів різних розмірів, є показником цитоплазматичного дозрівання і ми вважаємо, що за період розвитку фолікули від «малого» до «великого», ооцити проходять подальший розвиток, збільшуючись при цьому в об'ємі і, мабуть, маючи можливість повністю закінчити цитоплазматичне дозрівання. У поняття визначення цитоплазматичного дозрівання включають процеси, котрі не збігаються з ядерним дозріванням. Однак вважають, що деякі етапи цитоплазматичного дозрівання скоординовані й фактично залежать від початкових етапів ядерного дозрівання [5, 15]. Ооцити від малого антрального фолікула, тільки «частково здатні» закінчити ядерне дозрівання, розвиток мейозу призупиняється в метафазі I частіше, ніж у II [16]. Такі ооцити не часто досягали стадії бластоцитів, тоді як ооцити від «великих» антральних фолікулів, котрі закінчували ядерне дозрівання, частіше здатні розвинути до стадії бластоцитів [6].

Ооцити на стадії диктіотенів (стадія ЗП+) характеризуються високодеконденсованими хромосомами, оточеними непошкодженою ядерною мембраною, названою «зародковим пухирцем». На цій стадії розвитку ооцита мейоз стає

призупиненням. Ооцит залишається в стадії диктіотенів навіть протягом фолікулярного росту і не відновлює мейоз до статевої зрілості.

Під впливом хвилі передовуляторного коливання концентрації ЛГ [2], ооцит з розчинним пухирцем (стадія ЗП-), характеризується ущільненням хроматину в дискретні біваленти, котрі шикуються на мейотичному веретені в метафазі I. Сегрегація гомологів починається впродовж анафази і проходить через телофазу поки в метафазі II один набір хромосом зберігається в межах ооцита, а другий — переходить в перше ПТ (стадія ПТ). Це місце в якому мейоз призупиняється в очікуванні сигналу для відновлення запліднення [9]. Ми вважаємо, що виділені нами фолікули яєчника на двох стадіях естрального циклу мишей можуть служити експериментальними моделями для вивчення спонтанного та індукованого відновлення мейотичного дозрівання ооцитів. Для першої моделі вивільнення ооцитів з фолікулярного оточення на стадії дієструсу припиняє дію мейозпригнічуючих факторів, зокрема цАМФ [9] на ооцити, і мейоз може відновлюватися спонтанно, для другої — присутність самця встановлює стадію еструсу у самок мишей і це передбачає передовуляторне підвищення концентрації ЛГ і, таким чином, може індукуватися відновлення мейозу в ооцитах.

Отже, показана можливість неферментативного виділення фолікулів з яєчників мишей. Встановлено, що спроможність до відновлення мейотичного дозрівання та формування першого ПТ ооцитами, виділеними з таких фолікулів залежить як від розміру фолікула, так і від стадії естрального циклу мишей. Найбільша кількість ооцитів, котрі вступали в мейоз, характерна для «великих» фолікулів мишей на стадії еструсу.

I. N. Alekseeva, T. Yu. Voznesenska, T. V. Blashkiv, R. I. Janchy

IN VITRO RESUMPTION OF MEIOTIC MATURATION AND EXTRUDED THE FIRST POLAR BODY IN THE OOCYTES ISOLATED FROM DIFFERENT SIZE FOLLICLES OF MICE AT DIOESTRUS AND OESTROUS

Resumption of the meiotic maturation and extruded the first polar body of the murine oocytes was registered at 2 and 14 hours under culturing in the medium containing 1,7 mM Ca^{2+} . There were differences between the groups in the percentage of GV oocytes with zona pellucida that acquired competence to undergo germinal vesicle breakdown (GVBD) at 2 hr time point 22,2% of «small» and 32,4% of «large» follicles of mouse at dioestrus and, respectively, 28,1 % and 41.8 % follicles of mouse at cestrous underwent GVBD. At 14 time point 21,4% of «small» and 30,3% of «large» follicles of mice at dioestrus and, respectively, 26,1% and 43,6% follicles of mouse at oestrous underwent GVBD and (then) extruded the first polar body (FPB). It may be suggested, that acquisition of competence of the oocytes to resume meiosis *in vitro* depends on the size of follicles and the stage of murine oestrouse cycle. Thus, the largest percentage of GV oocytes resuming meiosis was from «large» follicles of mouse at oestrous.

A.A. Bogomolets Institute of Physiology
National Academy of Ukraine, Kiev

СПИСОК Л

1. Манк. М. Е.
2. Channing C.
cell proper
1978. — 20
3. Donahue R.
nuclear pro
4. Downs S.M.
mouse oocy
for a positi
96.
5. Eppig J. J.
follicles /
6. Eppig J.J.
developme
oocytes /
7. Hirao Y., M
mouse oocy
8. Home C.C.
mouse emb
9. Homa Sh.
Reprod. an
10. Latham K.
in mouse e
velopment
11. Masui Y.
P. 185-282
12. Roy S. K.
follicles fr
P. 236-245
13. Sato E., M
// Jikken
14. Schults R.
synthesis o
1977. — 2
15. Thibault C.
MD: Univ
16. Wickrama
associated
// Dev. E

Ін-т фізіоло
НАН Україн

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Манк. М. Биология развития млекопитающих. Методы. М: Мир. — 1990 — 406 с.
2. Channing C.P., Hillensjo T., Schaerf F.W. Comparison of porcine granulosa and cumulus cell properties: LH/hCG receptors, ability of respond to LH // Biol. Reprod. — 1978. — 20(suppl). — P. 125.
3. Donahue R. P. Maturation of the mouse oocyte *in vitro*. 1. Sequence and timing of nuclear progression // J. Exp. Zool. — 1968. — 169. — P. 237-250.
4. Downs S.M., Daniel S.A.J., Eppig J.J. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin // J. Exp. Zool. — 1988. — 245. — P. 86-96.
5. Eppig J. J., O'Brien M.J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles // Biol. Reprod. — 1996. — 54. — P. 197-207.
6. Eppig J.J., Schultz R.M., O'Brien M., Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes // Dev. Biol. — 1994. — 164. — P. 1-9.
7. Hirao Y., Miyano T., Kato S. Acquisition of maturational competence in *in vitro* grown mouse oocytes // J. Exp. Zool. — 1993. — 267. — P. 543-547.
8. Home C.C., Solter D. Cytoplasmic and nuclear protein synthesis in preimplantation mouse embryos // J. Embryol. Exp. Morphol. — 1979. — 52. — P. 209-225.
9. Homa Sh. T. Calcium and Meiotic Maturation of the Mammalian Oocyte // Mol. Reprod. and Develop. — 1995. — 40. — P. 122-134.
10. Latham K.E., Garrels J.I., Chang C., Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stage // Development. — 1991. — 112. — P. 921-932.
11. Masui Y., Clark H.J. Oocyte maturation // Ins. Rev. Cytol. — 1979. — 57. — P. 185-282.
12. Roy S. K., Greenwald G. S. Methods of separation and *in vitro* culture of pre-antral follicles from mammalian ovaries // Hum. Reprod. Update. — 1996. — 2, № 3. — P. 236-245.
13. Sato E., Miyamoto Y. Cultivation of mouse oocytes *in vitro*: ability to resume meiosis // Jikken Dobutsu. — 1988. — 37. — P. 231-238.
14. Schultz R.M., Wassaman P.M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in mouse // J. Cell. Sci. — 1977. — 24. — P. 167-194.
15. Thibault C.G. Final stages of mammalian oocyte maturation. — In: Oogenesis. Baltimore, MD: University Park Press, 1972. — P. 397-411.
16. Wickramasinghe D., Ebert K.M., Albertini D.F. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes // Dev. Biol. — 1991. — 143. — P. 162-172.

Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 7.07.98