

УДК 636.2.612.64.089.67

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЗРЕВАНИЯ И ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Голубец Л.В., Дешко А.С., Старовойтова М.П., Степкевич Е.К.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

Среди хорошо известных факторов, влияющих на созревание, оплодотворение и развитие ранних зародышей *in vitro* в первую очередь, после средовых, называется плотность, или количество ооцитов на единицу объема.

Как установлено многими исследованиями, значительно более высокие результаты получаются в том случае, когда ооциткумулюсные комплексы культивируются в группах и объясняется это тем, что в процессе группового созревания в экстрацеллюлярной среде аккумулируются ростообразующие факторы, выделяемые ооциткумулюсными комплексами и способствующие созреванию и развитию клеток.

Целью наших исследований являлось изучение влияния соотношения ооцит – объем, ооцит – площадь культивирования на эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro*.

Исследования проводились в биотехнологическом центре по репродукции сельскохозяйственных животных УО «ГГАУ».

Выделение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичников стерильным лезвием безопасной бритвы в чашке Петри (Ø90) в солевом буфере с добавлением 1% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 ед/мл гентамицина и 1 ед/мл гепарина. Затем проводили их поиск и морфологическую оценку качества под бинокулярным микроскопом «Olympus» при 16-90 кратном увеличении и помещали в CO₂-инкубатор «Memmert» в питательной среде для дозревания клеток при температуре 37,8°C с максимальной влажностью 98%. После 24-часового дозревания ооциты ставили на совместное инкубирование со сперматозоидами.

Оплодотворение проводили заморожено-оттаянной спермой.

Совместная инкубация спермы и ооцитов продолжалась в течении 18-20 часов при температуре 38,7°C в атмосфере 5% CO₂ и максимальной влажности. После совместного инкубирования ооциты отмывали от сперматозоидов и в среде для созревания на монослое кумулюсных клеток снова помещали в CO₂-инкубатор на 7-9 дней (до получения пригодных для трансплантации эмбрионов). Питательные среды для

созревания, капацитации и оплодотворения были приготовлены по нашим методикам на основе реактивов фирмы «Sigma».

Культивирование ооцитов проводилось в культуральной чашке площадью $3,14 \text{ см}^2$ в объеме среды 100, 200, 300 и 400 мкл, а также в чашке Петри диаметром 40 мм и площадью культуральной поверхности $12,6 \text{ см}^2$ в объеме среды 1,5; 2,5; 3,0 и 3,5 мл.

В результате проведенных исследований установлено, что лучшие результаты были получены при соотношении ооцит – объем 1:15-1:35 (при площади культуральной поверхности $12,6 \text{ см}^2$) и 1:4 -1:12 (при площади культуральной поверхности $3,14 \text{ см}^2$). При этом выход blastocyst колебался на уровне 10-15%, а уровень дробления составлял 43,0-53,0% и 40-56%, соответственно. В среднем данный показатель составлял 12 и 12,4% и 48,5-48,4%. При всех других соотношениях уровень дробления снижался на 9,5-12,8%, а выход blastocyst – на 8,5-9,9%.