

УДК 636.2.034:612.02

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛИРУЕМЫХ СИСТЕМ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

И. В. Кириллова, А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич, В. П. Симоненко, О. В. Буракова

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству»

г. Жодино, Минская область, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 222160, Минская область, г. Жодино, ул. Фрунзе, 11а; e-mail: belniig.by)

***Ключевые слова:** ооциты, фолликулы, соматические клетки, кумулюс, гранулеза, яйцевод, матка, эмбрионы.*

***Аннотация.** Использование моделируемых систем получения преимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота вне организма позволяет повысить эффективность использования ооцитов, полученных от выбракованных высокопродуктивных племенных коров, и увеличить выход морул-бластоцист на 17,2% по сравнению с контролем за счет использования монослойных культур соматических клеток репродуктивных органов (эпителиальных клеток яйцевода и эндометрия матки), обеспечивающих насыщение питательной среды для культивирования зародышей биологически активными веществами, синтезируемыми соматическими клетками.*

METHOD FOR OBTAINING CATTLE EMBRYOS BY SIMULATED SYSTEMS OF IN VITRO FERTILIZATION

I. V. Kirillova, A. I. Gandzha, L. L. Letkevich, V. P. Simonenko, O. V. Burakova

RUE «Scientific and practical center of the National academy of sciences of Belarus for Animal husbandry»

Zhodino, Minsk region, the Republic of Belarus

(Belarus, 222160, Zhodino, Minsk region, 11a Frunze str.

e-mail: belniig.by)

***Key words:** oocytes, follicles, somatic cells, cumulus, granulosis, oviduct, uterus, embryos.*

***Summary.** Use of simulated systems of obtaining preimplantation cattle embryos in vitro allows to increase efficiency of oocytes obtained from culled breeding highly productive cows, and increase the yield of morula-blastocysts by 17.2% compared to the control by using monolayer cultures of somatic cells of reproductive organs (epithelial oviduct and uterus endometria cells), providing saturation of the*

medium for embryos cultivation by biologically active substances synthesized by somatic cells.

(Поступила в редакцию 01.06.2016 г.)

Введение. К вспомогательным репродуктивным технологиям относятся: экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и перенос эмбрионов (ПЭ) в полость матки, инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ), криоконсервация спермы, ооцитов, эмбрионов, ткани яичника, предимплантационная диагностика и др. [1].

Технология получения ранних эмбрионов коров вне организма основана на выделении ооцитов из яичников убитых на мясокомбинате коров, их дозревании до стадии метафаза II, оплодотворении заморожено-оттаянной спермой быка, прошедшей процедуру капацитации, и культивировании оплодотворенных ооцитов до получения преимплантационных эмбрионов в течение 10 дней в питательной среде под слоем минерального масла в CO₂-инкубаторе при температуре 38,0⁰C, максимальной влажности 98% и содержании 5% CO₂ в воздухе. В настоящее время существует множество способов повышения выхода преимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*, основанных на введении в питательную среду для созревания, капацитации или оплодотворения эмбрионов синтетических биологически активных компонентов. Исследователи, занимающиеся разработкой оптимальных питательных сред для культивирования ранних зародышей, установили, что сыворотка крови является основным энергетическим субстратом, необходимым для завершения ядерного созревания ооцитов крупного рогатого скота вне организма, а также необходима для улучшения развития ранних эмбрионов вне организма. При использовании эстральной сыворотки уровень дробления увеличивается в зависимости от ее концентрации на 1,2-14,9%, а уровень бластоцист может достигать 21,6% [2, 3]. Однако А. Sanbuissho [4] доказал, что созревание ооцитов может происходить и в отсутствие сыворотки.

В то же время такие результаты не дают стабильного выхода ранних эмбрионов, что снижает эффективность селекционной работы проводимой для сохранения генофонда высокопродуктивных племенных животных.

Цель работы: разработать способ получения эмбрионов крупного рогатого скота с помощью моделируемых систем экстракорпорального оплодотворения как источника естественных биологически активных веществ с целью повышения выхода преимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*.

Материал и методика исследований. Исследования выполнены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству». Яичники, яйцеводы и рога матки убитых на мясокомбинате коров доставляли в лабораторию в среде Хенкса с добавлением антибиотиков (50 мг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина или 50 мг/мл гентамицина) при температуре 28-36°C. Ооцит-кумуляные комплексы выделяли методом рассечения ткани яичника лезвием безопасной бритвы в чашке Петри в солевом растворе Хенкса с добавлением 1% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 ед./мл гентамицина и 1 ед./мл гепарина. Поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумуляных комплексов проводили по 5-балльной шкале с использованием микроскопа МБС-10 при 16-56-кратном увеличении.

Для синхронизации искусственных условий получения эмбрионов с естественными использовали соматические клетки репродуктивного тракта, полученные также в момент убоя животных с последующей их обработкой стерильными растворами в лабораторных условиях.

Получение соматических клеток репродуктивного тракта (эпителиальных клеток яйцевода и эндометрия матки) проводили по разработанному в нашей лаборатории методикам [5, 6].

Созревшие на монослойных культурах ооциты оплодотворяли заморожено-оттаянной спермой быка после проведения процедуры капацитации. Пересадку эмбрионов осуществляли нехирургическим методом на 7-8 день естественного или синхронизированного полового цикла реципиентам.

Результаты исследований и их обсуждение. При разработке способов получения соматических клеток репродуктивных органов мы устанавливали оптимальное количество клеток, необходимое для получения монослоя с дальнейшим его использованием в технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*, т. к. они являются продуцентами стероидных гормонов (таблица 1).

Исследования показали, что при культивировании эмбрионов на монослое клеток яйцевода наивысший уровень дробления 61,1% достигается при первоначальной концентрации клеток $0,9 \times 10^6$ кл/мл, выход преимплантационных эмбрионов при этом составил 38,9%. Оптимальная концентрация клеток эндометрия матки для получения монослоя составила $2,2-4,0 \times 10^5$ кл/мл, при этом уровень дробления колебался от 52,1% до 62,8%, выход преимплантационных эмбрионов был на уровне 18,6-31,3%. Как увеличение концентрации клеток, так и уменьшение приводило к снижению уровня дробления, при этом выход преимплантационных эмбрионов также снижался.

Таблица 1 – Уровень дробления ооцитов в зависимости от первоначальной концентрации соматических клеток

Концентрация клеток, кл/мл	Количество ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
Эпителиальные клетки яйцевода			
$1,7 \times 10^5$	17	4-23,5	2-11,8
$2,7 \times 10^5$	12	1-8,3	-
5×10^5	36	7-19,4	3-8,3
$0,9 \times 10^6$	18	11-61,1	7-38,9
$1,1 \times 10^6$	21	9-42,8	6-28,6
Клетки эндометрия матки			
$1,1 \times 10^5$	50	11-22,0	6-12,0
$2,2 \times 10^5$	48	25-52,1	15-31,3
$3,1 \times 10^5$	52	22-42,3	5-9,6
$4,0 \times 10^5$	43	27-62,8	8-18,6
$6,7 \times 10^5$	27	14-51,8	1-3,7
$1,2 \times 10^6$	52	16-30,8	5-9,6

Немаловажным фактором является время, в течение которого формируется монослой соматических клеток. Исследования показали, что эпителиальные клетки яйцевода формируют в культуре монослой независимо от способа их выделения (механический или химический). Однако наиболее активно монослой образовывали клетки, полученные методом трипсинизации с последующим отбором активно передвигающихся пузырьков. Монослой (100%) такие клетки образовывали через 6-7 дней. В случае, когда культивировалась вся полученная масса клеток 100%, монослой формировался к 10-14 дню культивирования.

При анализе роста монослойной культуры клеток эндометрия матки установлено, что она имеет более низкий пролиферативный потенциал. Для культивирования эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro*, использовали созревший в течение 24-30 дней монослой клеток эндометрия матки.

При созревании *in vivo* структурные элементы фолликулов обеспечивают многообразие биохимических и морфологических изменений, результатом которых является нормальное развитие и рост яйцеклеток, их дальнейшее оплодотворение и развитие. Моделирование условий созревания ооцитов коров на основе использования монослойных культур соматических клеток фолликула подразумевает, прежде всего, разработку оптимального состава сред, обеспечивающих полноценное созревание ооцитов и их развитие в эмбрионы после

оплодотворения [7, 8, 9]. В связи с этим, для приближения созданных искусственно условий культивирования к естественным условиям созревания, оплодотворения яйцеклеток и развития ранних зародышей крупного рогатого скота мы использовали комплексное сокультивирование ооцитов и соматических клеток репродуктивных органов коров в качестве источника биологически активных веществ, синтезируемых данными клетками.

Для оценки моделируемых систем при получении преимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота вне организма была проведена серия опытов (таблица 2). Контролем служили ооциты и ранние зародыши без сокультивирования с монослойными культурами соматических клеток репродуктивного тракта крупного рогатого скота. В I опыте, ооциты созревали до стадии метафаза II в течение 24 ч на предварительно подготовленной в течение 7 дней монослойной культуре эпителиальных клеток яйцевода, полученных методом трипсинизации с отбором активно передвигающихся пузырьков при первоначальной концентрации $0,9 \times 10^6$ клеток на миллилитр среды, затем их оплодотворяли в течение 18 ч заморожено-оттаянной спермой быков-производителей, прошедшей процедуру капацитации, после чего оплодотворенные зародыши помещались в чистую среду ТСМ-199 без сокультивирования. Во II опыте ооциты напротив созревали в среде без сокультивирования с соматическими клетками, а оплодотворенные зародыши помещались на подготовленный монослой эпителиальных клеток яйцевода. В III опыте созревание и культивирование зародышей проводили в одной и той же чашке, при сокультивировании с клетками яйцевода. В IV опыте для созревания ооцитов мы использовали предварительно выращенную монослойную культуру клеток эндометрия матки, полученную через 24-30 дней после постановки на культивирование $2,2-4,0 \times 10^6$ клеток эндометрия на миллилитр среды, после чего оплодотворенные зародыши помещались в чистую среду ТСМ-199, не содержащую монослойных культур. В V опыте ооциты созревали до стадии метафаза II в среде без сокультивирования с соматическими клетками, а оплодотворенные зародыши помещались на подготовленный монослой клеток эндометрия матки. В VI опыте созревание и культивирование зародышей проводили в одной и той же чашке, при сокультивировании с клетками эндометрия матки. В VII опыте ооциты до стадии метафаза II созревали на монослойной культуре эпителиальных клеток яйцевода, а после оплодотворения клетки помещались на монослой клеток эндометрия матки.

Таблица 2 – Комплексное сокультивирование ооцитов и соматических клеток репродуктивных органов коров

Опыт	Варианты сокультивирования		Кол-во ооцитов, п	Уровень дробления, п- %	Выход морул-бластоцист, п- %	Эффективность способа, %
	созревание ооцитов	культуры выращивания эмбрионов				
Контроль	–	–	51	20-39,2	4-7,8	–
I	яйцевод	–	64	24-37,5	–	–
II	–	яйцевод	25	7-28,0	2-8,0	–
III	яйцевод	яйцевод	80	42-52,5	10-12,5	4,7
IV	матка	–	10	5-50,0	2-20,0	12,2
V	–	матка	12	4-33,3	2-16,7	8,9
VI	матка	матка	30	16-53,3	–	–
VII	яйцевод	матка	28	17-60,7	7-25,0	17,2

Установлено, что созревание ооцитов на заранее подготовленном монослое эпителиальных клеток яйцевода, с дальнейшим культивированием на монослое клеток эндометрия матки, после оплодотворения их заморожено-оттаянной спермой быков-производителей позволяет повысить эффективность использования ооцитов, полученных от выбракованных высокопродуктивных племенных коров, и увеличить выход морул-бластоцист на 17,2% по сравнению с контролем, т. к. обеспечивается насыщение питательной среды для культивирования зародышей биологически активными веществами, синтезируемыми соматическими клетками, что согласуется с физиологическими условиями, происходящими в репродуктивном тракте коров.

Заключение. Таким образом, разработан способ получения ранних эмбрионов крупного рогатого скота вне организма, включающий выделение ооцитов из яичников выбракованных коров, их дозревание до стадии метафаза II в культуральной среде на предварительно полученном в течение 7 сут монослое эпителиальных клеток яйцевода при первоначальной концентрации $0,9 \times 10^6$ клеток на миллилитр среды, оплодотворение заморожено-оттаянной спермой быка, прошедшей процедуру капацитации, и культивирование оплодотворенных ооцитов на монослое клеток эндометрия матки, полученном через 24-30 дней после посева $2,2-4,0 \times 10^6$ клеток на миллилитр среды до получения преимплантационных эмбрионов в течение 10 дней в питательной среде под слоем минерального масла в CO_2 -инкубаторе при температуре $38,0^\circ\text{C}$, максимальной влажности 98% и содержании 5% CO_2 в воздухе. Выход морул-бластоцист увеличивается на 17,2% по сравнению с контролем за счет использования монослойных культур соматических клеток репродуктивных органов (эпителиальных клеток яйцевода и эндо-

метрия матки), обеспечивающих насыщение питательной среды для культивирования зародышей биологически активными веществами, синтезируемыми соматическими клетками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев, Ю. И. Гистология, эмбриология, цитология / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский - 6-е изд., изм. и доп. - 2012. - 800 с.
2. Голубец, Л. В. Эффективность использования эстральной сыворотки в культуральных системах *in vitro* / Л. В. Голубец, М. П. Старовойтова, А. Е. Отрошенко // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по животноводству; редкол.: И.П. Шейко (гл. ред.) [и др.]. - Жодино, 2009. - Т. 44, ч.1. - С. 37.
3. Sutton, M.L. Effects of *in vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity/ M.L. Sutton, R.B. Gilchrist, G. Thompson // *Human Reprod. Update.* - 2003. - Vol. 9, № 1. - P. 35-48.
4. Sanbuissho, A. The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation *in vitro* / A. Sanbuissho, W.R. Threfall // *Theriogenology.* - 1988. - Vol. 29, №1. - P. 301.
5. Костикова, И. В. Способ получения ранних эмбрионов крупного рогатого скота вне организма с использованием монослоя эпителиальных клеток яйцевода / И. В. Кириллова (Костикова) // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по животноводству; редкол.: И.П. Шейко (гл. ред.) [и др.]. - Жодино, 2008. - Т. 43, ч.1. - С. 69-75.
6. Кириллова, И. В. Способ получения ранних эмбрионов крупного рогатого скота вне организма на основе использования монослоя эндометрия матки / И. В. Кириллова // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по животноводству; редкол.: И. П. Шейко (гл. ред.) [и др.]. - Жодино, 2011. - Т. 46, ч.1. - С. 90-97.
7. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine / S.A. Hugentobler [et al] // *Mol. Reprod. Dev.* - 2007. - Vol. 74, №4. - P. 445-454.
8. Relationship between growth hormone concentrations in bovine oocytes and follicular fluid and oocyte developmental competence / S. Modina [et al] // *Eur. J. Histochem.* - 2007. - Vol. 51, №3. - P. 173-180.
9. Way A.L. "Isolation and culture of bovine oviductal epithelial cells for use in the anatomy and physiology laboratory and undergraduate research. // *Adv. Physiol. Educ.* - 2006. - Vol. 30, №4. - P. 237-241.