

## СТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНЫ НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ КОРОВ IN VITRO

Кузьмина Т.И., Новичкова Д.А.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных Россельхозакадемии  
190103, Россия, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское шоссе 55-а, **E-mail:** [prof.kouzmina@mail.ru](mailto:prof.kouzmina@mail.ru)

Возможность использования в экспериментах яичников убитых животных, в качестве источника получения женских гамет, для выявления эффектов различных биологически активных веществ на мейоз ооцитов, их оплодотворение и развитие эмбрионов, позволяет идентифицировать механизмы реализации этих эффектов на репродуктивную функцию. Нитрозометилмочевина (НММ) – супермутаген, относится к группе биологически активных соединений. Имеется ряд данных о применении его и других супермутагенов в животноводстве и медицине. Действуя в исключительно малых дозах, супермутагены оказывают различное влияние на рост и развитие овец, кроликов и т.д. [1].

В наших исследованиях предпринята попытка выявления эффектов НММ на созревание ооцитов коров in vitro. В этом случае открывается возможность воздействия супермутагеном непосредственно на женскую гамету. В экспериментах использовали донорские ооциты коров, убитых на мясокомбинате. Селекцию клеток, их культивирование, оплодотворение ооцитов проводили в соответствии с методами, разработанными в лаборатории биологии развития ГНУ ВНИИГРЖ [2]. Базовой средой для культивирования служила ТС-199, дополненная 15% фетальной бычьей сыворотки,  $10^6$  клеток гранулезы на мл среды, в опытную добавляли НММ в концентрации  $10^{-8}$  г/л. Статус хроматина ооцитов и эмбрионов оценивали по методу Тарковского [3]. Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерии  $\chi^2$  с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости:  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ . Хроматин ооцитов анализировали через 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 часов.

Всего прокультивировано 568 ооцитов на разных стадиях мейоза (диплотена, диакинез, метафаза-I, анафаза, телофаза, метафаза-II). Установлен диапазон концентраций, в котором данный препарат оказывает положительное действие на процесс прохождения мейоза ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$  г/л), которое выражалось в синхронизации ядерного созревания популяции донорских ооцитов, снижении уровня дегенераций хроматина в опытных группах по сравнению с контрольной, увеличении числа дробящихся зародышей после оплодотворения in vitro ооцитов. Более 90% ооцитов, выделяемых из антральных фолликулов коров диаметром 3-6 мм для культивирования, находятся на стадии диплотены. Цитогенетический анализ ооцитов, прокультивированных с НММ (концентрация  $10^{-8}$ ), показал, что в определенные сроки подавляющее большинство клеток синхронно созревали до определенной стадии мейоза. К 10 часам экспозиции 89% ооцитов опытной группы находилось на стадии диакинеза. В это же время в контрольной группе 64% ооцитов оставались на стадии диплотены. Через 15 часов культивирования 91% ооцитов опытной группы достигли стадии метафазы –I. При увеличении срока экспозиции до 20 часов 100% ооцитов реинициировали мейоз, 79% из них находились на стадии телофазы. 98% клеток завершали созревание к 30 часам. Т.о. при культивировании ооцитов с НММ стадия диакинеза длилась 5 часов, 15 часов культивирования необходимо ооцитам для достижения стадии метафазы –I. Срок достижения ооцитами, находящимися на стадии метафазы –I, метафазы –II составил 10 часов. Значительный рост числа клеток с выраженными хромосомными аномалиями в опытной группе через 35-40 часов культивирования также объясним, если учесть одновременное созревание большого числа ооцитов, которое влечет за собой дегенерацию хроматина в результате их перезревания. При оплодотворении через 25 часов ооцитов, созревших in vitro в среде с НММ, выход эмбрионов на стадиях поздней морулы, бластоцисты в опытной группе составил 29% , против 18% в контроле ( $P < 0,05$ ). При морфологическом анализе не обнаружено достоверных различия между эмбрионами опытной и контрольной групп, в т.ч. по уровню бластомеров с пикнотическими ядрами, набору хромосом в бластомерах и т.д.

Полученные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии сверхнизких концентраций НММ на созревание ооцитов коров in vitro и возможности получения из них доимплантационных эмбрионов.

## STIMULATING EFFECT OF ULTRALOW CONCENTRATION OF NITROSOMETHYLUREA ON MATURING OF BOVINE OOCYTES IN VITRO

T.I.Kuzmina, D.A.Novichkova

All-Russian Research Institute for Farm Animal Genetics & Breeding, E-mail: [prof.kouzmina@mail.ru](mailto:prof.kouzmina@mail.ru)

### Литература

1. Никифоров А.В., Подгурская А.Д. // Действие некоторых супермутагенов на организм животных. В сб., Применение химических мутагенов в сельском хозяйстве и медицине. М., Наука, 1973, стр. 283.
2. Кузьмина, Т.И., В.А. Багиров, А.В. Егиазарян, Х.Альм, Х.Торнер // Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота in vitro. Санкт-Петербург-Пушкин, 2009, 44 С.
3. Tarkowski A.K. An air drying method for chromosomal preparation from mouse eggs// Cytogenetic. - 1966. - V.1. - P. 394-400.