

УДК 591.391

КОРЕЛЯЦІЯ МЕЙОТИЧНОГО ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ МИШЕЙ З УМОВАМИ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO*

I. V. Lobachova
livr@rambler.ru

Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова «Асканія-Нова» —
ННСГЦВ, вул. Червоноармійська, 1, смт Асканія-Нова, Чаплинський р-н,
Херсонська обл., 75230, Україна

Оцінено рівень кореляції показника дозрівання *in vitro* ооцитів рандомно схрещених (C57BL×CBA) мишей до стадії метафаза 2 (M2) з наступними параметрами культивування: об'ємом культуральної краплі, концентрацією у середовищі ФСГ, ХГ, естрадіолу, пірувату, лактату, глюкози, БСА, сироватки крові. Основою культурального середовища було SOF, яке доповнювали сумішшю амінокислот, антибіотиками, глютаміном. Ооцити культивували окремими групами, одні з яких складали ооцити з кумулюсом, інші — оголені. Аналіз результатів проводили з урахуванням наявності/відсутності сироватки у середовищі. Показник M2 і ступінь його зв'язку з умовами культивування виявили залежність від початкової морфології ооцитів. Як за безсироваткових варіантів культивування, так і за сироваткових частка клітин, хромосоми яких досягли стадії M2, у групі ооцитів з кумулюсом була вірогідна вища, за аналогічний показник оголених ооцитів. M2 помірно ($0,3 < r < 0,5$) негативно корелював з об'ємом культуральної краплі, помірно позитивно — з

вмістом пірувату та глюкози, слабо ($r < 0,3$) — з концентрацією гонадотропних гормонів та лактату. Суттєвий ($p < 0,05$) позитивний вплив на мейотичне дозрівання ооцитів з кумулюсом мав вміст енергетичних речовин і сироватки, суттєвий негативний вплив — об'єм культуральної краплі та вміст естрадіолу; на дозрівання оголених ооцитів значний позитивний вплив мав вміст енергетичних речовин, значний негативний — об'єм культуральної краплі. Встановлено, що морфологічні параметри кумулюсу ооцитів, підданих мейотичному дозріванню *in vitro*, з різним ступенем корелюють з показником M2 та умовами культивування і можуть бути використані як додаткові критерії оцінки якості процедури дозрівання.

Ключові слова: МИША, ООЦИТ, МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ, *IN VITRO*, ОБ'ЄМ КРАПЛІ, ГОРМОНИ, ГЛЮКОЗА, ПІРУВАТ, ЛАКТАТ, БСА, СИРОВАТКА, КОРЕЛЯЦІЯ

THE CORRELATION OF MOUSE OOCYTE MEIOTIC MATURATION WITH CULTURE CONDITIONS *IN VITRO*

I. V. Lobachova
livr@rambler.ru

The Ivanov's Institute of Animal Breeding in Steppe Regions «Ascania-Nova»
st. Chervonoarmiyska 1, Ascania-Nova, Charlynsky r., Kherson pr., 75230 Ukraine

It had been estimated the correlation of the index of in vitro meiotic maturation (M2) of oocyte of random crossed (C57BL×CBA) mouse with the following culture parameters: culture drop volume, concentrations of FSH, LH, estradiol, pyruvate, lactate, glucose, BSA, blood serum. Basis of

culture medium was SOF added aminoacids, antibiotics, glutamine. Oocytes were cultured by isolated groups — oocytes surrounded cumulus and denuded oocytes. Analysis was carried with due regard for presence/absence serum in culture medium. M2 index and rate of correlation of M2

with the culture conditions had exhibited dependence with the start morphology of oocytes. Both in non-serum and serum culture variants the part of oocytes which chromosomes achieved M2 stage in the oocyte surrounded group was more than in the oocyte denuded group. M2 moderate ($0,3 < r < 0,5$) negatively correlated with the culture drop volume, moderate positively — with the pyruvate and glucose contents, weakly ($r < 0,3$) — with concentration of gonadotropins and lactate content. Meiotic maturation of oocyte surrounded cumulus was significant ($p < 0,05$) positively affected the contents of energetic components and serum, significant negatively — the culture drop volume and estradiol content; maturation of

denuded oocytes was significant positively affected the contents of energetic components, significant negatively — the culture drop volume. It was discovered that morphological parameters of cumulus of oocytes matured in vitro with different rate correlate with M2 index and culture conditions and may be to use as additional criteria for estimation of maturation procedure quality.

Keywords: MOUSE, OOCYTE, MEIOTIC MATURATION, IN VITRO, DROP VOLUME, HORMONES, GLUCOSE, PYRUVATE, LACTATE, BSA, SERUM, CORRELATION

КОРРЕЛЯЦІЯ МЕЙОТИЧЕСКОГО СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ МЫШЕЙ С УСЛОВИЯМИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

И. В. Лобачева
livr@rambler.ru

Институт животноводства степных районов им. М.Ф. Иванова «Аскания-Нова» — ННСГЦО, ул. Красноармейская 1, пгт Аскания-Нова, Чаплинский р-н, Херсонская обл., 75230 Украина

Оценен уровень корреляции показателя *in vitro* дозревания до стадии метафаза 2 (M2) ооцитов рандомно скрещенных (C57BL×CBA) мышей со следующими параметрами культивирования: объем культуральной капли, концентрация в среде ФСГ, ХГ, эстрадиола, пирувата, лактата, глюкозы, БСА, сыворотки крови. Основой культуральной среды была среда SOF, которую дополняли смесью аминокислот, антибиотиками, глутамином. Ооциты культивировали отдельными группами, одни из которых состояли из ооцитов окруженных кумулюсом, другие — из оголенных. Анализ результатов проводили с учетом присутствия/отсутствия сыворотки в культуральной среде. Показатель M2 и степень его связи с условиями культивирования проявили зависимость от начальной морфологии ооцитов. Как при безсывороточных вариантах культивирования, так и при сывороточных часть клеток, хромосомы которых достигли стадии M2, в группе ооцитов с кумулюсом была достоверно большей аналогичного показателя оголенных ооцитов. M2 умеренно ($0,3 < r < 0,5$) отрицательно коррелировал с объемом капли, умеренно положительно — с содержанием пирувата и глюкозы, слабо ($r < 0,3$) — с концентрацией гонадотропных гормонов и

содержанием лактата. Значимое ($p < 0,05$) положительное влияние на мейотическое созревание ооцитов с кумулюсом оказывало содержание энергетических веществ и сыворотки, значимое негативное влияние — объем культуральной капли и содержание эстрадиола; на созревание оголенных ооцитов значимое положительное влияние оказывало содержание энергетических веществ, значимый негативный — объем культуральной капли. Установлено, что морфологические параметры кумулюса ооцитов, подвергнутых мейотическому дозреванию *in vitro*, с различной степенью коррелируют с показателем M2 и условиями культивирования и могут быть использованы как дополнительные критерии оценки качества процедуры созревания.

Ключевые слова: МЫШЬ, ООЦИТ, МЕЙОТИЧЕСКОЕ СОЗРЕВАНИЕ, *IN VITRO*, ОБЪЕМ КАПЛИ, ГОРМОНЫ, ГЛЮКОЗА, ПИРУВАТ, ЛАКТАТ, БСА, СЫВОРОТКА, КОРЕЛЛЯЦИЯ

Відомо, що хромосоми вилучених із антральних фолікулів ооцитів ссавців здатні спонтанно поновити і закінчити мейоз після культивування у простому за складом середовищі [9]. Доповнення

культурального середовища біологічно активними речовинами прискорює або гальмує мейотичні перетворення, а визначення закономірностей дії цих речовин сприятиме вдосконаленню процедури культивування ооцитів поза організмом. Хоча дослідниками вже отримано багато даних щодо особливостей процесу мейотичного дозрівання ооцитів ссавців, їх порівняння не завжди правомірне з причини відмінностей типу застосованого базового середовища, концентрації доданих речовин, їх джерела і навіть фізичних умов культивування. Уніфікація умов дозрівання дозволить з'ясувати як вплив кожного з компонентів окремо, так і в комплексі.

Розвиток ооцитів поза організмом залежить від гормонів, енергетичних речовин, протеїнів. Серед гормонів найбільшу дію мають гонадотропні [10, 14] і стероїдні [5] гормони. Для енергетичного живлення показано важливу роль глюкози [17], пірувату, лактату [7] та деяких проміжних субстратів циклу Кребса [6]. Як джерело протеїнів до середовищ додають амінокислоти [11], сироватковий альбумін [3], фолікулярну рідину [12] та сироватку крові [15]. Остання, крім протеїнів, містить також певні ензими, речовини ліпідної та вуглеводної природи, співвідношення вмісту яких коливається, що обумовлює нерівнозначність впливу сироватки і є причиною бажання дослідників усунути її із складу середовищ.

Не дивлячись на багато робіт, які розкривають механізми впливу окремих речовин, досліджень з визначення їх взаємної дії недостатньо. Оцінити це дозволяє встановлення парних та множинних кореляційних зв'язків.

Мета дослідження — визначити характер кореляційних зв'язків показника досягнення ооцитами стадії метафаза 2 (M2), морфологічних параметрів кумулюсу з параметрами культивування, зокрема об'ємом культуральної краплі, вмістом гормональних, енергетичних та білкових речовин.

Матеріали і методи

Дослідження виконано на культивованих поза організмом ооцит-кумулюсних комплексах (далі — ооцити), отриманих від рандомно схрещених

(C57BL×CBA) 4-8-місячних мишей. Тварин забивали зміщенням шийних хребців. Для кожної процедури культивування забивали не менш двох тварин. Ізольовані яєчники поміщали в середовище з гепарином і подрібнювали лезом. Знайдені під мікроскопом ооцит-кумулюсні комплекси двічі відмивали у свіжих краплях відмивного середовища, оцінювали за категорією та поділяли на групи. Ооцити кожної групи тричі відмивали у свіжих краплях культурального середовища і переносили на мейотичне дозрівання.

Ооцит-кумулюсні комплекси культивували у середовищі SOF з солями за Tervit H. R. et al. [18], яке доповнювали сумішшю основних (MEM, «Sigma», M7145, 1 % від об'єму) та базових (BME, «Sigma», B6766, 1 % від об'єму) амінокислот, антибіотиками (пеніцилін, стрептоміцин), глютаміном (1 мг/мл, «Reaxim»). Речовинами, вміст яких у середовищі варіював, були: фолікулостимулюючий гормон (ФСГ, «Sigma», F2293), хоріонічний гормон (аналог лютеїнізуючого, ХГ, «Sigma», C1063), естрадіол («Sigma», E2758), сироватковий альбумін бугая (БСА, «Sigma», A9647), сироватка крові (естральна КРС, яку виготовляли самостійно, або фетальна, «Sigma», F2442), піруват натрію («Sigma», P4562), лактат натрію («Sigma», L4263), глюкоза («Sigma», G7021). Концентрація ФСГ за різних варіантів становила — 0, 1, 5 або 10 мкг/см³, ХГ — 0, 1, 5 або 10 мкг/см³, естрадіолу — 0, 0,5, 1 або 5 мкг/см³, БСА — 2, 3 або 4 мг/см³, сироватки — 0, 5, 10 % від об'єму, пірувату натрію — 0, 0,03, 0,1 або 0,3 мг/см³, лактату натрію — 0, 0,39, 0,78 або 1,56 мг/см³, глюкози — 0, 0,1 або 1 мг/см³.

Вилучені ооцит-кумулюсні комплекси оцінювали за морфологією клітин кумулю та станом цитоплазми відповідно до розробленої класифікації [1]. До першої категорії (I) відносили ооцити, оточені більше ніж 3 шарами кумулюсних клітин з чітким контуром яйценосного горбика, до другої (II) — ооцити з 2–3-шаровим кумулюсом без оголених ділянок зони пелюциду. Четверту категорію (IV/IVKK) склали ооцити з відсутністю

кумулясних клітин (IV) або з їх незначною кількістю (IVKK). Умовою використання усіх ооцитів була наявність у цитоплазмі зародкового міхурця, а також відсутність ознак дегенерації, зокрема нерівномірності забарвлення цитоплазми ооцита або збільшення в кілька разів міжклітинних відстаней у кумулюсі.

Для виявлення особливості впливу кумулюсу культивування ооцитів проводили роздільно двома групами: першу становили ооцити I та II категорій, другу — ооцити IV категорії.

Ооцит-кумулясні комплекси культивували в ексікаторі за температури 38 °С, 100 % вологості та 5 % вмісту вуглекислого газу у повітрі. Тривалість процедури мейотичного дозрівання становила 17–18 годин, після якої ооцити оцінювали за станом хромосом та морфологією кумулюсних клітин.

Стан хромосом культивованих ооцитів оцінювали за Tarkowsky A. (1955), морфологічні параметри — візуально під мікроскопом. Морфологічними параметрами, які визначали після культивування, були: розростання кумулюсу по дну чашки, експансія кумулюсу, легкість відокремлення кумулюсних клітин від ооцита при обережному піпетуванні.

Розростання кумулюсу («РозКК») оцінювали в умовних одиницях (у.о.) за шкалою від 0 (відсутність прикріплення кумулюсних клітин до дна чашки) до 3 (розростання клітин з утворенням щільного моношару). При цьому враховували лише характер розростання фолікулярних клітин біля ооцит-кумулясних комплексів, не беручи до уваги стан ізольованих скупчень.

Експансію кумулюсу («ЕксКК») оцінювали візуально в у.о. за шкалою від 0 (повна відсутність ознак розрідження) до 3 (добре виражені ознаки розрідження зі збільшенням зовнішнього діаметра кумулюсу у 1,5–2 рази).

Легкість відокремлення кумулюсу («ВідКК») оцінювали в у.о. суб'єктивно за результатами відокремлення клітин від ооцитів при піпетуванні останніх за шкалою від 0 (клітини не

відокремлювалися зовсім) до 3 (клітини відходили після 3–5 піпетувань повністю).

Статистичну обробку результатів, визначення ступеню кореляції та регресійний аналіз даних проводили за допомогою математичної програми «Excel» пакету «Microsoft Office 2010», встановлення вірогідності відмінності (р) показників з вирахуванням коефіцієнта Стьюдента (t_d) за М. О. Плохінським (1961), встановлення вірогідності коефіцієнтів регресійних рівнянь з вирахуванням Р-значень (для $p < 0,05$).

Результати й обговорення

На першому етапі встановлювали залежність дозрівання ооцитів від їх категорії (табл. 1). Оскільки додавання сироватки суттєво впливало на морфологічні параметри кумулюсних клітин, результати дослідів додатково поділили відповідно до наявності/відсутності сироватки у культуральному середовищі. Інші відмінності складу середовищ при цьому аналізі до уваги не брали.

Як у загальному підсумку (+/-) ($t_d=3,58$, $p < 0,05$), так і окремо у сироваткових ($t_d=4,38$, $p < 0,05$) і безсироваткових ($t_d=2,60$, $p < 0,05$) варіантах частка ооцитів, що досягли стадії метафаза 2, в групі ооцитів з кумулюсом була вища за аналогічну в групі оголених клітин. Така закономірність була очікуваною і підтверджує результати інших дослідників [14]. Категорія ооцитів також проявила здатність модифікувати дію сироватки. Так, у групі ооцитів з кумулюсом (I та II категорії) додавання сироватки вірогідно збільшувало частку ооцитів з хромосомами на стадіях діакінезу-метафази 1 ($t_d=2,99$, $p < 0,05$) і зменшувало частку мейотично зрілих клітин (M2, $t_d=2,70$, $p < 0,05$). У групі оголених ооцитів (IV/IVKK категорія) додавання сироватки виявило протилежний вплив, хоча різниця між сироватковими і безсироватковими варіантами не була вірогідна. Додавання сироватки вірогідно змінювало морфологічні параметри кумулюсу в групі ооцитів з кумулюсом,

зокрема посилювало розростання ($t_d=24,66$, $p<0,05$) та експансію клітин ($t_d=6,25$, $p<0,05$) і погіршувало їх відокремлення ($t_d=3,79$, $p<0,05$). Отже, за наявності кумулюсу вплив сироватки був позитивним, за відсутності — негативним. Можна констатувати, що саме кумулюсу належить роль трансформації дії сироватки.

На другому етапі вивчено ступінь кореляції показника дозрівання ооцитів (M2) зі вмістом у середовищі мейотичного дозрівання певних речовин за припущенням лінійного характеру такої залежності (табл. 2). Як і для таблиці 1 групи даних було поділено відповідно до категорії ооцитів і наявності/відсутності сироватки у середовищі.

Збільшення об'єму культуральної краплі негативно впливало на показник M2, при цьому коефіцієнт кореляції майже за всіх варіантів був помірного рівня ($0,3<r<0,5$ за Чеддоком). За загальними підсумками коефіцієнт кореляції між показником M2 і об'ємом краплі для ооцитів з кумулюсом майже не різнився з аналогічним для оголених ооцитів, що свідчить про однакову важливість для клітин усіх категорій аутокринних і паракринних факторів, що синтезуються самим ооцитом. Додавання сироватки незначно зменшувало негативний вплив збільшеного об'єму, при цьому для оголених ооцитів внесення сироватки діяло більш помітно. Ймовірно, сироватка містила певні речовини, які оголеними ооцитами синтезувалися у недостатній кількості.

Концентрація фолікулостимулюючого гормону проявила слабу ($r<0,3$) кореляцію з показником M2 за всіх варіантів. Зміна напряму дії ФСГ з позитивної на негативну при внесенні сироватки, можливо, свідчить про конкурентні відносини цього гормону з окремими компонентами сироватки, зокрема факторами росту. Концентрація хоріонічного гормону за безсироваткових варіантів мала слабу позитивну кореляцію з M2 ооцитів обох груп. Доповнення середовища сироваткою збільшувало

залежність M2 від вмісту ХГ, при цьому в групі ооцитів з кумулюсом цей зв'язок набував помірного рівня. Отже, додавання сироватки посилювало роль гонадотропіну при дозріванні ооцитів. Естрадіол майже не впливав на розвиток ооцитів з кумулюсом, але проявив помірну негативну кореляцію з M2 у групі оголених ооцитів за умов додавання сироватки.

Серед енергетичних речовин стабільний позитивний вплив на розвиток ооцитів з кумулюсом відмічено при додаванні глюкози [8]. Можна припустити, що незначне зменшення коефіцієнта кореляції за умов додавання до середовища сироватки, вказує про можливість її використання як джерела додаткової глюкози або ферментів, що беруть участь в її утилізації. В групі оголених ооцитів показник M2 мав слабкий зв'язок зі вмістом глюкози і це підтверджує, що глюкоза не є основним енергетичним субстратом для цього типу ооцитів [6]. Незначне підвищення значення коефіцієнта кореляції при додаванні сироватки можна пояснити появою у середовищі ферментів, що опосередковують утилізацію глюкози, або речовин, які полегшують транспорт глюкози до цитоплазми ооцитів.

Піруват виявив помітний ($0,5<r<0,7$) позитивний зв'язок з показником M2 у групі оголених ооцитів за обох («-» та «+») варіантів середовищ, що підтверджує його основну енергетичну роль для цього типу клітин. У групі ооцитів з кумулюсом додавання сироватки змінювало кореляцію показника M2 зі вмістом пірувату з позитивної на негативну, тобто за додавання сироватки піруват діяв негативно, можливо, за рахунок пригнічення певних ділянок енергетичного обміну. Додавання сироватки змінювало залежність M2 від вмісту лактату з позитивної на негативну. Враховуючи, що лактат є кінцевим продуктом анаеробного розщеплення глюкози, можна припустити, що збільшення його вмісту гальмує процес гліколізу, можливо, включаючи інші механізми утилізації глюкози.

Таблиця 1

Результати мейотичного дозрівання ооцитів мишей за різних умов культивування

Наявність сироватки	N/n*	Частка ооцитів з хромосомами на стадії, %				Морфологічний параметр, бал		
		диплотена	діакінез — метафаза 1	анафаза	телофаза — метафаза 2	РозКК	ЕксКК	ВідКК
I, II категорії								
+	22/ 257	13,19±4,32	22,02±3,09 ^a	2,00±1,02	63,27±5,92 ^a	2,60±0,09 ^a	1,83±0,14 ^a	1,62±0,15 ^a
-	207/ 2294	18,90±1,64	32,47±1,62 ^b	1,90±0,35	46,29±2,09 ^b	0,26±0,03 ^b	0,90±0,05 ^b	2,22±0,05 ^b
загалом (+/-)	229/ 2551	18,38±1,54 ^c	31,51±1,51 ^c	1,91±0,33	47,86±1,99 ^c	--	--	--
IV/IVKK категорія								
+	22/ 331	35,32±5,49	29,36±4,17	5,43±3,64	29,89±4,79	--	--	--
-	235/ 3225	38,96±2,32	21,66±1,35	0,86±0,26	38,61±2,09	--	--	--
загалом (+/-)	257/ 3556	38,65±2,17 ^d	22,31±1,29 ^d	1,25±0,39	37,86±1,96 ^d	--	--	--

Примітка: * — тут і далі: N — кількість процедур культивування, n — кількість культивованих ооцитів. Дані в одній колонці з різними субскриптами (a:b та c:d) різняться між собою з рівнем вірогідності не менше $p < 0,05$

Таблиця 2

Коефіцієнти лінійної кореляції Пірсона (r) показника дозрівання ооцитів мишей до стадії метафаза 2 (M2) з умовами культивування і морфологічними параметрами культивованих ОКК*

Наявність сироватки	N/n	Параметр, з яким визначалася кореляція показника M2**											
		об'єм краплі	концентрація у середовищі							морфологічний параметр			
			ФСГ	ХГ	естрадіолу	пірувату	лактату	глюкози	БСА	сироватки	РозКК	ЕксКК	ВідКК
I, II категорії													
+	22/ 257	-0,398	-0,129	0,312	0,064	-0,011	-0,058	0,312	-0,422	-0,129	0,080	0,495	0,400
-	207/ 2294	-0,419	0,094	0,033	-0,125	0,416	0,233	0,375	-0,038	--	0,083	0,396	0,344
загалом	229/ 2551	-0,421	0,062	0,005	-0,140	0,381	0,218	0,336	-0,058	--	0,172	0,425	0,290
IV/IVKK категорія													
+	22/ 331	-0,201	-0,019	0,210	-0,417	0,540	-0,201	0,210	-0,240	-0,019	--	--	--
-	235/ 3225	-0,472	0,019	0,017	-0,018	0,652	0,183	0,112	0,019	--	--	--	--
загалом	257/ 3556	-0,447	0,013	0,036	-0,077	0,646	0,160	0,122	-0,037	--	--	--	--

Примітка: * — жирним шрифтом відмічено показники, які набували помірного рівня за шкалою Чеддока ($0,3 < r < 0,5$). ** — діапазон зміни параметрів наведено у тексті

У цілому зв'язок показника дозрівання з концентрацією лактату для ооцитів обох груп був слабшим за зв'язок зі вмістом пірувату чи глюкози, що свідчить про його неосновну роль в енергетичному забезпеченні розвитку ооцитів.

Негативний вплив на розвиток ооцитів з кумулюсом відмічено при збільшенні концентрації БСА. За додавання сироватки коефіцієнт кореляції БСА з М2 набував помірного рівня. Можна припустити, що причиною останнього були конкурентні відносини між БСА і протеїнами сироватки. Варіювання концентрації сироватки у середовищі слабо негативно корелювало з показником М2 для обох груп ооцитів.

Таким чином, об'єм краплі стабільно негативно, а концентрація ХГ і глюкози стабільно позитивно корелювали з кількістю ооцитів, які досягли стадії метафаза 2. Ступінь кореляції М2 з іншими параметрами культивування залежала від категорії ооцитів (наявності шару кумулюсних клітин) і вмісту сироватки у середовищі. Слід, проте, враховувати, що наведені у таблиці 2 коефіцієнти кореляції обраховані за припущенням лінійного характеру залежності. Між тим, за нашими спостереженнями, залежність між М2 і, наприклад, концентрацією пірувату різниться від лінійної і, отже, реальний ступінь зв'язку має бути більшим.

Представлені у таблиці 2 дані відображають парні кореляційні зв'язки показника М2 з окремими параметрами культивування, але за ними важко оцінити залежність дозрівання ооцитів одночасно від кількох параметрів. Для оцінки останньої проведено регресійний аналіз даних. Оскільки абсолютні значення параметрів культивування різнилися, для адекватного визначення частки впливу кожного з них числові значення параметрів були нормовані шляхом поділу на найбільше використане значення кожного з параметрів (для ФСГ це 10, для пірувату 0,3 і т. д.). Таким чином, значення кожного з параметрів коливалися від 0 до 1. Як і у попередньому дослідженні, аналіз

проводили з врахуванням категорії ооцитів і наявності/відсутності сироватки у середовищі. У таблиці 3 подано обраховані коефіцієнти множинної кореляції (R) і детермінації (R^2), а також рівняння множинної регресії для кожного варіанту. Жирним шрифтом виділено параметри, які для кожної відповідної моделі були значимі з рівнем вірогідності $p < 0,05$, тобто їх зміна вірогідно супроводжувалася значимою (з рівнем вірогідності $p < 0,05$) зміною показника М2.

Як показують наведені дані, як для ооцитів з кумулюсом, так і для оголених усунення сироватки із складу середовищ посилювало детермінованість показника М2 використаними при аналізі параметрами. За загальним підсумком детермінованість показника М2 у групі оголених ооцитів була вища і сягала задовільного рівня ($R^2 > 0,5$). У групі ооцитів з кумулюсом детермінованість була нижчою, що свідчить про неврахування специфічного впливу соматичних клітин, що цілком закономірно.

Аналіз рівнянь множинної регресії дозволив встановити значний вплив раніше неврахованих чинників для сироваткових варіантів, які у випадку безсироваткових варіантів дослідів були незначимими ($p < 0,05$). За безсироваткових варіантів показник М2 проявляв негативну залежність від об'єму культуральної краплі і позитивну від збільшення концентрації усіх трьох типів енергетичних речовин. Винятком з останнього були сироваткові варіанти культивування ооцитів з кумулюсом, в яких зростання вмісту лактату впливало негативно. Залежність М2 від концентрації ХГ у всіх варіантах була позитивною, тоді як зв'язок зі вмістом ФСГ модифікувався додаванням сироватки. Збільшення концентрації естрадіолу у всіх варіантах негативно впливало на компетентність до дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів *in vitro*.

За загальним підсумком (-/+) у групі ооцитів з кумулюсом на показник М2 позитивний незначний вплив відмічено при збільшенні концентрації ХГ і БСА,

позитивний значний — при підвищенні вмісту енергетичних речовин і сироватки, негативно несуттєво впливало збільшення концентрації ФСГ, негативно значно — зростання вмісту естрадіолу і об'єму краплі. У групі ооцитів без кумулюсу позитивний незначний вплив спостерігався

при збільшенні концентрації ФСГ, ХГ і БСА, позитивний значний — при зростанні вмісту пірувату, лактату і глюкози, негативно незначний — при підвищенні концентрації естрадіолу та сироватки і негативно значний — при збільшенні об'єму культуральної краплі.

Таблиця 3

Рівняння множинної регресії і коефіцієнти множинної кореляції показника М2 з параметрами культивування

Наявність сироватки	N	R	R ²	Рівняння множинної регресії*
<i>I, II категорії</i>				
+	22	0,576	0,331	$M2=68,40+0,00Ob'ем-15,14ФСГ+8,43ХГ-5,65Естр+14,78Пір-0,09Лакт+0,0Гл+0,0БСА+0,0Сироват$
-	207	0,685	0,469	$M2=30,31-11,87Об'ем+0,42ФСГ+1,78ХГ-3,71Естр+30,58Пір+13,05Лакт+26,65Гл-4,91БСА$
загалом	229	0,664	0,440	$M2=5,21-14,36Об'ем-1,25ФСГ+0,53ХГ-5,77Естр+28,79Пір+12,49Лакт+23,07Гл+35,25БСА+24,22Сиров$
<i>IV/IVKK категорія</i>				
+	22	0,649	0,421	$M2=22,94+0,00Ob'ем-2,38ФСГ+12,70ХГ-20,66Естр+24,12Пір+0,41Лакт+0,0Гл+0,0БСА+0,0Сиров$
-	235	0,765	0,585	$M2=-7,86-20,98Об'ем+0,18ФСГ+2,25ХГ-7,07Естр+43,61Пір+9,62Лакт+10,41Гл+40,68БСА$
загалом	257	0,760	0,578	$M2=-7,22-20,94Об'ем+0,45ФСГ+2,40ХГ-7,88Естр+42,78Пір+9,73Лакт+10,43Гл+40,33БСА-4,81Сиров$

Примітка. *використані скорочення: Естр — концентрація естрадіолу, Пір — пірувату, Лакт — лактату, Гл — глюкози, БСА — бичачого сироваткового альбуміну, Сиров — сироватки крові

Хоча остаточним показником мейотичного дозрівання є наявність полярного тіла у перівітеліновому просторі ооцитів і досягнення хромосомами стадії метафаза 2, запропоновано додатково оцінювати якість процедури культивування за морфологією кумулюсу, зокрема за його розростанням, експансією та легкістю відокремлення [2]. Як показали результати таблиці 1, морфологічні параметри кумулюсу після процедури дозрівання сильно залежать від наявності сироватки у середовищі. Разом з тим, за даними таблиці 2 як за сироваткових, так і за безсироваткових варіантів кількість мейотично зрілих ооцитів (М2) помірно корелювала з експансією та легкістю відокремлення кумулюсних клітин і майже не залежала від ступеня їх розростання. Отже, умови, які посилюють експансію та полегшують відокремлення, мають сприяти і збільшенню показника М2 і, навпаки, умови, які сприятимуть розростанню

кумулясних клітин, будуть діяти негативно на М2.

Для визначення зв'язку зазначених морфологічних показників з умовами культивування обраховано коефіцієнти їх парної кореляції (*r*) за припущенням лінійного характеру такої залежності (табл. 4). Як і очікувалося, розростання кумулюсу з високим ступенем ($0,7 < r < 0,9$) корелювало з концентрацією сироватки у середовищі і, несподівано, близько до помірного рівня з концентрацією естрадіолу. Зв'язок цього морфологічного параметра з іншими параметрами культивування був слабким. Враховуючи дані таблиці 2 щодо слабкої кореляції показника М2 з розростанням кумулюсу і негативною з концентрацією сироватки, можна припустити, що наявність сироватки у середовищі мейотичного дозрівання не є обов'язковою.

Ступінь експансії кумулюсу помірно позитивно корелював зі вмістом у середовищі глюкози і ФСГ, що підтверджує

дані інших авторів про вплив цих речовин на здатність клітин кумулюсу до повноцінної експансії [16]. Позитивна кореляція експансії зі вмістом сироватки може частково обумовлюватися, на нашу думку, тим, що сироватка може виступати додатковим джерелом глюкози. Цікаво, що за даними таблиці 2 показник M2 позитивно корелював з експансією і негативно з концентрацією ФСГ, тоді як експансія позитивно корелювала зі вмістом гонадотропіну. Можна припустити, що збільшення показника M2 при посиленні експансії кумулюсу обумовлено не просто зменшенням щільності прилягання клітин, а можливою зміною їх функціональної активності.

Легкість відокремлення кумулюсу найбільш негативно корелювала зі вмістом

у середовищі естрадіолу та сироватки і найбільш позитивно — з концентрацією пірувату. Цікаво, що цей параметр порізно корелював зі вмістом гонадотропних гормонів: ФСГ погіршувало відокремлення, ХГ — покращувало. Враховуючи, що легкість відокремлення значною мірою пов'язана зі зменшенням і потоншенням цитоплазматичних містків між ооцитом і кумулюсними клітинами, що спостерігається при дозріванні ооцитів *in vivo* [13], можна вважати, що ХГ сприяє відокремленню, а ФСГ — протидіє. Це доводить, що відома здатність ФСГ гальмувати мейотичні перетворення хромосом [4] опосереднюється міжклітинними контактами між ооцитом і кумулюсом.

Таблиця 4

Коефіцієнти лінійної кореляції Пірсона (*r*) морфологічних параметрів кумулюсу з умовами культивування (N/n=229/ 2551)

Параметр умов культивування		Морфологічний показник культивованих ооцитів, кореляція з яким визначалася		
		РозКК	ЕксКК	ВідКК
об'єм краплі		-0,138	-0,153	-0,161
концентрація у середовищі	ФСГ	0,062	0,345	0,139
	ХГ	-0,072	0,192	0,020
	естрадіолу	0,249	0,077	-0,290
	пірувату	-0,084	-0,005	0,258
	лактату	-0,002	0,022	0,012
	глюкози	0,106	0,470	0,019
	БСА	0,100	0,098	-0,043
	сироватки	0,814	0,315	-0,286

Таким чином, компетентність ооцит-кумулюсних комплексів мишей до дозрівання поза організмом виявляє різний ступень кореляції з умовами культивування. Найбільш значними з досліджуваних факторами були об'єм культуральної краплі і концентрація енергетичних речовин, тоді як вплив інших параметрів культивування може модифікуватися. Крім того, умови культивування впливають на морфологічні характеристики клітин кумулюсу, і, враховуючи помірну кореляцію останніх з показником M2, доцільно використовувати морфологічні параметри кумулюсу як додаткові критерії оцінки ступеню мейотичного дозрівання ооцитів.

Висновки

1. Показник мейотичного дозрівання *in vitro* ооцитів мишей (M2) помірно негативно корелює з об'ємом культуральної краплі, слабо з концентрацією гонадотропних гормонів, помірно позитивно зі вмістом глюкози.

2. Ступінь кореляції M2 з концентрацією пірувату, лактату і БСА модифікується початковою морфологією ооцитів і додаванням сироватки.

3. На мейотичне дозрівання ооцитів з кумулюсом значимий вплив оказують об'єм культуральний краплі, вміст естрадіолу, енергетичних речовин і сироватки в середовищі, на дозрівання оголених ооцитів — об'єм культуральний краплі та вміст енергетичних речовин.

4. Морфологічні параметри кумулюсу ооцитів, підданих дозріванню *in vitro*, корелюють з умовами культивування і

можуть бути використані як додаткові критерії оцінки якості процедури дозрівання.

Перспективи подальших досліджень. Проведений аналіз показав, що визначення кореляційних зв'язків дозволяє оцінити вклад кожного параметра в успішність процесу мейотичного дозрівання ооцитів поза організмом. Але, остаточний висновок щодо якості отриманих яйцеклітин можна зробити за кількістю одержаних ембріонів і, оскільки на це можуть суттєво впливати умови мейотичного дозрівання, подальші дослідження буде спрямовано на визначення кореляції умов мейотичного дозрівання зі здатністю культивованих ооцитів до запліднення та розвитку.

1. Edwards R. D. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 1965, 208, pp. 349-351.

2. Eppig J. J., O'Brien M. J., Pendola F. L., Watanabe S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle-stimulating hormone and insulin. *Biol. Reprod.*, 1998, 59, (6), pp. 1445-1453.

3. Roberts R., Stark J., Iatropoulou A., Becker D. L., Franks S., Hardy K. Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: Response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, 2004, 71, pp. 199-209.

4. Beker-vanWoudenberg A. R., van Tol H. T. A., Roelen B. A. J., Colenbrander B., Bevers M. M. Estradiol and its membrane impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton and embryo quality. *Biol. Reprod.*, 2004, 70, pp. 1465-1474.

5. Sutton-McDowall M. L., Gilchrist R. B., Thompson G. G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 2010, 139, pp. 685-695.

6. Downs S. M., Mastropolo A. M. The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. *Dev. Biol.*, 1994, 162, (1), pp. 154-168.

7. Biggers J. D., Whittingham D. C., Donahue R. P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Zoology*. 1967, 58, pp. 560-567.

8. Kito S., Bavister B. D. Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured in vitro with gonadotropins, amino acids and cysteamine. *J. Reprod. Fertil.*, 1997, 110, pp. 35-46.

9. Ali A., Sirard M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.*, 2002, 66, (4), pp. 901-905.

10. Ohashi K., Nakazawa T., Kawamoto A., Shimoya K., Azuma C., Murata Y. Mouse oocyte maturation and blastocyst culture in vitro in medium adjusted to human follicular fluid composition. *J. Mamm. Ova Res.*, 2000, 17, (1), pp. 42-50.

11. Sandt van de J. J., Schroeder A. C., Eppig J. J. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.*, 1990, 25, (2), pp. 164-171.

12. Tervit H. R., Whittingham D. G., Rowson L. E. A. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 1972, 30, pp. 493-497.

13. Lobachova I.V. Vplyv gonadotropiniv, estral'noyi syrovatky I yakosti ootsytiv ovets', koriv i svyney na yikh dozrivannya i zaplidnennya in vitro Avtoreferat dysertatsiyi kandydata sil'skohospodars'kykh nauk [Influence of gonadotropins, oestral serum and bovine, sheep and pig oocytes quality on their maturation and fertilization in vitro. Dr. Ph. agricultural sci. autoref. diss.] Kharkiv, 1997. 25 p. (In Ukrainian).

14. Downs S. M. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev. Biol.*, 1995, 167, (2), pp. 502-512.

15. Lobachova I.V. Morphologia ootsyt-kumulyusnykh kompleksiv yak pokaznyk umov meyotychnogo dozrivannya [Morphology of oocyte-cumulus complex as indicator of condition of meiotic maturation]. *Naukovi dopovidi of NUBiP — NUB&N Scientific Reports*, 2012, No. 5 (34). Available at: http://nd.nubip.edu.ua/2012_5/12liv.pdf. (Accessed 15 November 2012) (In Ukrainian).

16. Sutton-McDowall M. L., Gilchrist R. B., Thompson G. G. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction*, 2004, 128, (3), pp. 313-319.

17. Racowsky C., Baldwin K. V., Larabell C. A., DeMarais A. A., Kazilek C. C. J. Down-regulation of membrana granulosa cell gap junctions is correlated with irreversible commitment to resume meiosis in golden Syrian hamster oocytes. *Eur. J. Cell Biol.*, 1989, 49, pp. 244-251.

18. Armstrong D. T., Zhang X., Vanderhyden B. C., Khamsi F. Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1991, 626, pp. 137-158.

Стаття надійшла до друку 08.05.2013 р.