

РОЛЬ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОРГАНИЗМА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *in vitro*

Ганджа А.И., Леткевич Л.Л., Ракович Е.Д., Костикова И.В.*, Мотузко Н.С.**

*РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», г. Жодино,

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

Проведенные исследования показали перспективность использования клеточных репродуктивных технологий в селекционно-племенной работе в скотоводстве. Их применение в сочетании с трансплантацией эмбрионов позволит в десятки раз эффективнее использовать репродуктивный потенциал отдельных, наиболее высокоценных доноров яйцеклеток для генетического улучшения продуктивности популяций животных, их ускоренного преобразования в необходимом направлении.

The researches conducted have shown prospective the use of cell reproductive technologies in the livestock selection-breeding work. The use of them with combination of embryo transplantation will let to use of reproductive potential much more effective for genetic improvement of productivity of animals.

С переходом на интенсивные технологии ведения животноводства возрастают продуктивные нагрузки на животных, снижается воспроизводительная способность коров, что приводит к преждевременному выбытию ценных в генетическом плане животных из основного стада (2). В то время как за продуктивную жизнь эти животные приносят 2-4 теленка, потенциальный запас ооцитов в яичниках коровы составляет несколько сот тысяч. В течение жизни огромная часть ооцитов подвергается атрезии и в воспроизводстве не участвует. Биотехнологические методы размножения позволяют с большей эффективностью использовать репродуктивный и генетический потенциал высокоценных животных. Гормональное стимулирование полиовуляции позволяет частично повысить реализацию генетического потенциала и получить от коровы дополнительное потомство. Однако при этом у животных происходят физиологические нарушения, связанные с переизбыточным содержанием гормонов в крови животных, что также приводит к их выбраковке. Решение данной проблемы возможно путем созревания и оплодотворения ооцитов вне организма и дальнейшего культивирования полученных таким образом зигот. В настоящее время во многих лабораториях мира разработаны системы дозревания ооцитов из яичников убитых на мясокомбинате коров. Однако вне организма получать стабильный результат не представляется возможным в силу ряда причин, основной из которой является разнородность яичников убитых животных (4).

Успешное культивирование ооцитов *in vitro* зависит от индивидуальных особенностей животных, их клинического состояния, в т.ч. морфофункционального состояния репродуктивных органов, условий созревания и оплодотворения ооцитов, а также развития зародышей до преимплантационных стадий вне организма. Как правило, выбракованные коровы имеют нарушения воспроизводительной функции, что не может не отразиться на условиях и результате получения ранних зародышей вне организма (1,5).

Моделирование систем дозревания ооцита – одна из важнейших задач в области клеточной репродуктивной технологии. Усовершенствование условий созревания и оплодотворения ооцитов *in vitro* с целью максимального приближения к условиям *in vivo* позволит обеспечить высокий выход способных к оплодотворению и дальнейшему развитию в эмбрионы до стадии морула-бластоциста яйцеклеток за счет сочетания биологически активных веществ в культуральных средах, соблюдения газового и температурного режимов. Известно, что в поддержании роста и питания клеток важную роль играет сыворотка за счет находящегося в ней белков, аминокислот, предшественников нуклеиновых кислот и витаминов. Кроме того, в естественном половом цикле при созревании ооцитов до стадии оплодотворения решающую роль играют гонадотропин-релизинг гормоны, способствующие выделению гормонов, в том числе фолликулостимулирующего и лютеинизирующего (6,7).

В последние годы в сельском хозяйстве как нашей страны, так и за рубежом широко применяются фитогормоны и их синтетические аналоги в качестве ростовых стимуляторов, которые обладают достаточно большей биологической активностью при низких концентрациях.

Использование монослойных культур соматических клеток фолликула, в частности клеток кумулюса, позволяет значительно увеличить уровень дробления клеток и выход морул-бластоцист за счет существования тесной связи между клетками кумулюса и созреванием ооцита, а также благодаря наличию гиалуроновой кислоты, способствующей процессу оплодотворения (3,8,9).

Целью нашей работы было выявление оптимальных параметров получения эмбрионов вне организма от высокопродуктивных коров после их убоя на мясокомбинате.

Объектом экспериментальных исследований служили ооцит-кумулюсные комплексы коров чернопестрой породы и условия их созревания. Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) выделяли рассечением ткани яичников, помещенных в среду Хэнкса. Поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумулюсных комплексов проводили микроскопическим исследованием. Затем ооциты помещали в питательную среду для созревания клеток в CO₂-инкубатор при 38,5°C с максимальной влажностью (98%) и присутствии в воздухе 5% CO₂ под слоем минерального масла в течение 24 часов. Созревшие ооциты оплодотворяли заморожено-оттаянной спермой после проведения процедуры капацитации. Эффективность оогенеза при получении преимплантационных зародышей вне организма определялась по уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей.

Нами изучалось влияние индивидуальных особенностей коров-доноров на эффективность получения эмбрионов вне организма. Выход ооцитов на одно животное составил от 7 до 48, уровень дробления – от 16,7

до 90,9%, выход морул составил 0-27,3%, а бластоцист – 0-31,8%. Средние показатели выглядят следующим образом: выход ооцитов на одно животное составил 23,2; уровень дробления – 47,6%; выход морул - 6,9%; выход бластоцист – 9,1%; всего морул-бластоцист – 16,0%. Заслуживает внимания тот факт, что уровень трансформации морул в бластоцисты составляет 51,3%, в то время как 48,7% клеток на стадии морулы прекращают свое развитие и дегенерируют, что говорит о существовании критического периода в развитии эмбрионов не только на стадии 8-16 клеток, но и на стадии перехода морулы в бластоцисту.

Не менее важным фактором в технологии получения эмбрионов вне организма является оплодотворяющая способность заморожено-оттаянной спермы быков-производителей. Нами проанализирована оплодотворяющая способность спермы различных быков. Уровень дробления при этом колебался от 28,8 до 45,6%, выход морул-бластоцист от 7,9 до 25,0%, а уровень трансформации морул в бластоцисты от 0 до 66,7%.

Яичники, полученные после убоя животных на мясокомбинате, очень разнородны по своему физиологическому состоянию. Нами проанализировано морфологическое состояние 69 яичников. У 60,9% яичников выбракованных коров наблюдались нарушения овариальной функции, от этих животных получено в среднем на яичник 17,3-24,1 ооцита. Из яичников в фолликулярной и лютеиновой стадии полового цикла извлечено в среднем 28,7 и 27,4 ооцита на яичник. Наиболее высокий уровень созревания ооцитов и их последующего дробления был отмечен при использовании яичников в фолликулярной стадии – 60,7%, выход морул-бластоцист составил 28,5%. При использовании яичников в лютеиновой фазе полового цикла эти показатели составили 53,3% и 18,3% соответственно.

Анализ проведенных исследований по установлению взаимосвязи между объемом яичника и количеством и качеством извлеченных из яичников ооцитов показывает, что в среднем из одного яичника извлечено 19,8 клеток. Больше всего 23,1 и 21,7 ооцитов извлечено из яичников объемом 4,1-6,0 и 6,1-8,0 см³ соответственно. Из яичников данных объемов получено максимальное количество пригодных для культивирования вне организма клеток - 13,4 и 10,7 соответственно. В среднем количество ооцитов, способных возобновлять мейоз в условиях вне организма, на один яичник составило 9,7 при lim 6,4-13,4 или 49% от общего количества полученных ооцит-кумулясных комплексов.

Изучение влияния плотности посадки ооцитов на единицу площади на эффективность получения преимплантационных эмбрионов показало, что оптимальной плотностью является размещение 0,04-0,05 клеток на 1 мм². Это позволяет получать 52,1-53,6% дробящихся зародышей с выходом 11,9-12,5% морул-бластоцист от поставленных на инкубацию ооцит-кумулясных комплексов. При этом объем питательной среды должен составлять не менее 0,5 мл, что позволяет получать 54,5-61,7% дробящихся зародышей.

Использование в культуральных средах различных сывороток в качестве источника белков, аминокислот, предшественников нуклеиновых кислот и витаминов позволяет увеличить уровень созревания ооцитов и получение компетентных к дальнейшему развитию эмбрионов. В своих исследованиях мы использовали фетальную сыворотку телят (в количестве 15% к объему питательной среды), эстральную сыворотку коров (15%) и сыворотку быков в возрасте 18 мес. (10%). Установлено, что при применении бычьей сыворотки до метафазы II созрело 81,9% ооцитов, поставленных на культивирование, при этом уровень дробления составил 32,8%, а выход морул-бластоцист 14,7%. При применении фетальной или эстральной сыворотки через 24 часа созрело до метафазы II 82,1 и 84,1% ооцитов, что незначительно превысило данный показатель в предыдущей группе – на 0,6 и 2,2% соответственно. В то же время уровень дробления при применении фетальной сыворотки был выше по сравнению с бычьей на 2,1%, а при применении эстральной – на 12,1%. Показатели выхода преимплантационных эмбрионов находились в аналогичной зависимости: использование фетальной сыворотки увеличивало их выход на 1,2%, а эстральной – на 2,7%. Дополнительное введение в среду культивирования зародышей, содержащую бычью сыворотку, эстральной или фетальной сыворотки на 3-й день культивирования позволяет увеличить количество созревших до метафазы II яйцеклеток на 0,4-0,9%, уровень дробления на 2,7-12,0%, а выход морул-бластоцист – 1,4-2,5% по сравнению с группой, культивирующейся с применением только бычьей сыворотки.

В естественном половом цикле при созревании ооцитов до стадии оплодотворения решающую роль играют гонадотропин-релизинг гормоны, способствующие выделению гормонов, в том числе фолликулостимулирующего и лютеинизирующего. При стимулировании множественной овуляции для трансплантации эмбрионов эти препараты применяются с целью вызывания дружной овуляции фолликулов. Исследования показали, что применение синтетического аналога гонадотропин-релизинг гормона сурфагона в дозе 0,02 нг/мл в среде для созревания ооцитов способствовало повышению уровня созревания на 6,6%, а выход дробящихся зародышей после оплодотворения увеличился на 2,5% по сравнению с контрольной группой. При этом выход морул-бластоцист увеличился на 3,2% и составил 17,9% от числа выделенных ооцитов.

В последние годы в сельском хозяйстве как в нашей стране, так и за рубежом широко применяются фитогормоны и их синтетические аналоги в качестве ростовых стимуляторов, которые обладают достаточно большой биологической активностью при низких концентрациях. Мы провели исследования по использованию синтетического стероидного фитогормона эпибрассинолида в технологии получения эмбрионов *in vitro*. В результате исследований установлено, что высокая концентрация эпибрассинолида 2×10^{-4} моль/л позволила получить 42,2% дробящихся зародышей и лишь 4,4% зародышей пригодных для трансплантации, 57,8% клеток оказались неоплодотворенными. Снижение содержания фитогормона до 2×10^{-6} и 2×10^{-7} моль/л в культуральной среде положительно повлияло на уровень дробления – 48,6% и 46,4%, выход морул-бластоцист увеличился на 6,4 и 9,8% соответственно. Дальнейшее снижение концентрации гормона до 2×10^{-8} моль/л позволило получить 55,0% дробящихся клеток и 16,2% зародышей на стадии морулы-бластоциста, что оказалось выше на 1,7% и 1,2% по сравнению с контролем соответственно. При содержании эпибрассинолида 2×10^{-9} моль/л намечалось незначительное снижение показателей.

Использование монослоя кумулюсных клеток способствовало увеличению количества созревших

ооцитов на 5,2-5,7%, уровня дробления до 14,0-14,6% и выхода эмбрионов до 13,8-12,5% в зависимости от способа его получения по сравнению с группами клеток, культивировавшихся в отсутствие монослоя. Установлено, что при сокультивировании ооцит-кумулясных комплексов с плотным, компактным кумулюсом, а также при использовании предварительно полученного монослоя кумулюсных клеток выход созревших до стадии метафаза II ооцитов составил 71,8-72,5%, что на 13,0-13,7% выше по сравнению с клетками с рыхлым кумулюсом и на 19,7-20,4% в сравнении с клетками с частично отслоившимся кумулюсом. Аналогичная зависимость наблюдается и по выходу морул-бластоцист – 15,4-15,7% против 10,9-7,2% соответственно.

Таким образом, проведенные исследования показали перспективность использования клеточных репродуктивных технологий в селекционно-племенной работе в скотоводстве. Их применение в сочетании с трансплантацией эмбрионов позволит в десятки раз эффективнее использовать репродуктивный потенциал отдельных, наиболее высокоценных доноров яйцеклеток для генетического улучшения продуктивности популяций животных, их ускоренного преобразования в необходимом направлении.

Литература. 1. Ахмолдаева А.М., Сергеев Н.И., Порфирьев И.А. // *Сельскохозяйственная биология.* – 2003. – № 6. – С. 58–65. 2. Валюшкин К.Д.: *Ученые записки / Витебская государственная академия ветеринарной медицины.* – Витебск: УО ВГАВМ, 2004. – С. 105–107. 3. Игнатенко Л.В., Галиева Л.Д., Свиридов Б.Е. / *Актуальные проблемы биологии в животноводстве: тез. докл.* – Боровск, 1995. – С.182. 4. Кузьмина Т.И. / *Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: матер. 6 Межд. конф. 19-20 декабря 2006 г., ВИЖ.* – Дубровицы, 2006. – С. 108-113. 5. Кузьмич Р.Г. // *Ветеринарная наука – производству: мат. Межд. науч.-практ. конф.* – Мн., 2005. – Выпуск 38. – С. 309–311. 6. Лебедев А.В., Лебедева И.Ю., Кузьмина Т.И., Шапиев И.Ш. // *Сельскохозяйственная биология.* – 2005. – №2. – С. 14–20. 7. Сметанина И.Г.: *Автореф. дис. ... канд. биол. наук.* – Боровск, 2001. – 27 с. 8. Bruynzue A., Merton I., Wijst I. et al. *Theriogenology.* – 1997. Vol. 47. - № 1. 9. Marcos M.B., Spele A. R., Butine M. D. et al. *Theriogenology.* –1996. - № 1. - Vol. – P. 263.

УДК 636.2:612.64.089.67.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И САХАРОЗЫ.

Голубец Л.В., Старовойтова М.П., Заневская Е.К.
УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь, 230008

Как было установлено по результатам исследований, наиболее эффективным оказался этиленгликоль в концентрации 1,5М и сахароза – 1,0М. При их использовании в такой концентрации сохранность эмбрионов составила 93,8 – 96 %, а приживляемость 59,3 – 62,5%.

As it fixed by results of researches, the most effective appeared ethylene glycol in concentration 1,5M and a saccharose - 1,0M. At their use in such concentration safety of embryos has made 93,8-96%, and engraftment 59,3-62,5%.

Введение. Разработка метода долговременного хранения зародышей при низких температурах открыла новые аспекты в технологии трансплантации эмбрионов, а именно: расширила возможности использования лучших мировых генетических ресурсов, послужила предпосылкой для создания банка эмбрионов генетически ценных животных, сохранения генофонда редких и исчезающих пород, внесла в работу по трансплантации элемент планирования.

Сама по себе криоконсервация живых клеток представляет собой комплексный физико-химический процесс, регулируемый тепло- и водообменом между клеткой и окружающей средой, в течение которого жидкая фаза биообъектов переходит в твердую и наоборот [4, 6]. Хорошо известно, что только около 20% клеточной субстанции находится в твердом состоянии, все остальные компоненты находятся в водном растворе. Присутствие растворенных в клеточной субстанции ионов солей понижает точку замерзания в связи с чем раствор охлаждается ниже 0° С без образования кристаллов льда. При дальнейшем охлаждении происходит спонтанное образование центров кристаллизации, что ведет к дестабилизации осмотического равновесия, на что клетка отвечает осмотической реакцией, т.е. отдачей воды во внешнюю среду для выравнивания осмоса. Однако с потерей воды повышается концентрация солей в клетке и поэтому, с какой скоростью клетка отдает или поглощает воду во многом и зависит сохранность клеточных структур и в целом самой клетки [7]. Интенсивность отдачи воды клеткой зависит от скорости ее охлаждения. При слишком медленном охлаждении клетка теряет воду слишком быстро, а образующиеся во внешней среде кристаллы, а также высокая концентрация солей внутри клетки (из-за обезвоживания) могут служить причиной повреждения внутриклеточных структур и гибели эмбриона. При слишком высокой скорости охлаждения вода наоборот не успевает уходить из клетки и кристаллы льда образуются уже внутри клетки, что также приводит к ее повреждению и гибели. Для исключения невосстановимых криоповреждений и гибели клеток необходимо все параметры их криоконсервации отрегулировать на осмотическое равновесие клетки, что достигается использованием оптимальной скорости охлаждения криопротекторов.

По характеру действия различают два типа криопротекторов: проникающие и не проникающие в клетку. Для криопротекторов первой группы характерна высокая растворимость при больших концентрациях и низкая молекулярная масса, обуславливающая их проникновение в клетку. Проникающие в клетку криопротекторы замещают в клетке воду и при замораживании не образуют кристаллов (так называемое стекловидное замерзание) и таким образом предохраняют эмбрионы от повреждений. Как правило, для замораживания 7-8 дневных эмбрионов крупного рогатого скота до недавнего времени в основном