

УДК: 591.465.12:57.085.23:57.086.164:57.086.169

## Вплив Hoechst-фарбування на розвиток *in vitro* ооцитів миші А.О.Колеснікова

*Інститут тваринництва НААН (Харків, Україна)*

У статті наведено результати дослідження впливу процедури Hoechst-фарбування на життєздатність ооцитів миші. Вивчено дію різних концентрацій барвника Hoechst і часу УФ-опромінення на розвиток *in vitro* ооцитів миші. Встановлено, що концентрація барвника Hoechst 33342 1 мкг/мл при експозиції 40 хв. є нешкодливою для запліднення *in vitro* дозрілих ооцитів миші та подальшого розвитку одержаних ембріонів впродовж ранніх доімплантаційних стадій. Підвищення концентрації Hoechst 33342 до 5 мкг/мл знижує рівень запліднення ооцитів та розвитку одержаних ембріонів і вірогідно збільшує частку фрагментованих ембріонів. УФ-опромінення Hoechst-пофарбованих ооцитів миші впродовж 5 с на рівні тенденції, а впродовж 30 с вірогідно знижує рівень дроблення ембріонів миші та підвищує рівень їх дегенеративних змін.

**Ключові слова:** ооцити, ембріони, Hoechst-фарбування, УФ-опромінення, запліднення *in vitro*.

## Влияние Hoechst-окрашивания на развитие *in vitro* ооцитов мыши А.А.Колесникова

В статье изложены результаты исследования влияния процедуры Hoechst-окрашивания на жизнеспособность ооцитов мыши. Изучено воздействие различных концентраций красителя Hoechst и времени УФ-облучения на развитие *in vitro* ооцитов мыши. Установлено, что концентрация красителя Hoechst 33342 1 мкг/мл при экспозиции 40 мин. является неповреждающей для оплодотворения *in vitro* зрелых ооцитов мыши и дальнейшего развития полученных эмбрионов на протяжении ранних доимплантационных стадий. Повышение концентрации Hoechst 33342 до 5 мкг/мл снижает уровень оплодотворения ооцитов и развития полученных эмбрионов и достоверно увеличивает долю фрагментированных эмбрионов. УФ-облучение Hoechst-окрашенных ооцитов мыши в течение 5 с на уровне тенденции, а в течение 30 с достоверно снижают уровень дробления эмбрионов мыши и повышают их уровень дегенеративных изменений.

**Ключевые слова:** ооциты, эмбрионы, Hoechst-окрашивание, УФ-облучение, оплодотворение *in vitro*.

## The influence of Hoechst staining on mouse oocytes development *in vitro* А.А.Kolesnikova

The results of investigation of influence of Hoechst-staining procedure on survival of mouse oocytes are presented in the article. The influence of concentration of Hoechst dye and time of UV-irradiation on the mouse oocyte development *in vitro* was studied. It was found that concentration of Hoechst 1 mkg/ml at 40 min. exposition was not damage for fertilization *in vitro* of matured mouse oocytes and further development of obtained embryos during early preimplantation stages. The increase of Hoechst concentration up to 5 mkg/ml resulted in decreasing of rate of oocytes fertilization and rate of cleavage of obtained embryos and significantly increased part of fragmented embryos. UV-irradiation of Hoechst-stained mouse oocytes during 5 s tends to and during 30 s significantly decreased cleavage rate of mouse embryos and increased rate of their degenerative changes.

**Key words:** oocytes, embryos, Hoechst staining, UV irradiation, fertilization *in vitro*.

### Вступ

Hoechst є флуоресцентним ДНК-специфічним вітальним барвником, який застосовується для візуалізації хромосомного матеріалу в біологічних об'єктах. Hoechst використовують для спостереження подій клітинного циклу в ооцитах і ембріонах (Betthausen et al., 1993), проведення та контролю енуклеації клітин, визначення наявності та кількості пронуклеусів після запліднення ооцитів (Kay et al., 1991), для диференційного підрахунку клітин внутрішньої клітинної маси й трофобласту в бластоцистах (Handyside, Hunter, 1984), для оцінки якості фолікулів та визначення апоптозу гранульозних клітин фолікула (Segino et al., 2005) тощо. Досить часто барвник Hoechst застосовують у поєднанні з іншими барвниками, наприклад, Hoechst спільно з Sybr 14 і родамін-тубуліном застосовується для одночасного фарбування ДНК і візуалізації тубуліну веретена поділу (Gook et al., 2000).

Однак показано, що процедура Hoechst-фарбування ооцитів впливає на їх життєздатність. У результаті обробки, проведеної в першій половині дозрівання, знижувався рівень досягнення ооцитами стадії метафази II мейозу й рівень запліднення (Viuff et al., 1991; Velilla et al., 2002). Hoechst-фарбування ооцитів на стадії метафази II приводило до формування аномального жіночого пронуклеуса. Використання барвника Hoechst приводило також до порушення формування веретена поділу та недостатнього рівня мейоз/мітоз стимулюючого фактора (MPF) (Bradshaw et al., 1995). Після експозиції з Hoechst знижується також рівень нормальної пенетрації ооцитів при заплідненні й рівень їх розвитку до стадій морули та бластоцисти (Viuff et al., 1991).

При проведенні Hoechst-фарбування ооцитів дослідники змінюють час експозиції з барвником, час УФ-опромінення, довжину хвилі при опроміненні та концентрацію барвника в середовищі (Keefe et al., 1994; Westhusin et al., 1991; Wolfe, Kraemer, 1992; Betthausen et al., 1993; Dominko et al., 2000). При цьому немає однозначної думки про вплив цих факторів на біологічний об'єкт.

Метою роботи було визначити достатню й неущкоджуючу концентрацію барвника Hoechst і час УФ-опромінення для Hoechst-фарбування ооцитів миші.

### Методика

Для Hoechst-фарбування дозрілі ооцити миші очищували від клітин кумулюса у 0,1%-му розчині гіалуронідази впродовж 1–2 хв. шляхом піпетування під контролем мікроскопа МБС-9. Після цього ооцити відмивали від розчину гіалуронідази у фосфатно-буферному середовищі Дюльбекко (ФСБ Дюльбекко) ("Sigma", USA) та оцінювали за морфологічними ознаками. Для подальшої роботи відбирались ооцити з наявним полярним тільцем і гомогенною ооплазмою. Hoechst-фарбування дозрілих ооцитів миші проводили, використовуючи барвник Hoechst 33342 ("Sigma", USA). Ооцити дослідних груп витримували впродовж 40 хв. у ФСБ Дюльбекко, доповненому барвником Hoechst у концентрації 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 3 мкг/мл або 5 мкг/мл. Після закінчення строку експозиції з барвником ооцити відмивали у ФСБ Дюльбекко. Флуоресценцію Hoechst-пофарбованої ДНК ооцитів збуджували за допомогою ртутної лампи ДРШ-250-3, яка входить до комплексу мікроскопа МБИ-15 ("ЛОМО") і випромінює світло в синьо-фіолетовій та в ближній ультрафіолетовій області спектру. Для збудження флуоресценції об'єктів використовували світлофільтри ФС1 або СС15 з максимумом пропускання  $\lambda=400$  нм. УФ-промені до проходження та після їх проходження через об'єкт прибирали за допомогою світлофільтра БС8, який є прозорим для видимої частини спектру та зрізає його ультрафіолетову частину. Hoechst-пофарбовані ооцити розміщували поодинокі у краплі ФСБ Дюльбекко й опромінювали УФ-променями протягом 30 с, 5 с та 0 с (контроль), після чого ооцити переносили до середовища для запліднення.

Запліднення ооцитів миші *in vitro* проводили спермою, отриманою після забою самця миші шляхом її видавлювання із сім'явиносних проток у середовище Т6 (Биология развития ..., 1990). Після інкубації сперматозоїдів у середовищі Т6 впродовж 25 хв при 37°C з 5% CO<sub>2</sub> при максимальній вологості повітря оцінювали концентрацію сперматозоїдів за допомогою лічильної камери Горяева і додавали їх для капітації у краплі середовища Т6, доповненого сироватковим альбуміном бугая ("Sigma", USA) у концентрації 15 мг/мл. Через 2 години у ці ж краплі переносили для запліднення ооцити миші. Проінкубовані зі сперматозоїдами впродовж 4 годин ооцити відмивали і переносили до крапель середовища М16 ("Sigma", USA) під мінеральною олією та культивували впродовж 20 год. Цитогенетичний аналіз проводили за Тарковським (Tarkowski, 1966). Препарати аналізували, використовуючи мікроскоп Axiovert-35 ("Opton", Німеччина).

### Результати та обговорення

На рис. 1 зображено фото дозрілих ооцитів миші, пофарбованих барвником Hoechst. Як видно з рис. 1, ооцити після фарбування зберігали свій морфологічний стан, концентрації барвника Hoechst як 5 мкг/мл, так і 1 мкг/мл було достатньо для збудження флуоресцентного свічення хромосом ооцитів.

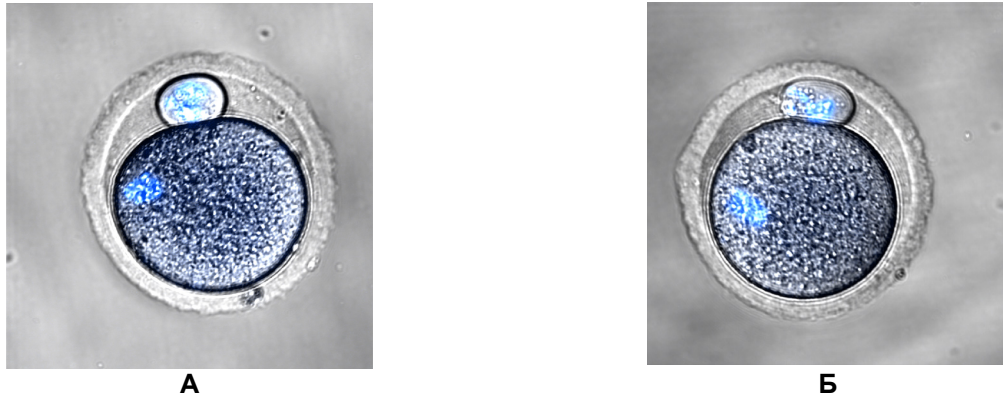


Рис. 1. Фото флуоресціюючих ооцитів після експозиції впродовж 40 хв. з барвником Hoechst у концентрації: А – 1 мкг/мл; Б – 5 мкг/мл (×150)

Для визначення впливу барвника Hoechst у залежності від його концентрації у середовищі на функціональний стан ооцитів досліджено рівень запліднення *in vitro* ооцитів миші після фарбування. Ооцити розподілили на 5 груп і перед заплідненням витримували у середовищі з концентрацією барвника Hoechst 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 3 мкг/мл, 5 мкг/мл та 0 мкг/мл (контроль). Результативність запліднення відображає рис. 2. У залежності від концентрації барвника рівень запліднення *in vitro* ооцитів миші змінювався. На рівні тенденції спостерігалось незначне підвищення рівня запліднення ооцитів порівняно з контрольною групою (n=42) при використанні концентрацій барвника 1 мкг/мл і 2 мкг/мл відповідно на 5,9% (n=36) та на 4,0% (n=39). Експозиція ооцитів з Hoechst при концентрації 3 мкг/мл (n=37) незначно знижувала рівень запліднення ооцитів на 3,8%. Значне зниження заплідненості ооцитів до рівня 30,2% (n=43) порівняно з групами 1 мкг/мл (p<0,01), 2 мкг/мл (p<0,05) та контрольною групою (p<0,05) спостерігалось після використання Hoechst у концентрації 5 мкг/мл. Отже, в невеликих концентраціях (1 мкг/мл та 2 мкг/мл) Hoechst є нешкідливим для запліднення *in vitro* ооцитів миші, концентрація 3 мкг/мл незначно знижує цей показник. Концентрація Hoechst 5 мкг/мл негативно впливає на життєздатність ооцитів миші, суттєво пригнічуючи їх рівень запліднення поза організмом. Концентрації 1 мкг/мл та 2 мкг/мл Hoechst 33342 мають незначну стимулюючу дію на заплідненість *in vitro* ооцитів миші.

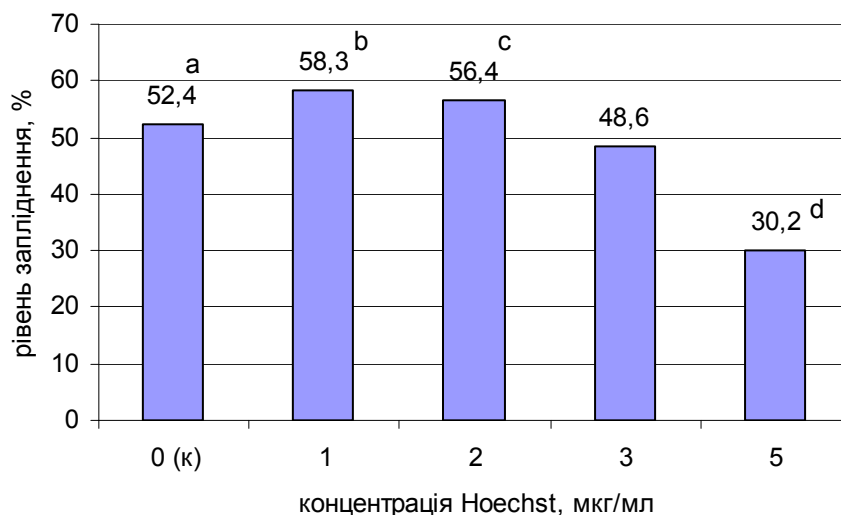


Рис. 2. Рівень запліднення ооцитів миші поза організмом після Hoechst-фарбування в залежності від концентрації барвника

Примітки: a:d, c:d – p<0,05; b:d – p<0,01.

Результати подальшого розвитку поза організмом запліднених ооцитів миші після Hoechst-фарбування відображає табл. 1.

Таблиця 1.

Результати розвитку запліднених *in vitro* ооцитів миші після процедури Hoechst-фарбування з різними концентраціями барвника

Концентрація Hoechst, мкг/мл	Всього, n	Кількість ембріонів на стадії, n (%)			Рівень дегенерацій, n (%)
		2-х клітин	3-х клітин	4-х клітин	
0 (контроль)	22	15 (68,2±9,9)	0	6 (27,3±9,5)	1 (4,5±4,4) <sup>a</sup>
1	21	13 (61,9±10,6)	3 (14,3±7,6)	4 (19,0±8,6)	1 (4,8±4,7) <sup>a</sup>
2	22	13 (59,1±10,5)	4 (18,2±8,2)	3 (13,6±7,3)	2 (9,1±6,3) <sup>b</sup>
3	18	11 (61,1±11,5)	2 (11,1±7,4)	2 (11,1±7,4)	3 (16,7±8,8) <sup>c</sup>
5	26	14 (53,8±13,8)	0	0	12 (46,2±13,8) <sup>d</sup>

Примітки. a:d –  $p < 0,001$ ; b:d –  $p < 0,01$ ; c:d –  $p < 0,05$ .

Частка ембріонів на стадії 2-х клітин, одержаних після запліднення Hoechst-пофарбованих ооцитів миші, суттєво не відрізнялася для контрольної та всіх дослідних груп. Ембріонів, одержаних з ооцитів контрольної групи, на стадії 3-клітинного ембріона не виявлено. Це свідчить про те, що їх бластомери були більш синхронними в другому клітинному поділі й легше переходили на 4-клітинну стадію, де вони були більш численними порівняно з усіма дослідними групами. Не було відмічено розвитку далі 2-клітинної стадії в ембріонів, які розвинулися з Hoechst-пофарбованих ооцитів при концентрації 5 мкг/мл, тобто їх потенціалу розвитку було досить лише для подолання одного клітинного поділу. Частка дегеноерованих ембріонів була вірогідно вище в групі, яка витримувалася при концентрації барвника 5 мкг/мл, порівняно з контролем ( $p < 0,001$ ) та групами з концентрацією Hoechst 1 мкг/мл ( $p < 0,001$ ), 2 мкг/мл ( $p < 0,01$ ) та 3 мкг/мл ( $p < 0,05$ ), що свідчить про негативний вплив цієї концентрації барвника на розвиток ембріонів. Рівень дегенерацій серед ембріонів, фарбованих при концентрації Hoechst 1 мкг/мл, не відрізнявся від контролю. Слід відмітити, що хоча й не встановлено вірогідної різниці між рівнем дегенерацій у групах ооцитів, фарбованих при концентрації Hoechst 1 мкг/мл та 2 мкг/мл і 3 мкг/мл, рівень відхилень розвитку в останніх двох групах у декілька разів перевищував аналогічний показник у групі ооцитів, пофарбованих при концентрації барвника 1 мкг/мл.

На другому етапі роботи досліджували вплив часу УФ-опромінення на розвиток Hoechst-пофарбованих ооцитів миші. Ооцити було розподілено на 3 групи. Ооцити першої, контрольної, групи пофарбували при концентрації барвника Hoechst 1 мкг/мл без УФ-опромінення. Другу групу ооцитів після експозиції з барвником Hoechst при концентрації 1 мкг/мл опромінювали УФ-променями впродовж 5 с, а третю групу – впродовж 30 с. Після описаних маніпуляцій проводили запліднення ооцитів миші *in vitro*, результати представлено в табл. 2.

Частка ооцитів, які запліднилися та розвинулися до стадії 2–4-клітинного ембріона в системі *in vitro*, була найвища у контрольній групі. Експозиція в розчині барвника Hoechst та УФ-опромінення Hoechst-пофарбованих ооцитів миші знизили цей показник у 2-й та 3-й групах відповідно на 11,5% (на рівні тенденції) та 27,6% ( $p < 0,01$ ). Отже, зі збільшенням часу УФ-опромінення Hoechst-пофарбованих ооцитів миші знижується їх рівень запліднення *in vitro*.

Цитогенетичний аналіз ооцитів всіх трьох груп, представлених у табл. 2, показав наявність ооцитів та ембріонів з фрагментацією цитоплазми. Ці ооцити та ембріони за морфологічними ознаками виглядали як 2-клітинні або 4-клітинні ембріони з нерівномірним поділом бластомерів, але при цитогенетичному аналізі виявилися ембріонами з меншою кількістю ядер або ооцитами. Їх відсоток у дослідних 2-й та 3-й групах порівняно з контролем був вищим відповідно на 12,8% ( $p < 0,1$ ) та 15,8% ( $p < 0,05$ ). На нашу думку, таке підвищення рівня фрагментації може бути результатом впливу барвника Hoechst і УФ-опромінення на цитоплазму та/або цитоплазматичні структури ооцита.

**Таблиця 2.**  
**Розвиток запліднених in vitro ооцитів миші після Hoechst-фарбування та УФ-опромінення за результатами цитогенетичного аналізу**

Група/Обробка	Кількість ооцитів та ембріонів після запліднення in vitro						
	Всього, п	на стадії розвитку				з хромосомними порушеннями	
		2-4-клітинний ембріон		незапліднена яйцеклітина			
		п	%	п	%	п	%
1/Контроль	43	18	41,9±7,5 <sup>a</sup>	23	53,5±7,6	2	4,6±3,2 <sup>c</sup>
2/Hoechst+УФ, 5 с	46	14	30,4±6,8	24	52,2±7,4	8	17,4±5,6
3/Hoechst+УФ, 30 с	49	7	14,3±5,0 <sup>b</sup>	32	65,3±6,8	10	20,4±5,8 <sup>d</sup>

Примітки. a:b –  $p < 0,01$ ; c:d –  $p < 0,05$ .

Отже, процедура Hoechst-фарбування та УФ-опромінення впливає на потенціал розвитку ооцитів. Це може бути пов'язано з внутрішньоклітинними змінами на молекулярному рівні, які відбуваються під впливом барвника під час зв'язування Hoechst з ДНК ооцитів та при дії УФ-променів. За літературними даними, під час процедури Hoechst-фарбування ооцитів на клітинному рівні відбувається втрата цілісності мембран, збільшення мембранного потенціалу мітохондрій, зміна характеру синтезу протеїнів в ооцитах (Smith, 1993). Слід також приймати до уваги можливість ушкоджуючого впливу УФ-опромінення на цитоплазму ооцита та мітохондріальну ДНК, навіть при коротких експозиціях опромінення клітини (Dominko et al., 2000; Liu et al., 2000). Крім вказаних факторів, при візуалізації ДНК на хроматин діє велика кількість енергії, яку Hoechst передає йому під час свічення, тому може мати місце відстрочений у часі пошкоджуючий вплив УФ-опромінення на потенціал розвитку ооцита (Tsunoda et al., 1987). Отже, при очевидній користі від застосування вітальних барвників необхідно пам'ятати і про їх негативний ефект, який слід враховувати при роботі з ними.

#### Висновки

Концентрація барвника Hoechst 33342 1 мкг/мл при експозиції 40 хв за заплідненістю ооцитів, за рівнем розвитку ембріонів впродовж ранніх доімплантаційних стадій та рівнем дегенеративних змін є нешкодливою для ооцитів миші.

Концентрація барвника Hoechst 5 мкг/мл негативно впливає на заплідненість ооцитів миші та подальший розвиток ембріонів in vitro.

УФ-опромінення Hoechst-пофарбованих ооцитів миші впродовж 5 с на рівні тенденції, а впродовж 30 с вірогідно знижує їх рівень запліднення in vitro.

#### Список літератури

- Биология развития млекопитающих: Методы / Пер. с англ.; под ред. М.Манк. – М.: Мир. – 1990. – 406с. / *Biologiya razvitiya mlekopitayushchikh: Metody / Per. s angl.; pod red. M.Mank. – M.: Mir. – 1990. – 406s.*
- Bethausen J.M., Scott B.M., Gibbons J.R. et al. The use of Hoechst 33342 to stain donor nuclei used in the bovine nuclear transfer procedure // *Theriogenology*. – 1993. – Vol.39, I.1. – P.187.
- Bradshaw J., Jung T., Fulka J.Jr. et al. UV irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* – 1995. – Vol.41, №4. – P. 503–512.
- Dominko T., Chan A., Simerly C. et al. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis // *Biol. Reprod.* – 2000. – Vol.62. – P. 150–154.
- Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I.H. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle // *Hum. Reprod.* – 1993. – Vol.8, №7. – P. 1101–1109.
- Handyside A.H., Hunter S. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts *in situ* using polynucleotide-specific fluorochromes // *J. Exp. Zool.* – 1984. – Vol.231. – P. 429–434.
- Kay G.W., Hawk H.W., Waterman R.A. et al. Identification of pronuclei in in vitro fertilized cow embryos // *Animal Biotechnology*. – 1991. – Vol.2, №1. – P. 45–59.
- Keefer C.L., Stice S.L., Matthews D.L. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves // *Biol. Reprod.* – 1994. – Vol.50. – P. 935–939.



- Liu L., Oldenbourg R., Trimarchi J.R. et al. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – Vol.18, №2. – P. 223–225.
- Segino M., Ikeda M., Hirahara F. et al. *In vitro* follicular development of cryopreserved mouse ovarian tissue // *Reproduction.* – 2005. – Vol.130, №2. – P.187–192.
- Smith L.C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro* // *J. Reprod. Fertil.* – 1993. – Vol.99. – P. 39–44.
- Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // *Cytogenetics.* – 1966. – №5. – P. 394–400.
- Tsunoda Y., Yasui T., Shioda Y. et al. Full term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two cell embryos // *J. Exp. Zool.* – 1987. – Vol.242. – P. 147–151.
- Velilla E., López-Béjar M., Rodríguez-González E. et al. Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes // *Zygote.* – 2002. – Vol.10, №3. – P. 201–208.
- Viuff D., Madison V., Hyttel P. et al. Fluorescent intravital staining of bovine oocytes and zygotes // *Theriogenology.* – 1991. – Vol.35, I.1. – P.291.
- Westhusin M.W., Pryor J., Bondioli K.R. Nuclear transfer in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed and nuclear transfer donor embryos // *Mol. Reprod. Dev.* – 1991. – Vol.28. – P. 119–123.
- Wolfe B.A., Kraemer D.S. Methods in bovine nuclear transfer // *Theriogenology.* – 1992. – Vol.37, I.1. – P. 5–15.

---

**Представлено: Є.І.Смольянінова / Presented by: Ye.I.Smol'yaninova**

**Рецензент: А.В.Некрасова / Reviewer: A.V.Nekrasova**

*Подано до редакції / Received: 09.11.2011*