

СИРВАТКА В. Я.<sup>1,2✉</sup>, СЛИВЧУК Ю. І.<sup>2</sup>, ШТАПЕНКО О. В.<sup>2</sup>, ГРОМИКО О. М.<sup>1</sup>, ГЕВКАН І. І.<sup>2</sup><sup>1</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: vasyi.syrvatka@lnu.edu.ua

<sup>2</sup> Інститут біології тварин НААН,

Україна, 79034, м. Львів, вул. Василя Стуса, 38, e-mail: gavkan.iv@gmail.com

✉ vasyi.syrvatka@gmail.com (098) 801-27-68

## КОМБІНОВАНА ПРОСТОРОВО-ОРГАНІЗОВАНА СИСТЕМА ДЛЯ ДОЗРІВАННЯ ЯЙЦЕКЛІТИН ТВАРИН *IN VITRO*

**Мета.** Метою роботи було створення просторово-організованої клітинної системи для дозрівання яйцеклітин на основі гранульози кролів, гіалуронової кислоти для структурної організації цієї системи та інсуліну як важливого фактора росту. **Методи.** Культивування клітин гранульози та дозрівання яйцеклітин *in vitro*, біохімічне визначення активності лактатдегідрогенази та концентрації холестеролу, а також визначення концентрації прогестерону та естрадіолу імуноферментним методом. **Результати.** Встановлено, що концентрація гіалуронової кислоти 0,5 мкг/мл підвищує проліферативну активність клітин гранульози, збільшує концентрацію прогестерону в кондиційному середовищі на 72-гу, а естрадіолу на 48 і 72-гу години культивування. Ступінь дозрівання ооцитів до метафази-2 становить 85 % за дії 10 мкг/мл інсуліну; ця ж концентрація збільшує інтенсивність проліферації клітин гранульози, а також підвищує рівень естрадіолу, прогестерону та холестеролу в кондиційному середовищі після 24-ох годин культивування. **Висновки.** Оптимальні параметри комбінованої просторово-організованої культуральної системи становлять 1 млн/мл клітин гранульози з додаванням 0,5 мкг/мл гіалуронової кислоти та 10 мкг/мл інсуліну, що дозволяє створити оптимальні умови для дозрівання яйцеклітин до метафази-2 клітинного циклу.

**Ключові слова:** яйцеклітини, клітини гранульози, гіалуронова кислота, інсулін, *in vitro*.

Отримання та дозрівання достатньої кількості яйцеклітин поза організмом є ключовим етапом багатьох біотехнологічних маніпуляцій, зокрема *in vitro* запліднення, поділу, клонування та отримання трансгенних ембріонів тварин. Більше того, якісне дозрівання ооцитів є важливою складовою успішності рутинних методів отримання ембріонів сільськогосподарських

тварин та клінічної практики репродуктивної медицини людей [1]. Вкрай важливим завданням ембріональної біотехнології є забезпечення повноцінного дозрівання яйцеклітин поза організмом, яке визначається максимальним наближенням умов культивування *in vitro* до умов *in vivo*.

Вилучення яйцеклітин із фолікулів призводить до значних структурних змін та функцій їх ооплазми через відсутність складних регуляторних систем, що діють в умовах *in vivo* та впливають на каскади клітинних реакцій. Посередниками біологічних сигналів між яйцеклітинами та залозами внутрішньої секреції є клітини гранульози, більше того, вони здійснюють синтез та секрецію більшості ростових факторів. Синтетичні середовища для культивування яйцеклітин не здатні повною мірою забезпечити повноцінне їх дозрівання в умовах *in vitro* [2, 3]. Тому нами розроблені методи дозрівання ооцитів та ембріонів на моношарах клітин, зокрема гранульози. Велике значення для розвитку гамет та ембріонів в умовах *in vitro* має також і просторова організація клітин та допоміжні складники, які б ефективно сприяли всебічним міжклітинним взаємодіям та забезпечували яйцеклітини важливими нутрієнтами і ростовими факторами [4, 5].

З огляду на це, створення просторово-організованої клітинної системи з оптимальними умовами для дозрівання яйцеклітин та пошуком нових альтернативних фізико-хімічних чинників здатних, суттєво підвищити кількість та якість дозрівання ооцитів в умовах *in vitro*, є пріоритетним завданням репродуктивної біотехнології тварин [6, 7]. Комбінована просторово-організована клітинна система дозволить не тільки забезпечити більш якісне дозрівання ооцитів, а й стане важливим інструментом у вивченні впливу різних фізико-хімічних чинників на якість гамет *in vitro*.

Метою роботи було створення просторово-організованої клітинної системи для дозрівання яйцеклітин на основі клітин гранульози кролів як посередників біологічних сигналів з ооцитами, гіалуронової кислоти для структурної організації цієї системи та інсуліну як важливого компонента – аналога інсуліно-подібного фактора росту.

### Матеріали і методи

Усі експериментальні процедури з тваринами *in vivo* були схвалені Комісією з біоетики Інституту біології тварин НААН відповідно до чинного законодавства України. Дослідження проводилися на забійному біологічному матеріалі клінічно здорових кролиць приватного господарства ТзОВ «Горлиця» с. Добряни Городоцького району, Львівської області. Одразу після забою кролематок видаляли їхні яєчники, які поміщали в термостатований стерильний фізіологічний розчин (0,9 % NaCl) з антибіотиками (100 IU/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину) за температури 38° С. Упродовж години біологічний матеріал доставляли в лабораторію репродуктивної біотехнології Інституту біології тварин НААН, де проводилися всі наступні *in vitro* дослідження.

Після аспірації преовуляторних фолікулів відбирали ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) та окремо фолікулярну рідину з клітинами гранульози. Клітини гранульози були ферментативно дезагреговані гіалуронідазою 40 IU/мл з подальшим центрифугуванням для очищення їх від конгломератів. Вилучені ооцити після відмивання в середовищі 199 від мертвих клітин та фолікулярної рідини піддавалися якісному морфологічному аналізу. Для створення дослідних груп відбиралися яйцеклітини тільки відмінної та доброї якості.

Для оцінки ефективності росту культури клітин гранульози за дії гіалуронової кислоти було сформовано чотири групи: контрольну та 3 дослідні, які відрізнялися між собою різною концентрацією гіалуронової кислоти (ГК) в середовищі. Для культивування клітин гранульози використовували середовище 199 з додаванням 10 % фетальної сироватки телят (ФСТ) та 50 мкг/мл гентаміцину. В контрольній і дослідних групах кількість життєздатних клітин гранульози на початку дослідження становила  $1,0 \times 10^6$  клітин/мл. Клітини гранульози контрольної групи культивували без додавання ГК; клітини дослідних груп культивувалися з додаванням гі-

лурунової кислоти в концентраціях: 0,1; 0,5 та 1 мкг/мл відповідно. Культивування проводили упродовж 72-ох годин в середовищі. Через кожні 24 години проводили підрахунок життєздатних клітин після їх фарбування трипановим синім, а також відбирали середовище культивування для визначення біохімічних показників: лактатдегідрогеназної активності, концентрації холестеролу, прогестерону та естрогену.

Для вивчення впливу інсуліну в умовах використання комбінованої просторово-організованої системи клітин гранульози з гіалуроновою кислотою для дозрівання ОКК було сформовано 3 дослідні групи, які відрізнялися різною концентрацією інсуліну в середовищі: 5; 10 та 15 мкг/мл. Клітини гранульози ( $1,0 \times 10^6$  клітин/мл) та 20 яйцеклітин відмінної та доброї якості доволно додавали в кожну дослідну групу та культивували упродовж 24-ох годин у середовищі 199 з додаванням ГК 0,5 мкг/мл, 10 % ФСТ та 50 мкг/мл гентаміцину. Через 24 години проводили підрахунок життєздатних клітин після їх фарбування трипановим синім та кількості яйцеклітин, дозрілих до метафази-2 клітинного циклу, після їх фарбування за методом Романовського-Гімза, а також відбір середовища культивування для проведення біохімічних показників: активності лактатдегідрогенази, концентрації холестеролу, прогестерону та естрогену.

Зразки кондиційного середовища було відібрано шляхом центрифугування за 3500 об/хв упродовж 20 хв для очищення від клітин. Одержані зразки зберігали за температури -20° С до проведення вимірювань біохімічних показників. Концентрацію прогестерону та естрадіолу визначали за допомогою комерційного набору DRG (Німеччина) на імуноферментному аналізаторі Stat Fax (Awareness Technology, США), а концентрацію холестеролу та активність лактатдегідрогенази – за допомогою наборів Humman (Німеччина) на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000 (Humman, Німеччина) відповідно до інструкцій виробників.

Усі експерименти проводилися в трьох паралелях, результати представлені як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення. Усі статистичні аналізи проводилися за допомогою програми Microsoft Excel. Відмінності між групами визначали за допомогою t-тесту Стьюдента. Різниця між групами вважалася достовірною, коли  $P < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Гіалуронова кислота є в фолікулярній рідині яєчників більшості тварин та відіграє ключову роль в експансії клітин кумулюсу, нормальному дозріванні яйцеклітин до метафази-2 та подальшому розвитку ембріонів [8]. Високі концентрації біополімеру гіалуронової кислоти в середовищі утворюють в'язкий біогель, який можна використовувати для створення об'ємних культуральних систем. Нами встановлено, що додавання до основного середовища 199 гіалуронової кислоти в концентрації від 0,1 до 1 мг/мл забезпечує отримання оптимальної в'язкості середовища для створення комбінованої просторово-організованої клітинної системи. Досліджено вплив таких концентрацій гіалуронової кислоти в середовищі на функціонування клітини гранульози.

Динаміка проліферативної активності та біосинтезу холестеролу клітин гранульози за дії гіалуронової кислоти в концентраціях 0,1–1 мг/мл упродовж 72-ох годин культивування представлена на рисунку 1. Встановлено підвищення проліферативної активності клітин гранульози в дослідній групі з концентрацією гіалуронової кислоти 0,5 мг/мл. На 72-гу годину культивування кількість життєздатних клітин гранульози в цій групі була достеменно вища

порівняно з контрольною групою (рис. 1 А). Усі досліджувані концентрації гіалуронової кислоти не впливали на біосинтез холестеролу клітинами гранульози упродовж 72-ох годин культивування. Не встановлено змін в його концентрації між контрольною та дослідними групами (рис. 1 Б).

У дослідній групі з концентрацією гіалуронової кислоти 0,5 мг/мл спостерігається підвищення стероїдогенезу клітинами гранульози упродовж 72-ох годин культивування (рис. 2). Концентрація прогестерону на 72-гу годину культивування була вірогідно вищою ( $P < 0,05$ ) порівняно з відповідним показником контрольної групи (рис. 2 А). На 48-му годину культивування в цій групі виявлено підвищення кількості естрадіолу  $232,9 \pm 6,07$  проти  $208,5 \pm 5,12$  пМоль/л у контрольній групі; на 72-гу годину культивування –  $198,67 \pm 3,57$  проти  $167,1 \pm 8,98$  пМоль/л (рис. 2 Б). Відомо, що гіалуронова кислота сприяє експресії рецепторів прогестерону клітин гранульози щурів та людини [9]. Збільшення концентрації стероїдних гормонів в нашому дослідженні, очевидно, пов'язане із покращенням функціональної здатності клітин гранульози кролів та кращої їх проліферації за дії гіалуронової кислоти в концентрації 0,5 мг/мл.

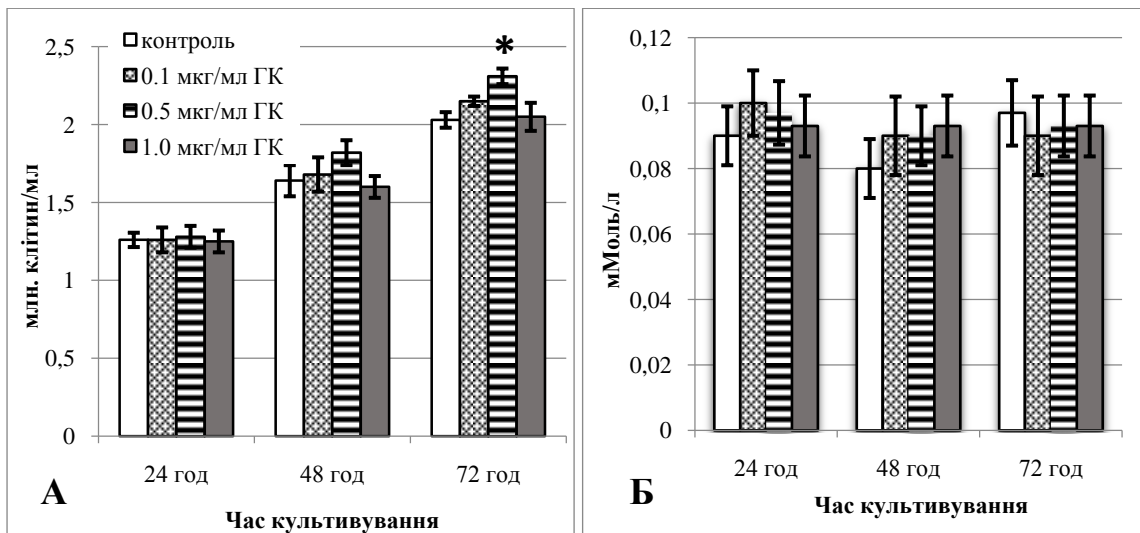


Рис. 1. А – кількість життєздатних клітин гранульози та Б – концентрація холестеролу в культуральному середовищі упродовж 72-ох годин культивування за дії різних концентрацій гіалуронової кислоти. ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ). Примітка: \*  $P < 0,05$  – достовірна різниця (порівняно з контрольною групою).

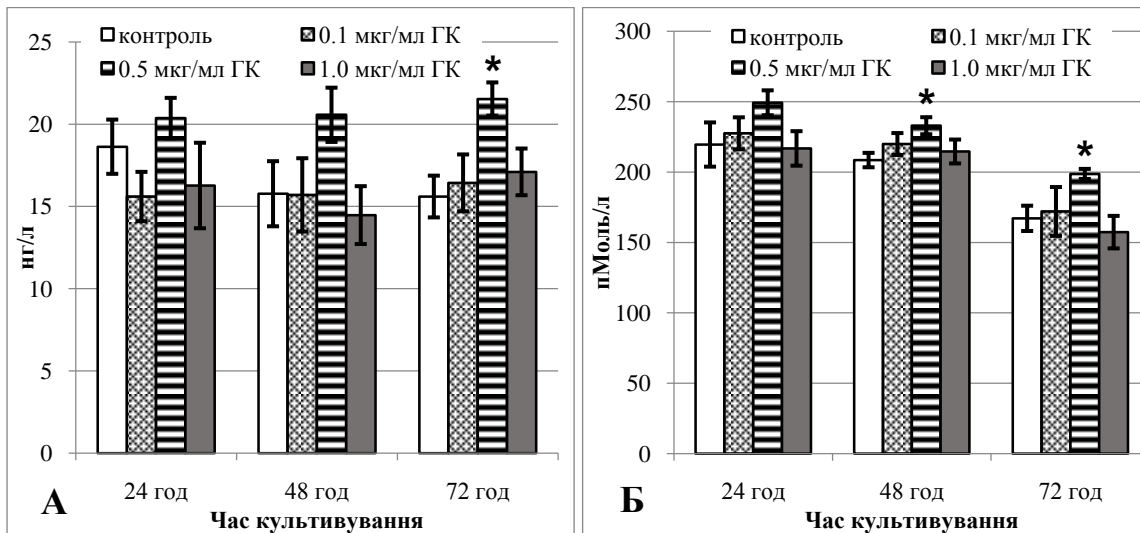


Рис. 2. **А** – концентрація прогестерону та **Б** – концентрація естрадіолу в культуральному середовищі клітин гранульози упродовж 72-ох годин культивування за дії різних концентрацій гіалуронової кислоти. ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ) Примітка: \*  $P < 0,05$  – достовірна різниця (порівняно з контрольною групою).

Попередніми дослідженнями нами встановлено позитивний вплив інсуліну на дозрівання ооцит-кумулясних комплексів корів. Результати, отримані за дозрівання яйцеклітин із використанням комбінованої просторово-організованої клітинної системи гранульози кролематок, свідчать про позитивну дію інсуліну в концентрації 10 мкг/мл. Під час підрахунку кількості ОКК, дозрілих до метафази-2, після 24-ох годинного культивування встановлено, що в другій дослідній групі за дії інсуліну в концентрації 10 мкг/мл ступінь дозрівання ооцитів становив 85 %; у цій групі був і найнижчий відсоток дегенованих ОКК (рис. 3 А).

Ця ж концентрація інсуліну суттєво підвищує інтенсивність проліферації клітин гранульози через 24 години культивування. В другій дослідній групі за дії 10 мкг/мл інсуліну виявлено вірогідно більше життєздатних клітин через 24 години культивування, ніж у першій та третій дослідних групах. Вірогідних різниць у проліферативній активності та життєздатності клітин між дослідною з додаванням інсуліну в концентрації 5 мкг/мл та третьою дослідною групою з додаванням інсуліну в концентрації 15 мкг/мл не виявлено (рис. 3 Б).

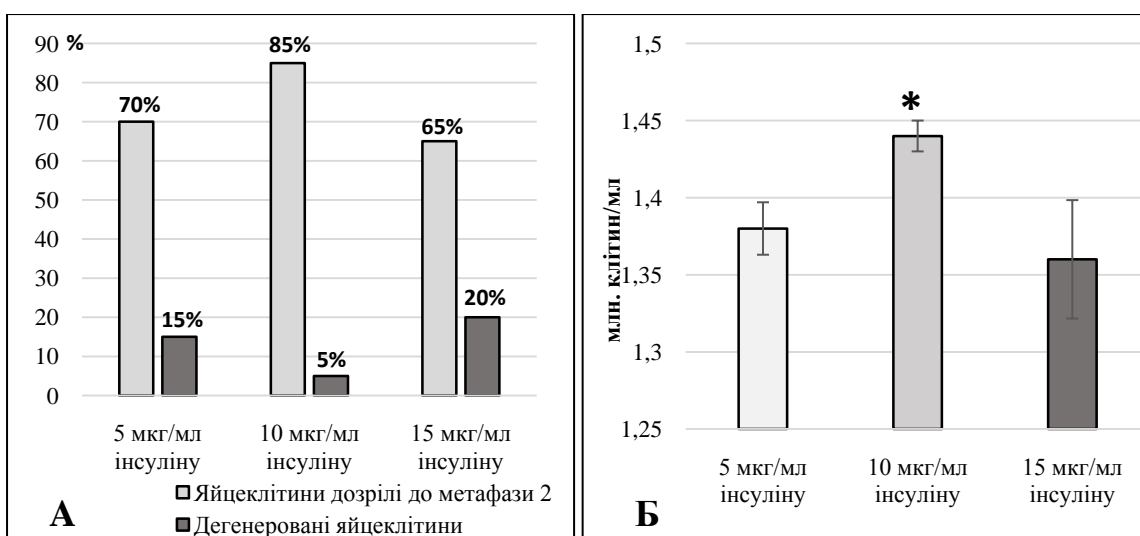


Рис. 3. **А** – кількість життєздатних клітин гранульози, **Б** – кількість ОКК, дозрілих до метафази-2 та дегенованих ОКК, після 24-ох годин за різних концентрацій інсуліну в середовищі ( $M \pm m$ ,  $n=3-20$ ). \*  $P < 0,05$  (достовірна різниця, порівняно з першою дослідною групою).

Дані визначення активності лактатдегідрогенази, рівня стероїдогенезу, біосинтезу холестеролу в кондиційному середовищі за умов додавання різних концентрацій інсуліну для культивування клітин гранульози та дозрівання ОКК наведено у таблиці 1. Інсулін у концентрації 10 мкг/мл викликав підвищення рівня естрадіолу, прогестерону та холестеролу в кондиційному середовищі. Суттєвої різниці в активності лактатдегідрогенази між дослідними групами не виявлено (табл. 1).

Позитивний вплив інсуліну може бути зумовлений опосередковано через інсуліно-подібний фактор росту 1. Такий ефект інсуліну *in vitro*, імовірно, здійснюється через його зв'язування із рецепторами інсуліно-подібного фактору росту 1, з якими інсулін має деяку спорідненість за підвищеної його концентрації. В умовах створеної комбінованої просторово-організованої клітинної системи дія інсуліну може посилюватися через безпосередню дію на ооцити та опосередковано через клітини гранульози, що дозволяє забезпечити більш якісне дозрівання ооцитів *in vitro* [10, 11].

## Висновки

Додавання до основного середовища 199 гіалуронової кислоти в концентрації 0,1–0,5 мг/мл забезпечує отримання оптимальної в'язкості для створення комбінованої просторово-організованої клітинної системи і сприятливих умов для проліферативної активності та життєздатності клітин гранульози.

0,5 мг/мл гіалуронової кислоти в середовищі підвищує проліферативну активність клітин гранульози та концентрацію прогестерону на 72-гу, а естрадіолу на 48-му та 72-гу годину культивування (порівняно з контрольною групою).

Додавання в середовище 199 10 мкг/мл інсуліну за умов використання комбінованої просторово-організованої клітинної системи для дозрівання ОКК призводить до підвищення проліферативної активності та метаболічних процесів у культурі клітин гранульози, що викликає покращення якості дозрівання ОКК до рівня 85 %.

Комбінована просторово-організована клітинна система дозволяє не тільки забезпечити більш якісне дозрівання ооцитів, а й може використовуватися як інструмент у вивченні впливу різних фізико-хімічних чинників на якість гамет *in vitro*.

Таблиця 1. Динаміка лактатдегідрогеназної активності, біосинтезу холестеролу, естрадіолу, прогестерону за різних концентрацій інсуліну в середовищі за культивування в комбінованій просторово-організованій клітинній системі гранульози яєчників кролів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Дослідні групи	Активність ЛДГ (ІО/л)	Концентрація холестеролу (ммоль/мл)	Концентрація естрадіолу (пмоль/мл)	Концентрація прогестерону (нмоль/мл)
ОС + 0,5 мг/мл гіалуронової кислоти + 20 ОКК + 5 мкг/мл інсуліну	62,6±3,3	1,38±0,02	214,5±6,6	18,67±0,4
ОС + 0,5 мг/мл гіалуронової кислотим + 20 ОКК + 10 мкг/мл інсуліну	71,3±2,8	<b>1,46±0,02 *</b>	<b>247,8±4,0 *</b>	<b>21,7±0,3 *</b>
ОС + 0,5 мг/мл гіалуронової кислоти + 20 ОКК + 15 мкг/мл інсуліну	64,0±2,1	1,33±0,04	221±8,5	17,9±0,6

Примітка. \*  $P < 0,05$  – достовірна різниця (порівняно з першою дослідною групою).

## References

- Lonergan P., Fair T. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2016. Vol. 4. P. 255-268. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110822.
- Silva V., van den Hurk R., Figueiredo J.R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domest Anim Endocrinol*. 2016. Vol. 55. P. 123-135. doi: 10.1016/j.domaniend.2015.12.006.
- Gilchrist R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*. 2011. Vol. 23. P. 23–31. doi: 10.1071/RD10225.
- Jahromi B.N., Mosallanezhad Z., Matloob N., Davari M., Ghobadifar M.A. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: A co-culture study. *Clin Exp Reprod Med*. 2015 Vol. 42. №3. P. 111–117. doi: 10.5653/cerm.2015.42.3.111.

5. Li Z, Zhang P., Zhang Z. Pan B., Chao H., Li L., Pan Q., Shen W. A co-culture system with preantral follicular granulosa cells *in vitro* induces meiotic maturation of immature oocytes. *Histochemistry & Cell Biology*. 2011. Vol. 135, №5. P. 513–520. doi: 10.1007/s00418-011-0812-4.
6. Alam M.H., Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells *in vitro*. *Reproductive Medicine and Biology*. 2020. Vol. 19. № 1. P. 13-23. doi: 10.1002/rmb2.12292.
7. Casper R., Haas J., Hsieh T.-B., Bassil R., Mehta C. Recent advances in *in vitro* fertilization. *Version 1. F1000Res*. 2017. Vol. 6. P 1616. doi: 10.12688/f1000research.11701.1.
8. Mareiab W.F., Ghafaric F., Fouladi-Nashta A.A. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2012. Vol. 7, №3. P. 670-677. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.03.013.
9. Zhao G., Zhou X., Fang T., Hou Y., Hu Y. Hyaluronic acid promotes the expression of progesterone receptor membrane component 1 via epigenetic silencing of miR-139-5p in human and rat granulosa. *Cells Biology of Reproduction*. 2014. Vol. 91. № 5. P. 1-9, doi: 10.1095/biolreprod.114.120295
10. 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. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00259-4.
11. Riosa G.L., Buschiazob J., Muccia N.C., Kaisera G.G., Cesaric A., Alberio R.H. Combined epidermal growth factor and hyaluronic acid supplementation of *in vitro* maturation medium and its impact on bovine oocyte proteome and competence. *Theriogenology*. 2015. Vol. 83. № 5. P. 874-880 doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.022.

**SYRVATKA V.J.<sup>1,2</sup>, SLYVCHUK Yu.I.<sup>2</sup>, SHTAPENKO O.V.<sup>2</sup>, GROMYKO O.M.<sup>1</sup>, GEVKAN I.I.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Ivan Franko National University of Lviv,

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskogo str., 4, e-mail: vasyi.syrvatka@lnu.edu.ua

<sup>2</sup> Institute of Animal Biology NAAS,

Ukraine, 79034, Lviv, V. Stusa str., 38, e-mail: gavkan.iv@gmail.com

#### **COMBINED SPACE-ORGANIZED SYSTEM FOR ANIMALS OOCYTES MATURATION *IN VITRO***

**Aim.** The aim of the work was to create a space-organized system for oocytes maturation based on rabbits granulosa cells, hyaluronic acid (for structural organization of this system) and insulin, as an important growth factor. **Methods.** Cultivation of granulosa cells and oocytes maturation *in vitro*, biochemical determination of lactate dehydrogenase activity and cholesterol concentration, and determination of progesterone and estradiol concentrations by enzyme immunoassay were done. **Results.** Hyaluronic acid in concentration of 0.5 µg/ml increased proliferation of granulosa cells and progesterone concentration in the conditioned medium on 72 h of cultivation, and estradiol on 48 and 72 hours of cultivation was found. The degree of oocyte maturation to metaphase-2 was 85% by the influence of 10 µg/ml insulin. Same concentration of insulin increased granulosa cells proliferation, estradiol, progesterone and cholesterol concentration in the conditioning medium after 24 hours of cultivation. **Conclusions.** The optimal parameters of the combined space-organized culture system are 1 million cells/ml of granulosa with the addition of 0.5 µg/ml hyaluronic acid and 10 µg/ml insulin, which creates the optimal conditions for the maturation of oocytes to metaphase-2 cell cycle. **Keywords:** oocytes, granulosa cells, hyaluronic acid, insulin, *in vitro*.