

МОРФОЛОГІЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ ЯК ПОКАЗНИК УМОВ МЕЙОТИЧНОГО ДОЗРІВАННЯ

І.В. ЛОБАЧОВА, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова

*«Асканія-Нова» НААН – Національний науковий селекційно-генетичний центр з
вівчарства*

Проведено аналіз взаємозв'язку показників розвитку ооцитів мишею після дозрівання з морфологічними параметрами кумулюсу. За варіантів середовищ, доповнених сироваткою крові та без її додавання, кількість клітин, що досягли стадії метафаза 2 («М2»), позитивно нелінійно корелювала із ступенем розростання («РозКК»), легкістю відокремлення («ВідКК») та експансією («ЕксКК») кумулюсу, але найбільш значимо з останнім. Кількість отриманих зародків («Д+») позитивно корелювала з «ВідКК» та «ЕксКК» і негативно з «РозКК». Коефіцієнт множинної кореляції R показника «М2» з трьома параметрами за обох варіантів середовищ був помірним, а для «Д+» наближався до рівня помітності. Зроблено висновок про можливість оцінки умов мейотичного дозрівання за вказаними морфологічними параметрами лише як допоміжного прийому. Висловлено припущення про доцільність оцінки за співвідношенням «ВідКК»:«ЕксКК»:«ВідКК».

Ключові слова: *ооцит; культивування in vitro; мейотичне дозрівання; морфологічна оцінка; кумулюс; експансія; розростання; легкість відокремлення.*

Мейотичне дозрівання ооцитів є першим і чи не найважливішим етапом при отриманні ембріонів поза організмом, оскільки під час нього закладаються базові механізми, які регулюють процеси подальшого морфо- і органогенезу.

Якість дозрівання значною мірою зумовлюється умовами культивування, які непрямо оцінюють за кількістю, морфологією [9] та особливостями метаболізму оцитів [13] і одержаних зародків [14]. Проте процедура отримання ембріонів *in vitro* складається з трьох відносно незалежних етапів – дозрівання, запліднення і дорощування. На практиці важливо мати методи оцінки, які можна застосовувати на проміжних етапах культивування без втручання у розвиток зародкових клітин. Найдоступнішою з них є оцінка за морфологією.

Параметром, який помітно змінюється при дозріванні оцитів, є стан шару кумулюсних клітин. Останні є основними постачальниками специфічних речовин до оцита і з'єднані з ним тонкими цитоплазматичними містками [4]. У міру дозрівання оцита потік речовин послаблюється, кількість містків зменшується [11], кумулюсні клітини розріджуються і відокремлюються. Оцінку за розрідженням кумулюсу часто використовують на практиці для визначення умов дозрівання оцитів [6]. Ми припускаємо, що як додатковий параметр можна використати також легкість відокремлення кумулюсу від оцита при механічному піпетуванні останнього.

Кумулюс є сукупністю соматичних клітин, здатних до проліферації і формування моношару, яке пов'язане з певною зміною просторової організації клітин, зокрема їх цитоскелета [15]. Оскільки будь-які зміни у кумулюсі можуть позначатися на спектрі синтезованих ним речовин і, відповідно, впливати на оцит, доцільно визначити зв'язок між здатністю кумулюсних клітин до формування моношару і дозріванням оцита, тобто оцінити придатність використання такого параметра як ступінь розрідження кумулюсу.

Мета досліджень - визначення правомірності оцінки умов дозрівання оцитів за морфологічними параметрами кумулюсних клітин, об'єкт досліджень - оцит-кумулюсні комплекси мишей, предмет досліджень - кореляційні зв'язки між показниками мейотичного дозрівання оцитів та розвитку ембріонів і морфологічними параметрами кумулюсу після культивування, зокрема, ступенем розрідження, розростання і легкістю відокремлення.

Матеріали і методика досліджень. Дослідження виконані на ооцит-кумулюсних комплексах (ОКК, надалі - ооцити) помісних мишей (СВА×С57BL) 4-тижневого-2-місячного віку. Тварин забивали зміщенням шийних хребців. Для культивування обирали ооцити, оточені більш ніж 2-3 шарами безперервного кумулюсу без ознак дегенерації у цитоплазмі або в фолікулярних клітинах. Кількість ооцитів у кожній окремій процедурі культивування становила не менше 10 штук, які отримували не менш як від двох тварин.

Як базові середовища культивування використовували TC-199 або SOF, які доповнювали гормонами, БСА і/або сироваткою, енергетичними та іншими речовинами. Усі етапи культивування здійснювали за температури 38 °С, 100 %-ної вологості та 5 %-ного вмісту вуглекислого газу у повітрі. Термін мейотичного дозрівання ооцитів становив 17, інсемінації – 5-7 годин, дорощування – 4 доби.

Показник мейотичного дозрівання ооцитів («М2») визначали за станом хромосом за Tarkowsky A., розвиток ембріонів («Д+») – за кількістю сформованих ембріонів, морфологічні параметри культивованих ооцит-кумулюсних комплексів – візуально за станом кумулюсних клітин.

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-кумулюсних комплексів, не беручи до уваги стан відокремлених скупчень.

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

Легкість відокремлення кумулюсу («ВідКК») оцінювали в у.о. суб'єктивно за результатами відокремлення фолікулярних клітин від ооцитів при

піпетуванні останніх за шкалою від 0 (клітини не відокремлювалися) до 3 (клітини відходили після 3-5 піпетувань повністю).

Статистичну обробку результатів з підрахуванням середньої та її похибки проведено методом описової статистики, визначення значимості та взаємозв'язків між рівнем мейотичного дозрівання ооцитів («M2»), кількістю отриманих зародків («Д+», у відсотках від кількості культивованих ооцитів), морфологічними параметрами «РозКК», «ЕксКК» та «ВідКК» проведено методом регресійного аналізу з обчисленням рівняння множинної регресії, коефіцієнтів множинної кореляції (R), множинної детермінації (D), коефіцієнтів лінійної кореляції Пірсона (r) і індексів кореляційного відношення (i) з використанням комп'ютерної програми «StatPlus 2009». Графіки побудовано інструментами пакету «Excel». Всього враховано дані 250 процедур з мейотичного дозрівання і 24 з отримання зародків *in vitro*.

Результати досліджень та їх обговорення. На першому етапі оцінено зв'язок показника ядерного дозрівання ооцитів з морфологічними параметрами кумулюсу після культивування. Для цього усі дані розділили на 10 груп, назва яких вказує інтервал, у межах якого знаходився показник дозрівання до стадії метафаза 2 («M2») кожної окремої процедури культивування. Оскільки певні компоненти середовища могли по-різному впливати на морфологічні параметри, на першому етапі для виключення впливу фактора наявності/відсутності сироватки крові, яка зумовлює суттєві коливання результатів дослідів [8], групи додатково розділили на підгрупи: «-» – дозрівання проводили без додавання, «+» - з додаванням сироватки.

За безсироваткових варіантів із зростанням рівня дозрівання «M2» морфологічні параметри «ЕксКК» і «ВідКК» помітно підвищувалися (відповідно, лінії тренду В і С, рис. 1), а «РозКК» майже не змінювався (лінія А, див. рис. 1).

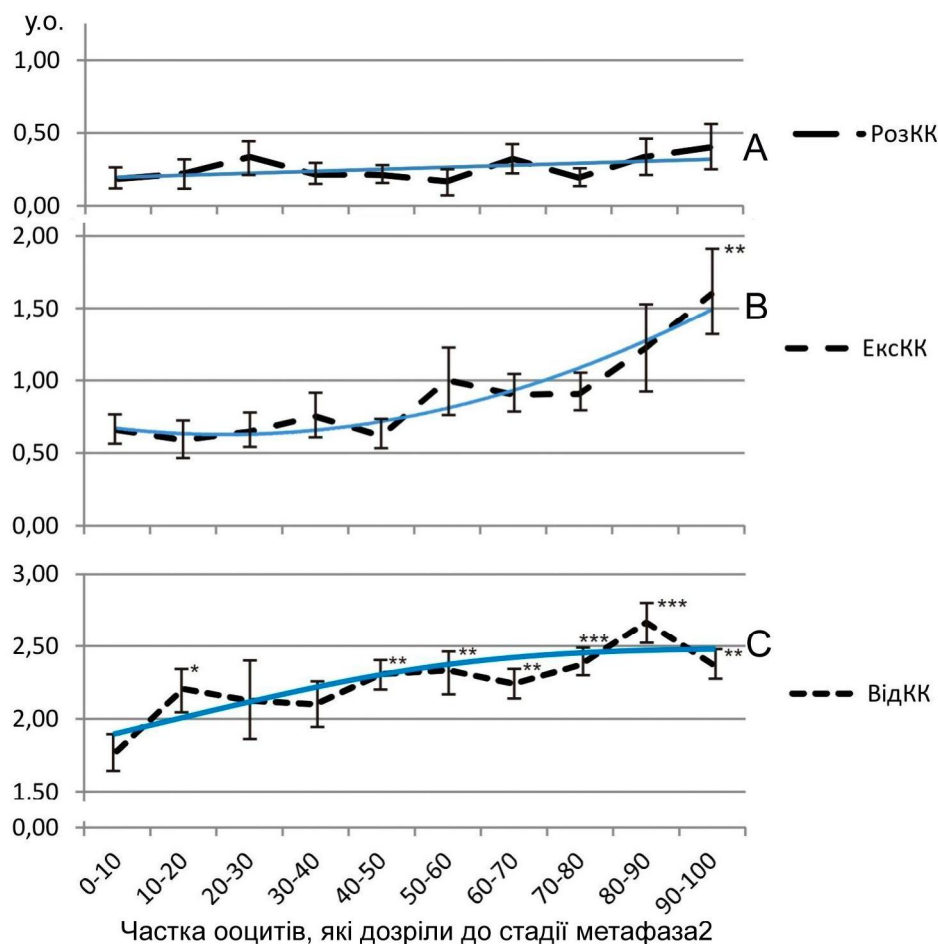


Рис. 1. Морфологічні параметри ооцитів, культивованих у безсироваткових середовищах, за різного рівня мейотичного дозрівання. Експериментальні дані наведено перервними, лінії тренда - безперервними лініями. Лінія А – лінія тренда «РозКК», В - «ЕксКК», С - «ВідКК». Знаками астериску помічено дані, які різнилися від початкового значення з вірогідністю: *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$.

У варіантах з використанням сироватки лише параметр «ЕксКК» (лінія С, рис. 2) мав тенденцію до поступового зростання, тоді як два інші змінювалися за складною залежністю (лінії А і В, див. рис. 2). Усі лінії тренду характеризувалися нелінійністю, коефіцієнт її апроксимації до реальних показників (R^2) коливався від 0,57 до 0,88.

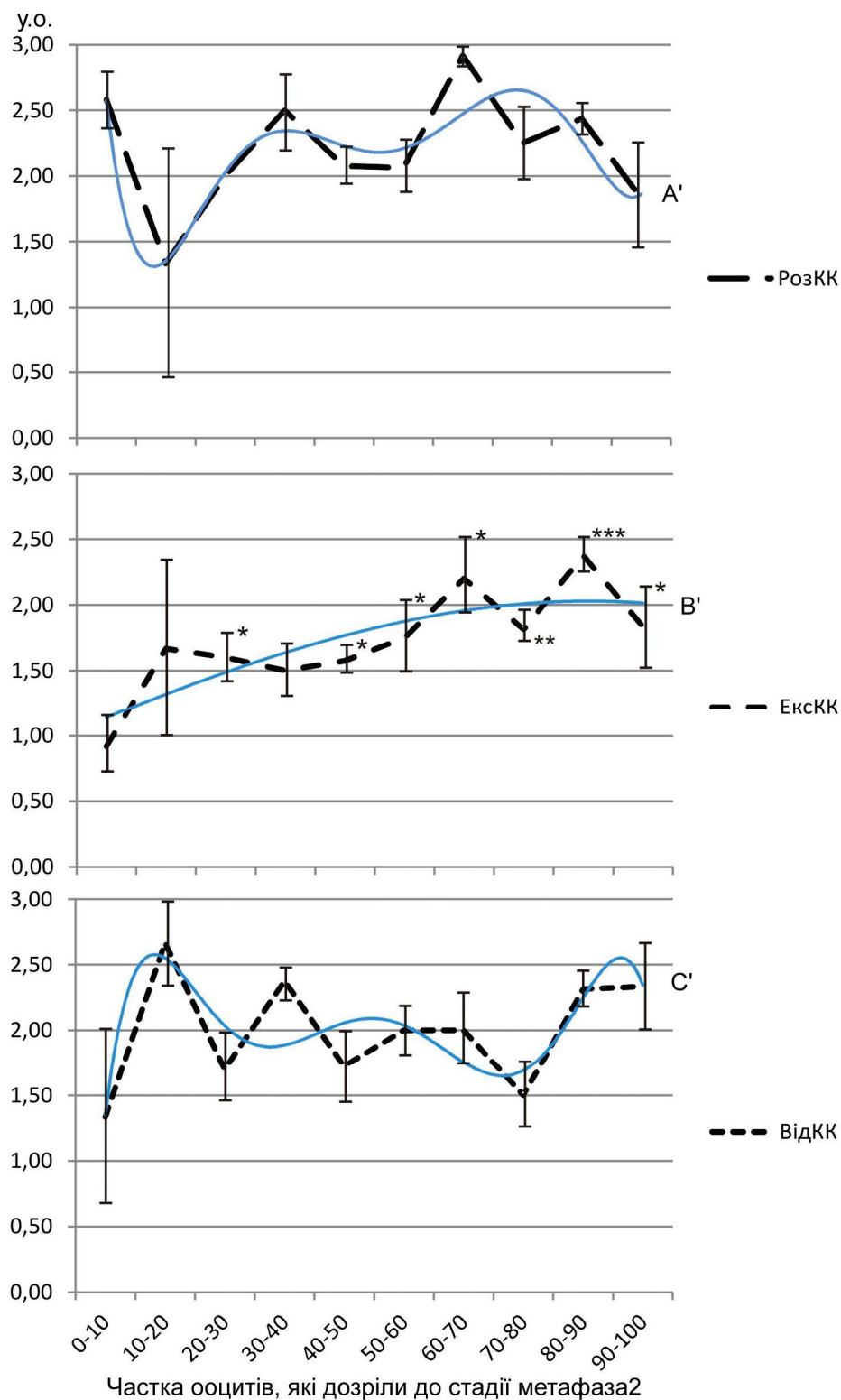


Рис. 2. Морфологічні параметри ооцитів, культивованих у середовищах з сироваткою, за різного рівня мейотичного дозрівання. Експериментальні дані показані перервними, лінії тренду - безперервними лініями. А` – лінія тренду «РозКК», В` - «ЕксКК», `С - «ВідКК». Знаками астериску помічено дані, які різнилися від початкового значення з вірогідністю: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

На другому етапі оцінювали ступінь зв'язку показників розвитку ооцитів з окремими морфологічними параметрами за припущенням лінійного характеру залежності. За обох варіантів культивування («-»/«+») показник «М2» позитивно корелював з усіма параметрами, але найбільш значимо із ступенем експансії кумулюсу (помірний рівень коефіцієнтів парної кореляції Пірсона (r) за шкалою Чеддока, $0,3 < r < 0,5$) (табл. 1). Показник «Д+», аналіз якого проведено лише для сироваткових варіантів, позитивно помірно корелював з «ВідКК» та «ЕксКК» і негативно з «РозКК». На нашу думку, низькі значення коефіцієнтів кореляції можна пояснити як впливом неврахованих факторів, так і відхиленням характеру досліджених залежностей від лінійної (лінії тренду А, В, С, А', В', С', рис. 1 і 2).

1. Коефіцієнти кореляції за лінійного характеру зв'язку показників «М2» і «Д+» з морфологічними параметрами культивованих ооцитів

Показник	N	Коефіцієнт лінійної кореляції Пірсона, r		
		«РозКК»	«ЕксКК»	«ВідКК»
«М2» «-»	181	0,0870	0,3117*	0,2965*
«М2» «+»	69	0,1013	0,4287*	0,1811
«М2» «+»/«-»	250	0,2459*	0,4053*	0,2212*
«Д+» «+»	24	-0,1401	0,3017	0,4049*

Примітка. Тут і далі знаком астериску та жирним шрифтом помічено пари, для яких показник коефіцієнту кореляції підтверджується з рівнем вірогідності $p < 0,05$; N – кількість процедур культивувань.

Для перевірки припущення про нелінійний характер взаємозв'язку визначено індекси кореляційного відношення (i) за методом поліноміальної регресії (табл. 2). Розрахунок показав, що із зростанням ступеня полінома значення кореляційного відношення збільшувалося, що непрямо підтверджує нелінійний характер зв'язків.

За обох варіантів середовищ параметр «РозКК» слабо ($0,1 < i < 0,3$ за шкалою Чеддока) корелював з показниками «М2» і «Д+». «ЕксКК» мав позитивний помірний зв'язок з «М2», який при доповненні середовищ сироваткою переходив у помітний. Легкість відокремлення кумулюсу мала позитивну слабу кореляцію з показником «М2» і помітну з «Д+» ($0,5 < i < 0,7$).

2. Індеси кореляційного відношення за поліноміального характеру зв'язку показників «M2» і «Д+» з морфологічними параметрами культивованих ооцитів

Показники	Ступінь полінома	Індекс кореляційного відношення, <i>i</i>		
		«РозКК»	«ЕксКК»	«ВідКК»
«M2» «-»	2	0,1193	0,3194	0,2972
	3	0,1489	0,3302	0,2982
	4	0,1547	0,3332	0,3184
	6	0,1786	0,3348	0,3715
«M2» «+»	2	0,1041	0,4596*	0,1832
	3	0,1062	0,4630*	0,2957
	4	0,1743	0,5021*	0,2957
	6	н.в.	0,5487*	0,3227
«M2» «+»/«-»	2	0,2473*	0,4083*	0,2215*
	3	0,2493*	0,4094*	0,2291*
	4	0,2520*	0,4115*	0,2558*
	6	0,2683*	0,4190*	0,3134*
«Д+»	2	0,2891	0,3487	0,4310
	3	н.в.	0,4638	0,5048
	4	н.в.	н.в.	н.в.
	6	н.в.	н.в.	н.в.

Примітка. н.в. – показник програмою не визначався.

Підсумовуючи, можна констатувати, що доцільність використання окремих морфологічних параметрів кумулюсу при визначенні умов мейотичного дозрівання різниться. Так, оцінка за ступенем його розростання не інформативна. Найпридатнішим для визначення успішності ядерного дозрівання ооцитів є ступінь експансії кумулюсу, потенціалу подальшого розвитку – легкість його відокремлення.

Ступінь зв'язку показників розвитку ооцитів відразу за усіма дослідженими морфологічними параметрами оцінювали за припущенням лінійного характеру залежності. Для цього розраховували рівняння множинної регресії, яке показує ступінь, внесення змін кожного з морфологічних параметрів у зміну показника «M2». Для варіантів без сироватки (N=181) без сироватки рівняння мало такий вигляд:

$$«M2» = 11,3167 + 4,0878«РозКК» + 10,4692«ЕксКК» + 11,4330«ВідКК» \quad (1),$$

при культивуванні з додаванням сироватки (N=69):

$$\langle M2 \rangle = 24,5808 + 0,2151 \langle \text{РозКК} \rangle + 16,2623 \langle \text{ЕксКК} \rangle + 2,9653 \langle \text{ВідКК} \rangle \quad (2).$$

Аналіз формул 1 і 2 показав, що у варіантах, де сироватку не використовували, параметри «ЕксКК» і «ВідКК» мали майже однаковий вплив на «М2», тоді як за додавання сироватки рівень мейотичного дозрівання значною мірою визначався параметром «ЕксКК», а значимість «РозКК» зменшувалася майже до нуля. Отже, у варіантах при культивуванні без додавання сироватки будь-які добавки, що сприяють збільшенню ступеня експансії і легкості відокремлення кумулюсу мають позитивно позначатися на показнику дозрівання. При додатковому внесенні сироватки, яка сама по собі сприяє розростанню моношару клітин, доцільно застосовувати заходи, що збільшують експансію кумулюсу. Зростання коефіцієнта b_0 у рівнянні 2 порівняно з рівнянням 1 свідчить про збільшення значимості неврахованих параметрів.

Рівняння множинної регресії для показника «Д+» (N=24) було таким:

$$\langle D+ \rangle = 8,9105 - 14,5443 \langle \text{РозКК} \rangle + 4,5927 \langle \text{ЕксКК} \rangle + 15,6123 \langle \text{ВідКК} \rangle \quad (3).$$

Отже, вихід зародків («Д+») негативно залежав від «РозКК» і позитивно від «ЕксКК» та «ВідКК» (рівн. 3). Підсумовуючі рівняння 1, 2 і 3, можна припустити, що збільшення кількості ембріонів має відбуватися при застосуванні заходів, що сприяють полегшенню відокремлення кумулюсу і меншою мірою тих, що посилюють його експансію. Інтенсивне розростання моношару кумулюсних клітин негативно позначається на кількості отриманих зародків.

Розрахований коефіцієнт множинної кореляції R показника «М2» з морфологічними параметрами варіантів без додавання сироватки становив 0,3933, детермінації D - 0,1547, за додавання сироваток R підвищувався до 0,4357, а D до 0,1898. Для показника «Д+» коефіцієнт R становив 0,5941, D - 0,3529. Отже, показник «М2» зв'язаний зі зміною морфологічних параметрів позитивно помірно ($0,3 < R < 0,5$ за шкалою Чеддока), а «Д+» - помітно ($0,5 < R < 0,7$). Вище значення R для показника «Д+», на нашу думку, свідчить про

більшу значимість морфологічних параметрів кумулюсу для оцінки цитоплазматичного, а не ядерного, дозрівання.

Для кращого розуміння отриманих результатів необхідно усвідомити, про що може свідчити той чи інший показник.

Нині мейотичне дозрівання ооциту розглядають як два взаємопов'язані процеси – ядерне дозрівання і цитоплазматичне [8]. Під останнім розуміють насичення цитоплазми ооциту пластичними і регуляторними речовинами, які необхідні при заплідненні та на перших етапах поділу і надходять до ооцита від кумулюсних клітин. Проте крім ролі постачальника кумулюс виконує іншу, не менш важливу функцію. Зокрема, відомо, що хромосоми ооцитів ссавців після вилучення із фолікулярного оточення здатні спонтанно ініціювати і завершити мейотичні перетворення [7, 12]. В умовах *in vivo* кумулюс затримує трансформацію хромосом до завершення цитоплазматичного дозрівання ооцита. Усунення гальмування дає пікове виділення лютеїнізуючого гормону, яке супроводжується зміною спектра синтезованих кумулюсом речовин [16]. За нашим припущенням, різниця між просторовою організацією проліферації кумулюсу *in vitro* (у вигляді формування двомірного моношару) і такою в умовах *in vivo* (тримірна будова) може заважати належній зміні секреції в кумулюсних клітинах і, відповідно, не діє позитивно. Теоретично про можливість такої різниці свідчать, наприклад, дані про відмінність рівня включення поміченого ^3H -тімідину у кератоцити при їх культивуванні в гелі та на пластиковому носії [1], а також відмінність за спектром синтезу різних форм актину в клітинах фібробласту, культивованих на підложжі, що деформується [2].

Разом із зміною секреції причиною зменшення мейозстримуючого впливу кумулюсу може бути також розрідження клітин, тобто зменшення щільності їх прилягання. При цьому збільшуються відстані між сусідніми клітинами, чим уможлиблюється надходження речовин до ооцита безпосередньо із оточуючого середовища. Показано, що розрідження супроводжується також зниженням площі міжклітинних контактів між соматичними клітинами і ооцитом [15].

Дані табл. 2 дають підставу припустити, що за високих показників «М2» кумулюсні клітини з'єднуються з ооцитом зв'язками, чутливими до слабкої механічної дії, що сприяє легкості відокремлення клітин і збільшує значення параметра «ВідКК».

На основі проведеного аналізу, а також з урахуванням експериментальних даних нами припущена більша доцільність оцінки умов культивування за загальним виглядом співвідношення морфологічних параметрів. Зокрема, для отримання високого показника мейотичного дозрівання ооцитів ссавців у середовищах, доповнених сироваткою, параметр «ЕксКК» має дорівнювати або поступатися «ВідКК» і перевищувати «РозКК». Тобто, співвідношення параметрів має бути таким $\text{«РозКК»} < \text{«ЕксКК»} \leq \text{«ВідКК»}$ і у чисельному вигляді приблизно дорівнювати 2:3:3. При культивуванні у середовищах без сироватки бажаний вид співвідношення 1:2:3. Порухення вказаних пропорцій вело до гальмування мейозу і зниження показника дозрівання. Так, додавання суміші трансформуючих факторів TGF- α і TGF- β 1 збільшувало експансію кумулюсу, але погіршувало легкість його відокремлення і знижувало показник «М2» [3]. Різницею впливу компонентів середовища на окремі морфологічні параметри ймовірно пояснюються низькі значення коефіцієнтів лінійної кореляції (табл. 1). Можна припустити, що за стандартизацією умов дозрівання ступінь зв'язку має бути вищою.

Аналіз показав, що задовільний рівень мейотичного дозрівання можливий і за низьких значень параметрів «РозКК» та «ЕксКК». Це може свідчити про необов'язковість додавання сироватки до культурального середовища, що підтверджується іншими авторами [5]. За співвідношенням морфологічних параметрів можна також певним чином оцінити якість середовища. Зокрема, якщо значення «РозКК» перевищує «ЕксКК», можна констатувати, що мейозстимулююча спроможність середовища значно знижена відносно його рістстимулюючої здатності, що за низьких абсолютних значень параметрів «ЕксКК» і «ВідКК» супроводжується зменшенням показника дозрівання ооцитів. Як засіб виправлення такої ситуації можна знизити концентрацію

сироватки або доповнити середовище іншими речовинами. Слід зауважити, що у роботі вказані параметри кумулюсу оцінювали суб'єктивно. Можна сподіватися, що з більш адекватним їх визначенням точність оцінки збільшиться.

Висновки

1. Показники розвитку ооцитів нелінійно з різним ступенем зв'язку корелюють з морфологічними параметрами кумулюсу.

2. Між кількістю ооцитів, що дозріли до стадії метафаза 2, і ступенем експансії кумулюсу, а також між кількістю отриманих зародків і легкістю відокремлення кумулюсу існує позитивна кореляційна залежність.

3. Ступінь розростання моношару кумулюсних клітин негативно корелює з кількістю отриманих зародків.

4. Аналіз за морфологічними параметрами кумулюсу можна використовувати як допоміжний, але не основний прийом проміжної оцінки умов мейотичного дозрівання ооцитів.

Подальші дослідження мають підтвердити доцільність і правомірність оцінки умов мейотичного дозрівання за співвідношенням використаних параметрів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Воротеяк Е.А. Морфогенез и его регуляция в культуре эпидермальных клеток человека: автореф. дис. д-ра биол. наук : 03.03.04 / Е.А. Воротеяк : Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН — М., 2012. — 38 с.

2. Кот К.В. Особливості актинової сітки цитоскелету фібробластів, культивованих на підложжі, що деформується. / К.В. Кот, Ю.Г. Кот // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. — 2012. — Вип. 14, № 971. — С. 20-26.

3. Лобачова І.В. Вплив морфології, гормонів і трансформуючих факторів на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro*. / І.В. Лобачова // Наук.-тех. бюл. Ін-ту тв-ва. — 2008. — № 96. — С. 222-227.

4. Anderson E. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. / E. Anderson, D.F. Albertini // *J. Cell Biol.* — 1976. — V. 71. — P. 680-686.

5. Araki K. Fertilization capacity of mouse oocytes matured in vitro: effect of PMSG, FSH and epidermal growth factor (EGF) in serum-free maturation medium. / K. Araki, R. Suzuki, M. Yokoyama et al. // *J. Repr. Dev.* — 1996. — V. 42, Issue 1. — P. 29-33.

6. Chen L. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. / L. Chen, P.T. Russell, W.J. Larsen // *Mol. Reprod. Dev.* — 1993. — V. 34. — P. 87-93.

7. Edwards R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. / R.G. Edwards // *Nature.* — 1965. — V. 208. — P. 349-351.

8. Eppig J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. / J.J. Eppig // *Reprod. Fertil. Dev.* — 1996. — V. 8, Issue 4. — P. 485-489.

9. Iwasaki S. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. / S. Iwasaki, N. Yoshida, H. Ushijima et al. // *J. Reprod. Fertil.* — 1990. — V. 90. — P. 279-284.

10. Kito S. Gonadotropins, serum, and amino acids alter nuclear maturation, cumulus expansion, and oocyte morphology in hamster cumulus-oocyte complexes in vitro. / S. Kito, B.D. Bavister // *Biol. Reprod.* — 1997. — V. 56, Issue 5. — P. 1281-1289.

11. Motta P.M. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. / P.M. Motta, S. Makabe, T. Naguro, S. Correr // *Archives of Histology and Cytology.* — 1994. — V. 57. — P. 369-394.

12. Pincus G. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. / G. Pincus, E.V. Enzmann // *J. Exp. Med.* — 1935. — V. 62. — P. 665-675.

13. Preis K.A. Metabolic markers of developmental competence for in vitro-matured mouse oocytes. / K.A. Preis, G. Seidel Jr., D.K. Gardner // Reproduction. — 2005. — V. 130. — P. 475-483.

14. Sakkas D. Evaluation of embryo quality by metabolomics: a new strategy to aid single embryo transfer. / D. Sakkas, H. Morita, N. Yamashita et al. // J. Mammal. Ova Research. — 2008. — V. 25, Issue 1. — P. 26-31.

15. Sutovský P. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. / P. Sutovský, J.E. Fléchon, B. Fléchon et al. // Biol. Reprod. — 1993. — V. 49. — P. 1277-1287.

16. Tsafiriri A. In vitro induction of meiotic division on follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E₂. / A. Tsafiriri, H.R. Lindner, U. Zor, S.A. Lamprecht // J. Reprod. Fert. — 1972. — V. 31. — P. 39-50.

МОРФОЛОГИЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ УСЛОВИЙ МЕЙОТИЧЕСКОГО СОЗРЕВАНИЯ

И.В. ЛОБАЧЕВА, кандидат сельскохозяйственных наук

Институт животноводства степных районов им. М.Ф. Иванова

«Аскания-Нова» НААН - Национальный научный селекционно-генетический центр овцеводства, Украина

Проведено анализ взаимосвязи показателей развития ооцитов мышей после дозревания с морфологическими параметрами кумулюса. При вариантах сред, дополненных сывороткой крови и без нее, количество клеток, которые достигли стадии метафаза 2 («М2»), положительно нелинейно коррелировало со степенью разрастания («РазКК»), легкостью отделения («ОтдКК») и экспансией («ЭксКК») кумулюса, но наиболее значимо с последним. Количество полученных зародышей («Д+») положительно коррелировало с «ОтдКК» и «ЭксКК», но негативно с «РазКК». Коэффициент множественной корреляции R показателя «М2» с тремя параметрами при обоих вариантах сред был

«Наукові доповіді НУБіП» 2012-5 (34) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012_5/12liv.pdf

умеренным, а для «Д+» приближался к уровню заметности. Сделан вывод про возможность оценки условий мейотического дозревания по указанным морфологическим параметрам только в качестве вспомогательного приема. Предположена целесообразность оценки по соотношению «РазКК»:«ЭксКК»:«ОтдКК».

Ключевые слова: ооцит; культивирование *in vitro*; мейотическое дозревание; морфологическая оценка; кумулюс; экспансия; разрастание; легкость отделения.

MORPHOLOGY OF OOCYTE-CUMUCUS COMPLEX AS INDICATOR OF CONDITION OF MEIOTIC MATURATION

I.V. LOBACHOVA, Ph. D.

M.F. Ivanov Institute of Animal Breeding in Steppe Regions "Ascania-Nova" NAAS – National Scientific Selection-Genetics Center of Sheep Breeding, Ukraine

It was analyzed the correlation of the developmental indexes of cultured mouse oocytes with the morphological parameters of cumulus. In serum added and non-serum condition a number of oocyte reached metaphase 2 ("M2") positively correlated with the growth degree ("GroCC") and the ease of separation ("SepCC") but more significantly with the expansion ("ExpCC") of cumulus. A number of received embryos ("D+") positively correlated with "SepCC" and "ExpCC" but negatively with the "GroCC". For "M2" coefficient of multiple correlation R with all three parameters was moderate, for "D+" it approached to noticeable level. It made a conclusion about a possibility of estimation of the meiotic maturation condition on the basis of the researched morphological parameters only as supporting method. It was assumed the expediency of estimation by ratio "GroCC": "ExpCC": "SepCC".

Key words: oocyte; culture *in vitro*; meiotic maturation; morphological estimation; cumulus; expansion; growth; ease of separation.