

## КРОЛІВНИЦТВО

УДК 636.082.22/57.08

### **МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ КУЛЬТУРИ ГРАНУЛЬОЗНИХ КЛІТИН КРОЛЕМАТОК ТА ВПЛИВ ОБРОБКИ ЕМП НВЧ НА ДОЗРІВАННЯ ОКК ДО МЕТАФАЗИ-2 ПРИ СОКУЛЬТИВУВАННІ З КЛІТИНАМИ ГРАНУЛЬОЗИ**

**І. І. Гевкан, канд. біол. наук,  
В. Я. Сирватка, Ю. І. Сливчук, канд. вет. наук,  
О.В. Штапенко, канд. с.-г. наук,  
С.В. Федорова, А.М. Нікітенко, д-р вет. наук, професор**

Інститут біології тварин НААН

*Проведеними дослідженнями показано, що для отримання культури клітин гранульози з інтенсивним проліферативним ростом доцільним є використання механічної дезагрегації за допомогою піпетування. Обробка ооцит-кумулясних комплексів та клітин гранульози ЕМП НВЧ впродовж 3-х хвилин перед постановкою на культивування підвищує життєздатність клітин гранульози, знижує рівень лактатдегідрогенази, збільшує вміст кальцію в кондиційному середовищі, а також підвищує частку та якість дозрілих яйцеклітин.*

Ключові слова: гранульоза, ооцити, електромагнітні поля надвисоких частот.

**Постановка проблеми.** Актуальність розробки технології одержання та використання різних типів клітин в ембріональній біотехнології обумовлена необхідністю створення оптимальних умов для дозрівання ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) та культивування ембріонів до трансферабельних стадій. При вилученні ооцита із фолікула порушуються зв'язок між ооцитом та соматичними клітинами, що призводить до змін структури та функцій ооплазми [1]. В умовах *in vivo*, під час підготовки репродуктивних органів самки до прийняття зиготи в дію вступають складні регуляторні системи, що пов'язані з білковими ростовими факторами, які, специфічно взаємодіючи з рецепторами, впливають на каскадний комплекс клітинних реакцій [2]. Створення умов ідентичних до умов *in vivo* можливо за рахунок співкультивування з

клітинами гранульози та пошуку нових альтернативних фізико-хімічних чинників, які здатні забезпечити активацію не тільки проліферативного росту соматичних клітин та їх життєздатності, а й суттєво підвищити кількість дозрілих до метафази-2 ооцитів.

Місцем синтезу та секреції більшості ростових факторів є клітини репродуктивних органів, в тому числі кумулюс та гранульоза. Крім того, клітини гранульози та кумулюсу містять рецептори до різних гормональних і білкових факторів. Ці рецептори відсутні на поверхні ооцита, і, відповідно, соматичні клітини є посередниками у біологічних сигналах між яйцеклітиною та залозами внутрішньої секреції [3].

Сучасні культуральні середовища не здатні у повній мірі забезпечити повноцінне дозрівання ооцитів в умовах *in vitro*. Більше того, вони є неефективними для культивування яйцеклітин з низькою морфологічною якістю і стають своєрідним штучним фактором відбору [4]. Впродовж останніх років закордонними вченими створювалися технології виробництва первинних клітинних культур з репродуктивних органів тварин, в тому числі і фолікулярного походження, для оптимізації умов дозрівання гамет та ембріонів в умовах *in vitro*, що забезпечило підвищення ефективності методів ембріобіотехнології [5].

Моношар клітин гранульози дозволяє створити ефективне мікрооточення навколо гамет та ембріонів і забезпечити їх відповідними гормонами та ростовими факторами для нормального розвитку в умовах *in vitro* [6].

У попередніх дослідженнях було доведено, що додатковим чинником для стимуляції проліферативної активності клітинних культур яйцепроводів овець і корів може бути електромагнітне поле надвисоких частот (ЕМП НВЧ) [7]. Поглинання клітиною та середовищем квантів активує не тільки білкові молекули, активні центри ферментів, ядерну та цитоплазматичну мембрани, а й сприяє структуруванню води в клітинах та позаклітинному просторі, що сприяє підвищенню її біологічної активності, прискоренню синтезу нуклеїнових кислот і одночасно з активацією мембран стимулює мітотичну активність та проліферацію клітинних культур.

З огляду на це, комплексні дослідження зі створення методології одержання культури гранульозних клітин є актуальними, а вивчення впливу на ці процеси електромагнітного поля надвисоких частот дозволить розробити засоби активації проліферативної активності культури, збільшити повноцінність дозрівання гамет до метафази-2 і в подальшому може бути використано для зняття блоку дроблення ранніх ембріонів.

**Мета досліджень.** Розробити ефективний метод одержання культури клітин гранульози кролематок та вивчити вплив обробки

ооцитів електромагнітним полем НВЧ до стадії дозрівання метафаза-2 при співкультивуванні їх з культурою клітин гранульози.

**Матеріал та методика досліджень.** У першому досліді для виконання досліджень проведено відбір яєчників від кролематок віком 7-9 місяців, які належать ТзОВ «Горлиця» с. Добряни Городоцького району Львівської області. Клітини гранульози отримували із фолікулярної рідини після аспірації антральних фолікулів. Аспіровану рідину піддавали маніпуляціям для дезагрегації та очистки від пошкоджених клітин та конгломератів. Оцінку кількості клітин, їх життєздатність та ступінь дезагрегації проводили візуально під мікроскопом після фарбування трипановим синім. Для оцінки ефективності методів одержання було сформовано три дослідні групи, які відрізнялися між собою способами отримання клітин гранульози. Клітини першої дослідної групи піддавали механічній дезагрегації піпетуванням впродовж 3-5хв. піпеткою із внутрішнім діаметром 500 мкм; другої дослідної групи - дезагрегували у 0,25 %-ному розчині трипсину з EDTA; третьої – піддавали диференційному центрифугуванню для осадження конгломератів.

Другий дослід з вивчення впливу електромагнітного поля НВЧ на дозрівання ооцитів до метафази-2 при співкультивуванні їх з культурою клітин гранульози проведено на ОКК, отриманих від кролематок віком 7-9 місяців. Клітини гранульози одержували механічною дезагрегацією піпетуванням. Ооцит-кумулюсні комплекси відмінної та доброї якості після відмивання від фолікулярної рідини поділили на 2 групи по 20 ОКК у кожній. ОКК контрольної та дослідної груп культивували у середовищі ДМЕМ, до якого додавали 10% фетальної сироватки корів; 2,5мкг/мл фолікулостимулюючого гормону; 1,0 мкг/мл естрадіолу; 2,5МОд/мл лютеїнізуючого гормону. Обробку ОКК та клітин гранульози проводили електромагнітним полем надвисокої частоти (30-300ГГц) приладом «Політон» (розробник КПІ) впродовж 3 хвилин. Культивування проводились в CO<sub>2</sub>-інкубаторі за температури 38,5°C та максимальній вологості. Клітини гранульози додавали у кількості 1,0x10<sup>6</sup>. Після 24-х годин культивування проводили морфологічну оцінку якості ОКК. Ступінь дозрівання ооцитів оцінювали за наявності полярного тільця після їх фарбування за методом Романовського-Гімза. Відбирали зразки кондиційного середовища для визначення активності лактатдегідрогенази, концентрації глюкози, кальцію, холестеролу та прогестерону.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Проведений аналіз результатів використання різних методів одержання культури клітин гранульози кролематок показав, що найбільшу кількість життєздатних клітин отримано після механічної та ферментативної дезагрегації. Проте, клітини, які отримували псл

механічної дезагригації піпетуванням та шляхом диференційного центрифугування, проявляли інтенсивніший проліферативний ріст впродовж культивування, ніж клітини гранульози, які піддавали ферментативній обробці трипсином з ЕДТА (табл. 1.). Найбільша кількість життєздатних клітин отримана після піпетування фолікулярної рідини піпеткою із внутрішнім діаметром 500 мкм, після 24 годин культивування їх кількість становила —  $1,343 \pm 0,049 \times 10^6$  клітин/мл. Цей спосіб дезагрегації клітин гранульози було використано у другому досліді.

**Таблиця 1. Кількість життєздатних клітин гранульози при різних методах її отримання ( $M \pm m$ ,  $N=3$ )**

Методи виділення клітин гранульози	Кількість життєздатних клітин в 0,1 мл фолікулярної рідини ( $\times 10^6$ кл./мл)	Початкова посівна концентрація ( $\times 10^6$ кл./мл)	Кількість життєздатних клітин після 24-х год. ( $\times 10^6$ кл./мл)	Індекс проліферації (у. о.)
механічна дезагрегація	$3,283 \pm 0,16$	1,00	$1,343 \pm 0,05$	1,34
ферментативна дезагрегація	$3,630 \pm 0,15$	1,00	$1,22 \pm 0,02$	1,22
диференційне центрифугування	$1,873 \pm 0,36$ *	1,00	$1,32 \pm 0,05$	1,32

Примітка: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; достовірна різниця в порівнянні з групою первинних клітин гранульози, яких отримували шляхом механічної дезагрегації (t-тест Студента)

Проведені дослідження з вивчення впливу електромагнітного поля НВЧ на дозрівання ОКК до метафази-2 при співкультивуванні їх з культурою клітин гранульози показали, що обробка ОКК та клітин гранульози ЕМП НВЧ протягом 3-х хвилин перед початком культивування підвищує кількість життєздатних клітин, що підтверджується змінами деяких біохімічних показників середовища після дозрівання. Так, активність лактатдегідрогенази після 24-х годин культивування була вірогідно ( $p < 0,01$ ) нижчою —  $93,27 \pm 2,75$  МО/л проти  $112,27 \pm 2,37$  МО/л у контролі, тоді як, концентрація Са — вищою ( $p < 0,05$ ), що вказує на покращення життєздатності клітин гранульози (табл. 2). В усіх групах не було виявлено різниці у концентрації глюкози, холестеролу, прогестерону та кількості життєздатних клітин гранульози. Також встановлено, що під впливом обробки ооцитів та клітин гранульози електромагнітним полем НВЧ на 15 % зростає кількість яйцеклітин, які дозріли до метафази-2, причиною чого ймовірно є краще забезпечення ОКК відповідними гормонами та ростовими факторами в результаті підвищення кількості життєздатних клітин культури клітин гранульози.

**Таблиця 2 Кількість життєздатних клітин гранульози, показники кондиційного середовища та кількість яйцеклітини дозрілих до метафази-2 після 24-х годин культивування за умов обробки ОКК та клітин гранульози ЕМП НВЧ протягом 3-х хвилин перед початком культивування. (M±m, N=3)**

Групи	Кількість життєздатних клітин (x10 <sup>6</sup> кл./мл)	Лактат дегідрогеназа (МО/л)	Са (нМоль/л)	Глюкоза (мМоль/л)	Холестерол (мМоль/л)	Прогестерон нг/мл/x10 <sup>6</sup> клітин	Яйцеклітин дозрілих до метафази-2, n(%)
Контроль	1,31±0,02	112,27±2,37	1,8±0,02	5,23±0,03	1,33±0,03	79,83±5,34	(70)14
ЕМП НВЧ	1,38±0,02	93,27±2,75**	1,7±0,01*	5,17±0,15	1,32±,002	84,03±6,66	(85)17

Примітка: \* P<0,05; \*\*P<0,01; достовірна різниця в порівнянні з контролем

Подальші дослідження мають виявити перспективи використання прийому обробки ооцитів і клітин гранульози електромагнітним полем НВЧ та сокультивування гамет з гранульозними клітинами *in vitro*, для підвищення повноцінності дозрівання ооцитів і подолання блоку розвитку ранніх ембріонів.

#### **Висновки та перспективи досліджень:**

1. Для отримання культури інтенсивного проліферативного росту та посилення життєздатності клітин гранульози більш доцільним є використання механічної дезагрегації клітин піпетуванням.

2. Обробка ооцит-кумулясних комплексів і клітин гранульози ЕМП НВЧ впродовж 3-х хвилин перед постановкою на культивування знижує рівень лактатдегідрогенази і підвищує рівень кальцію у кондиційному середовищі, покращує життєздатність клітин гранульози, а також збільшує кількість та підвищує якість дозрілих до метафази-2 яйцеклітин.

#### **Список використаної літератури**

1. Thibodeaux J.K., Myers H.W., White K.L. Effect of a serum extender containing growth factors on development of IVM and IVF bovine embryos. // *Theriogenology* .-1995.- Vol.44. - №3. -P.423-432.

2. Monniaux D., Monget P., Besnard N. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. // *Theriogenology*.-1997.- Vol.47. - №1.-P.3-12.

3. Lackey B., Gray D., Henricks N. Physiological basis for use on IGFs in reproductive application: A Review. // *Theriogenology*.-2000.- Vol.53. - №5.-P.1147-1156.

4. D. L. Russell and R. L. Robker. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex // *Human Reproduction Update*. – 2007. – Vol.13. – № 3. P. 289 – 312.

5. Dandekar P.V., Martin M.C., Glass R.H. Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa-cells // *Fertility and Sterility*. – 1991. – Vol.55. – №11. – P. 95-99.

6. K. R. Dunning, M. Lane, H. M. Brown, C. Yeo, R. L. Robker, and D. L. Russell. Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during *in vitro* maturation of oocytes // *Human Reproduction*. – 2007. – Vol.22. – №11. – P. 2842 – 2850.

7. Гевкан І. І., Сливчук Ю. І., Розгоні, І. І., Штапенко О.В., Нікітенко А. М., Сирватка В. Я., Мілованова Г. О. Електромагнітні поля надвисокої частоти, як стимулятори активності проліферативного росту культури клітин яйцепроводів корів // *Вісник Білоцерківського Державного аграрного університету, м. Біла Церква, 2008, В.58. — №3 –С. 78-83.*