

Система СИ принята повсеместно и полученные результаты должны выражаться в единицах этой системы. Международная федерация по клинической химии рекомендовала перейти на эти единицы еще в 1973 году.

Количество вещества, если известна его молекулярная масса, должно выражаться только в молях или кратных единицах (ммоль, мкмоль, нмоль и т.д.). Не следует одновременно с единицами СИ приводить и внесистемные единицы, так как период адаптации к системе СИ давно прошел.

Если неизвестна молекулярная масса, обычно используется массовая процентная концентрация и соответствующие кратные единицы (г%, мг%, мкг% и др.).

Если определяется смесь веществ и результат выражается в молях (например, кетоновые тела), то обязательно указание, по какой молекулярной массе ведется расчет.

Активность ферментов должна выражаться в МЕ или каталах. Если используются другие единицы, в методике необходимо приводить условия определения.

Если используются неформальные единицы, ссылка на метод обязательна (например, тимоловая проба).

Однако соблюдение этих правил в силу всего вышесказанного далеко не исчерпывает возможностей унификации. Любая аккредитованная лаборатория, занимающаяся систематическими исследованиями в области клинической биохимии, должна иметь собственный банк данных, используемый в качестве физиологической нормы.

**Литература.** 1. Холод, В.М. Справочник по ветеринарной биохимии / В.М. Холод, Г.Ф. Ермолаев – Минск: «Ураджай», 1988.-168с. 2. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. -Минск: «Беларусь», 2000.- т 1-2.-960с. 3. Физиологические показатели обмена веществ у различных видов сельскохозяйственных животных и птиц / Б.Я. Бирман, В.С. Литвяк. - Минск: БелНИИЭВ, 2000.-62 с. 4. Липперт, Г. Международная система единиц в медицине / Г. Липперт – М.: Медицина, 1980.-208с. 5. Справочник клинко – биологических показателей животных / Н.С Мотузко и др.- Горки, 2001.-64 с. 6. Биохимические показатели, соответствующие норме. Вопросы гематологии в цифрах и фактах. // Медицинские новости .-1997-№2.-с.5-16

УДК 636.2:612.646

## РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПОДДЕРЖАНИИ ПЛЮРОПОТЕНТНЫХ СВОЙСТВ РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Шейко И.П., Ганджа А.И., Симоненко В.П., Леткевич П.Л., Ракович Е.Д.\*, Мотузко Н.С.\*\*

\*РУП «Институт животноводства НАН Беларуси», г. Жодино,

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

*В результате лабораторных исследований установлено, что в качестве биологически активных веществ к базовой синтетической питательной среде ТС-199 необходимо добавлять следующие компоненты: фетальную сыворотку теленка – 15%, пирувата натрия – 0,2 мг/мл и лактата кальция – 0,6 мг/мл. Применение данной среды позволит получить до 38,2% дробящихся зародышей от общего количества ооцитов, поставленных на культивирование. При этом выход эмбрионов, пригодных для трансплантации, составит 20,5% от количества дробящихся клеток.*

*As a result of laboratory researches it is established, that as biologically active substances to base synthetic nutrient medium TC-199 it is necessary to use following components. fetalniuy whey telenka – 15 %, piruvata sodium – 0,2 mg/ml and lactata calcium – 0,6 mg/ml. Application of the given environment will allow to receive up to 38.2 % of splitted up germs from total oocitov, put on kultivirovanie. Thus the output of embryos, suitable for transplantation will make 20,5 % from quantity of splitted up cells.*

**Введение.** Важнейшим ресурсом повышения эффективности производства сельскохозяйственной продукции, в том числе продуктов животноводства, являются технологии, основанные на последних достижениях сельскохозяйственной и биологической науки. В условиях интенсификации производства продуктов животноводства создается предпосылка быстрой потери существующего генофонда за счет выбраковки высокоценных животных по разным производственным причинам. Поэтому биотехнология размножения или репродуктивная биотехнология, открывая новые возможности ускорения селекционных процессов за счет воспроизведения высокоценных генотипов животных, приобретает все большее значение в сельском хозяйстве как в нашей стране, так и за рубежом. Особое значение репродуктивная биотехнология имеет в разведении и селекции крупного рогатого скота, как одного из видов малоплодных животных. Принимая во внимание тот факт, что количество ооцитов в яичниках коров достигает нескольких сот тысяч при реализации за продуктивную жизнь 2-5, разработка принципиально новых технологий ускоренного размножения племенных животных вносит огромный вклад в быстрый генетический прогресс, наблюдаемый в последние десятилетия. Оплодотворение in vitro или экстракорпоральное оплодотворение — относительно новый метод в размножении сельскохозяйственных животных. Он существенно повышает возможности для сохранения и ускоренного размножения выдающихся животных, а также животных исчезающих видов и пород, представляющих собой большую генетическую ценность, и сочетает в себе культивирование ооцитов, полученных из яичников убитых на мясокомбинате самок, оплодотворение их вне организма и трансплантацию полученных таким образом эмбрионов реципиентам. Эмбрионы, полученные в результате созревания и оплодотворения in vitro, имеют относительно низкую стоимость, обусловленную дешевизной источника получения материала (яичники убитых животных) и минимальным использованием

дорогостоящих гормональных препаратов, позволяют совершенствовать и интенсифицировать внедрение в практику животноводства таких новейших технологий репродукции, как клонирование и генетическая инженерия [1]. Применение предлагаемой технологии в сочетании с трансплантацией позволяет в 10 раз эффективнее использовать репродуктивный потенциал животных по сравнению с методом искусственного осеменения и в ближайшем будущем будет иметь важное значение в развитии скотоводства [2]. Кроме этого, созревание и оплодотворение ооцитов коров вне организма представляет собой хорошую модель для изучения оогенеза, ранних стадий эмбриогенеза и процессов оплодотворения.

Культивирование и оплодотворение ооцитов коров *in vitro* означает, что последовательность очень сложных физиологических процессов, протекающих *in vivo* в динамически изменяющейся среде, должна проходить *in vitro* в относительно простых и статических условиях. В искусственных условиях этот процесс протекает по следующей схеме: получение и кратковременное хранение яичников самок после их убоя на мясокомбинате, извлечение ооцитов, их культивирование, капацитация или подготовка к оплодотворению сперматозоидов, оплодотворение ооцитов, культивирование эмбрионов [3, 4, 5].

Культивирование эмбрионов, полученных вне организма, проходит в искусственных питательных средах. Однако многочисленные эксперименты показали, что при этом происходит остановка их дробления на 8-16-клеточной стадии или при переходе от морулы к бластоцисте. Преодоление блока дробления возможно двумя путями: либо путем пересадки эмбрионов в яйцевод промежуточного реципиента, либо добавлением к культуральным средам биологически активных компонентов [6, 7]. Так как второй путь представляется наиболее простым и дешевым при получении преимплантационных эмбрионов, нами была изучена эффективность их культивирования и поддержания плюрипотентных свойств в различных питательных средах и разработан метод получения ранних зародышей *in vitro* для генно-инженерных работ в животноводстве.

**Материал и методы исследований.** Исследования проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных Республиканского унитарного предприятия «Институт животноводства НАН Беларуси».

Яичники коров доставляли с Минского мясокомбината в лабораторию генетики с.-х. животных в солевом растворе Хенкса. С целью изучения влияния продолжительности хранения яичников на выход качественных эмбрионов выделение ооцитов проводили через 3, 3-6, 6-9, 9-12 часов после овариоэктомии. Отобранные для исследований яичники трижды отмывали в среде для извлечения ооцитов с антибиотиками. Выделение ооцитов проводили путем расщепления стенок фолликулов в среде Хенкса с добавлением 1% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 ед/мл гентамицина и 1 ед/мл гепарина. Дозревание ооцит-кумулясных комплексов проходило в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере при максимальной влажности и температуре 38°C в среде TC-199 (Sigma) с добавлением 25мМ/л буфера Hepes, 10 ед/мл гентамицина и биологически активных веществ (20% фетальной сыворотки теленка, 10мг/мл бычьего сывороточного альбумина или 5% эстральной сыворотки коров с 10мг/мл бычьего сывороточного альбумина). Капацитацию спермы проводили по методу swim up процедуры (методом всплытия) в различных питательных средах с добавлением гепарина. Оплодотворение яйцеклеток осуществляли в каплях среды для оплодотворения под слоем минерального масла. Длительность совместного культивирования яйцеклеток и сперматозоидов составила от 3 до 24 часов, после чего зиготы помещались для дальнейшего развития в среду TC-199 с различными биологически активными веществами. В качестве биологически активных компонентов, добавляемых в исходную среду, использовали бычий сывороточный альбумин (BSA) в дозе 10, 20 и 30 мг/мл, 5, 10 или 15% фетальной сыворотки теленка (ФСТ), лактат кальция (0,6 мг/мл) и пируват натрия (0,2 мг/мл). Дальнейшая инкубация дробящихся зародышей проходила в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в чашках Петри под минеральным маслом при 38°C, 5% CO<sub>2</sub> и повышенной влажности. Все эксперименты, связанные с извлечением ооцитов, их оценкой и культивированием, оплодотворением и инкубацией зародышей проводились в условиях строгой стерильности под микроскопом МБС – 10 при увеличении в 60 крат.

Низкая эффективность получения эмбрионов вне организма (10-12% живого потомства) обусловлена прежде всего неполноценным их развитием вследствие недостаточной сбалансированности питательных сред по энергетическим компонентам, концентрации водородных ионов (рН 7,2-7,4) и осмолярности (280-285 мОсм/кг). Несоблюдение одного из этих параметров приводит к нарушению развития зародышей и их гибели. Кроме того, без создания оптимальных условий культивирования ранних зародышей их развитие блокируется на стадии 8-16 клеток, после чего наступает их дегенерация. Одним из факторов, вызывающих остановку в развитии при культивировании эмбрионов вне организма может быть неадекватность условий *in vitro* условиям *in vivo*, что приводит к нарушению активности ряда ферментов, структуры и функций митохондрий, проницаемости плазматических мембран.

С целью совершенствования питательной среды для развития эмбрионов, полученных *in vitro*, мы добавляли бычий сывороточный альбумин в различных концентрациях (табл. 1), так как исследования ряда зарубежных авторов показали его положительное влияние как на первые деления дробления эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*, так и на дальнейшее их развитие до стадии бластоцисты.

В качестве контроля служили клетки, культивируемые в среде TC-199, включающей в себя аминокислоты, витамины, неорганические соли и другие компоненты (среда №1). Для увеличения питательной ценности к ней добавляли бычий сывороточный альбумин в концентрациях 10 мг/мл (среда №2), 20 мг/мл (среда №3) и 30 мг/мл (среда №4).

Как показали исследования, добавление в среду бычьего сывороточного альбумина приводило к увеличению выхода дробящихся зародышей на 8,6-10,2 % по сравнению с контрольной группой. Причем наиболее высокий выход дробящихся зародышей был получен при добавлении в среду 10 мг/мл БСА – 43 из 110, поставленных на культивирование, или 39,0%, а уровень трансформации морул в бластоцисты составил 14,3%.

При добавлении в среду 20 мг/мл БСА эти показатели составили 38,3 и 15,0 % соответственно, что значительно превысило показатели в контроле (на 9,5 и 5,9% соответственно). Увеличение концентрации альбумина до 30 мг/мл снижало выход дробящихся клеток на 0,9-1,6%, а уровень трансформации морул в бластоцисты – на 1,8-2,5%, по сравнению со второй и третьей группами.

**Таблица 1 — Влияние бычьего сывороточного альбумина на эффективность культивирования эмбрионов крупного рогатого скота**

Состав среды	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления		Выход Мо		Выход ВІ		Всего Мо-ВІ		Уровень трансформации морул в бластоцисты	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	80	23	28,8	10	12,5	1	1,2	11	13,7	1	9,1
2	110	43	39,0	19	17,3	3	2,7	21	19,1	3	14,3
3	120	46	38,3	17	14,2	3	2,5	20	16,6	3	15,0
4	115	43	37,4	14	12,2	2	1,7	16	13,9	2	12,5

Таким образом, добавление в среду бычьего сывороточного альбумина в концентрации 10 мг/мл способствует повышению выхода эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro*, на преимплантационных стадиях до 19,1%.

В наших дальнейших исследованиях мы изучили влияние фетальной сыворотки телят (ФСТ) при добавлении её в различных концентрациях в питательную среду на эффективность развития эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*, так как исследованиями ряда зарубежных авторов установлено ее положительное влияние как на первые деления дробления зародышей, так и последующее их развитие. Кроме того, фетальная сыворотка телят содержит необходимые биологически активные вещества для роста и полноценного развития клеток (табл. 2).

В качестве питательной среды использовали среду TC-199, модифицированную буфером HEPES, и фетальную сыворотку телят в концентрациях 5, 15 и 20% по отношению к общему объему культуральной среды. Контролем служила среда TC-199 без добавления ФСТ.

В результате исследований установлено, что добавление ФСТ к среде для созревания способствовало увеличению выхода дробящихся зародышей на 19,7-20,7% по сравнению с контролем. Причем наиболее высокий выход дробящихся зародышей был получен при добавлении в среду 15% ФСТ – 44 из 125, поставленных на культивирование, или 35,2%, а уровень трансформации морул в бластоцисты составил 15,0%. При добавлении в среду 5 или 20% ФСТ эти показатели составили 34,8-34,2% и 13,3-8,3% соответственно, в то время как в контроле зародыши до стадии бластоцисты не развивались.

**Таблица 2 — Эффективность использования фетальной сыворотки телят при культивировании эмбрионов вне организма**

Среда	Содержание фетальной сыворотки, %	Уровень дробления		Выход Мо		Выход ВІ		Всего Мо-ВІ		Уровень трансформации морул в бластоцисты	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
TC-199 + 25mM HEPES	–	16	14,5	4	3,6	–	–	–	–	–	–
	5	40	34,8	13	11,3	2	1,7	15	13,0	2	13,3
	15	44	35,2	17	13,6	3	2,4	20	16,0	3	15,0
	20	41	34,2	11	9,2	1	0,8	12	10,0	1	8,3

Таким образом, добавление в среду 15% по отношению к общему объему фетальной сыворотки телят способствует повышению выхода эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro*, на преимплантационных стадиях до 16,0%. Увеличение концентрации сыворотки приводило к снижению выхода морул-бластоцист.

Известно, что обмен веществ эмбрионов на разных стадиях развития имеет свои особенности. Так, на ранних стадиях дробления, по исследованиям многочисленных авторов, в качестве энергетического субстрата необходимо использовать пируват натрия и лактат кальция [8], которые поддерживают развитие эмбрионов *in vitro* до 8-клеточной стадии, а пируват необходим для развития их до стадии морулы. Другие авторы отмечают, что экзогенный пируват натрия не является необходимым компонентом для развития эмбрионов коров в присутствии лактата кальция – добавление пирувата натрия в концентрации выше 1,0 мМ снижало процент развития эмбрионов до стадии бластоцисты, в то время как к повышению концентрации лактата кальция эмбрионы менее чувствительны [9].

В нашей работе мы исследовали влияние пирувата натрия и лактата кальция на эффективность развития эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*.

В состав среды входила питательная среда TC-199, модифицированная буфером HEPES, фетальная сыворотка телят (ФСТ) в концентрации 15%, лактат кальция (0,6 мг/мл) и пируват натрия (0,2 мг/мл). В качестве контроля служила среда TC-199M с добавлением ФСТ (табл. 3).

Добавление к среде для созревания пирувата натрия и лактата кальция, как в отдельности, так и в комплексе увеличивало выход дробящихся зародышей на 1,8-3,8%, по сравнению с контролем. В то же время при добавлении пирувата натрия в среду выход преимплантационных эмбрионов увеличивался на 1,1%, а лактата кальция — на 0,7% по сравнению с контрольной группой. Наиболее высокий выход эмбрионов, пригодных к пересадке, был получен при добавлении в среду пирувата натрия и лактата кальция в комплексе и составил 20,5% (9 из 44). Наши исследования показали, что добавление в среду для культивирования ранних зародышей

крупного рогатого скота, полученных *in vitro*, пирувата натрия и на лактата кальция способствовало увеличению выхода преимплантационных зародышей на 5,4% по сравнению с контрольной группой, а уровень трансформации морул в бластоцисты составил 44,4%, что на 24,4% выше по сравнению с контрольной группой и 2,5-11,1% по сравнению с другими.

**Таблица 3 — Развитие эмбрионов крупного рогатого скота в различных питательных средах**

Состав среды для культивирования эмбрионов/кол-во оплодотворенных ооцитов, n	Уровень дробления		Выход Мо		Выход ВІ		Всего Мо-ВІ		Уровень трансформации морул в бластоцисты, %
	n	%	n	%	n	%	n	%	
ТС-199 + ФСТ / 96	33	34,4	4	12,1	1	3,0	5	15,1	20,0
ТС-199+ФСТ+ptNa / 155	56	36,2	6	10,7	3	5,4	9	16,2	33,3
ТС-199+ФСТ+lt Ca / 120	44	36,7	4	9,1	3	6,8	7	15,8	42,9
ТС-199+ФСТ+pt Na+ lt Ca/115	44	38,2	5	11,3	4	9,1	9	20,5	44,4

Таким образом, в результате лабораторных исследований установлено, что в качестве биологически активных веществ к базовой синтетической питательной среде ТС-199 необходимо использовать следующие компоненты: фетальную сыворотку телят – 15%, пирувата натрия – 0,2 мг/мл и лактата кальция – 0,6 мг/мл. Применение данной среды позволит получать до 38,2% дробящихся зародышей от общего количества ооцитов, поставленных на культивирование. При этом выход эмбрионов, пригодных для трансплантации, составит 20,5% от количества дробящихся клеток.

**Выводы.** 1. Добавление в среду ТС-199 бычьего сывороточного альбумина в концентрации 10 мг/мл способствует повышению выхода эмбрионов крупного рогатого скота на преимплантационных стадиях, полученных *in vitro*, до 19,1%, а фетальной сыворотки телят в количестве 15% к объему питательной среды – до 16,0%.

2. Использование при культивировании ранних зародышей крупного рогатого скота, полученных *in vitro*, пирувата натрия и лактата кальция способствует увеличению выхода преимплантационных зародышей на 5,4%, при этом уровень трансформации морул в бластоцисты составляет 44,4%.

**Литература.** 1. Кузьмина, Т.И. Возможность созревания и оплодотворения ооцитов *in vitro* / Т.И. Кузьмина // Зоотехния. – 2000. – № 11. – С. 28-31. 2. Ахмолдаева, А.М. Созревание и оплодотворение ооцитов *in vitro* крупного рогатого скота при действии биологически активных веществ / А.М. Ахмолдаева, Н.И. Сергеев, И.А. Порфирьев // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – №6 – С. 58-65. 3. Грин, Н. Оплодотворение: Биология / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. – Изд-во: Мир, 1993. – С. 146-147. 4. Bedford, J. M. Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa / J. M. Bedford // Journal Agricultural Reproduction. – 1968. – Vol. 18. – P. 125. 5. Shellauder, K. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes nated in medium supplemented with estrous coco serum / K. Shellauder, F. Fuhrer, B. Brachutt // Theriogenology. – 1990. – Vol. 33. – №1. – P. 477-485. 6. Eyestone, W.N. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct / W.N. Eyestone, M.L. Leibfried-Rutledge, D.L. Northey, B. G. Gilligan, N.L. First // Theriogenology. – 1987. – Vol. 28. – P. 1-7. 7. Кауффельд, П. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота / П. Кауффельд [и др.]. – М: Агропромиздат. – 1990. – 56 с. 8. Kim, J.H. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium / J.H. Kim, H. Funahashi, K. Niwa, K. Okuda // Theriogenology. – 1993. – 39,4. – P. 875-886. 9. Rosenkrans, C.F. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates / C.F. Rosenkrans, C.Q. Zeng, G.T. Mcnamara, P.K. Schoff, N.L. First // Biol. Reprod. – 1993. – Vol. 49. – P. 459-462.