

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЗРЕВАНИЯ И ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ КОЛИЧЕСТВА НА ЕДИНИЦУ ОБЪЕМА

Л.В. Голубец, И.С. Кысса, А.С. Дешко, М.П. Старовойтова,
Е.К. Стецкевич, Ю.А. Якубец, А.В. Малец

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 10.06.2011 г.)

Аннотация. Исследования, представленные в данной статье, посвящены изучению эффективности созревания и оплодотворения ооцитов крупного рогатого скота в культуре *in vitro* в зависимости от их количества на единицу объема среды. Как показали результаты опытов, оптимальным соотношением ооцит/объем среды для чашек с площадью культуральной поверхности 3,14 см² является соотношение 1/4 - 1/12, а с площадью культуральной поверхности 12,6 см² - 1/10 - 1/35. Уровень оплодотворения при этом составлял 40-56%, а выход бластоцист - 10-15%.

Summary. The researches presented in given article, are devoted studying of efficiency of maturing and fertilization oocytes large horned livestock in culture *in vitro* depending on their amount on volume unit. As have shown results of experiences, an optimum ratio the oocyte/volume of environment for cups with the area culture surfaces of 3,14 cm² is a ratio 1/4-1/12, and with the area culture surfaces of 12,6 cm² - 1/10 - 1/35. Fertilization level thus made 40-56%, and exit blastocysts - 10-15%.

Введение. 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, более высокие результаты получаются в том случае, когда ооцит-кумулосные комплексы (ОКК) культивируются в группах. Объясняется это тем, что в процессе группового созревания в экстрацеллюлярной среде аккумулируются ростообразующие факторы, выделяемые ОКК и способствующие созреванию и развитию клеток [2, 4, 5, 8].

Так, Ward F. и Enright B. сообщают, что в том случае, когда ооциты созревали и оплодотворялись по одному, выход бластоцист значительно снижался по сравнению с культивированием ооцитов в группах по 5, 10, 15 или 25 шт. [6].

Аналогичные данные получены и по результатам исследований Накао У., в которых был установлен не только более высокий выход бластоцист в том случае, когда ооциты культивировались в группах, но и отмечена более высокая внутриклеточная масса эмбрионов и их жизнеспособность. Polasz A. и Kato, H. отмечают, что если по уровню созревания и оплодотворения между различными группами ооцитов существенной разницы не отмечено, то выход бластоцист был достоверно выше при плотности ооцитов 2:1 по сравнению с группами с плотностью 0,5:1 и 1:1 [4, 5, 7].

Согласно Carolan C. et al, при создании определенных условий уровень созревания, оплодотворения и выхода бластоцист практически не уступает результатам культивирования ооцитов в группах. Важную роль при этом играет присутствие в среде эпидермального фактора роста [1].

Аналогичные результаты были получены Mizushima S. et al. при использовании безсывороточных сред и сред без альбумина. Использование таких сред (defined medium) в комплексе с поливинилпирролидоном (PVA) и бетамеркаптоенолом (B-ME) позволило получать практически одинаковые результаты по уровню созревания и оплодотворения яйцеклеток и обнадеживающие по выходу бластоцист. Объясняется это, по мнению авторов, тем, что присутствие в среде B-ME увеличивает в ооцитах внутриклеточное содержание глутатиона, что тем самым способствует увеличению уровня и качества созревания [3].

Особенно остро вопрос оптимизации питательных сред применительно к условиям культивирования ограниченного количества ооцитов встал с разработкой и широким внедрением в практику получения эмбрионов в системе *in vitro* путем трансцервикальной пункции фолликулов с использованием ультразвукового зонда, когда получают единичные клетки или их ограниченное количество.

Таким образом, несмотря на достаточно высокие не только научные, но и коммерческие результаты, достигнутые в области технологии *in vitro*, эта область исследований по-прежнему остается наиболее привлекательной с точки зрения повышения эффективности использования генетического потенциала высокоценных особей крупного рогатого скота.

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

Материал и методика исследований. Яичники получали на конвейере мясокомбината после убоя животного путем их отсекаания от матки с помощью ножниц. После этого они помещались в бытовой

термос со средой Хенкса, Дюльбекко. ТС-199 или физраствором при температуре 32-36 °С. После доставки в лабораторию яйцники 2-3 раза промывали солевым раствором (физраствор, Дюльбекко, Хенкса) и помещали в раствор или среду, аналогично той, в которой промывали. Выделение ооцитов проводили путем рассечения ткани яйчников стерильным лезвием безопасной бритвы в чашке Петри (Ø90) в одном из перечисленных солевых буферов 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 «Оlympus» при 16-90 кратном увеличении и помещали в CO₂ - инкубатор «Mémmert» в питательной среде для дозревания клеток при температуре 37,8 °С с максимальной влажностью 98%. После 24-часового дозревания ооциты ставили на совместное инкубирование со сперматозоидами.

Оплодотворение проводили замороженно-оттаянной спермой. Подготовку к оплодотворению осуществляли по следующей методике. Дозу спермы в среде для капацитации ставили в термостат на 1 час для процесса «флотации». Суть этого метода заключается во всплытии фракции наиболее активных сперматозоидов в верхние слои. Надосадочную фракцию три раза отмывали в среде для капацитации путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Затем в среду добавляли гепарин в концентрации 50 ед/мл и снова центрифугировали в том же режиме. После этого сперму дважды отмывали в среде для оплодотворения и в количестве 1×10^6 сперматозоидов в 1 мл добавляли к ооцитам, находящимся к этому времени в среде для оплодотворения.

Совместная инкубация спермы и ооцитов продолжалась в течение 18-20 часов при температуре 38,7 °С 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 см² в объеме среды 100, 200, 300 и 400 мкл, а также в чашке Петри диаметром 40 мм и площадью культуральной поверхности 12,6 см² в объеме среды 1,5; 2,5; 3,0 и 3,5 мл.

Биометрическую обработку полученного цифрового материала проводили согласно общепринятым методам вариационной статистики.

Результаты исследований и их обсуждение. По мнению ряда авторов (3, 5, 6), эффективность получения эмбрионов в системе *in vitro* во многом зависит от количества ооцитов на единицу объема культуральной среды. Обычно для культивирования используются 4-х или 5-ти луночные планшеты с площадью культуральной поверхности 3.14 см² или же чашки Петри диаметром 40 мм и площадью культуральной поверхности 12,6 см².

Влияние соотношения ооцит/объем на эффективность получения эмбрионов в системе *in vitro* при площади культуральной поверхности 3.14 см² представлено в таблице 1.

Таблица 1 - Влияние соотношения ооцит/объем на эффективность получения эмбрионов в системе *in vitro* при площади культуральной поверхности 3.14 см²

Объем среды, мкл	Кол-во ооцитов, n	Соотношение ооцит/объем	Количество дробящихся зародышей	Количество Мо+ Бл, n-%	Количество Бл, n-%
100	10	1/10	5-50,0	2-20,0	1-10,0
	25	1/4	12-48,0	5-20,0	3-12,0
	50	1/2	18-36,0	5-10,0	2-4,0
	100	1/1	15,0-15,0	7-70,0	2-2,0
200	10	1/20	5-50,0	1-10,0	---
	25	1/8	14-56,0	5-20,0	3-12,0
	50	1/4	22-44,0	9-18,0	7-14,0
	100	1/2	31-31,0	6-6,0	4-4,0
300	10	1/30	3-30	1-10	---
	25	1/12	13,0-52,0	5-20,0	3-12,0
	50	1/6	25-50,0	16,0-32,0	7-14,0
	100	1/3	35-35,0	4-4,0	2-2,0
400	10	1/40	3-30,0	1-10,0	---
	25	1/16	12-48,0	4-16,0	2-8,0
	50	1/8	20-40,0	9-18,0	5-10,0
	100	1/4	47-47,0	19-19,0	15-15,0

Данные таблицы 1 указывают, что при соотношении ооцит/объем 1/10, с объемом среды 100 мкл, уровень оплодотворения составил 50%, а выход blastocyst - 10%. При соотношении 1/4 - 48, и 12% соответственно. Наиболее низким этот показатель оказался при соотношении количества ооцитов к объему - 1/1. При этом уровень оплодотворения составил 15%, а выход blastocyst - 2%. При объеме среды 200 мкл соотношение выглядело следующим образом: 1/20, 1/8, 1/4 и 1/2. Уровень оплодотворения при этом составил 50, 56, 44 и 31%, а выход эмбрионов на предимплантационных стадиях 0, 12, 14 и 2% соответ-

венно. При соотношении 1/30 1/12 1/6 1/3 (объем среды 300 мкл) оплодотворяемость колебалась в пределах от 30% (соотношение 1/10) до 52 (соотношение 1/25) выход эмбрионов при этом составил 0, 12, 14 и 2% соответственно. При объеме 400 мкл соотношение составило 1/40, 1/16, 1/8, 1/4, уровень оплодотворения 30%, 48, 40 и 47%, выход blastocyst - 8, 10 и 15 % соответственно. Таким образом, оптимальным соотношением ооцит/объем среды для чашек с площадью культуральной поверхности 3,14 см² является соотношение 1/4 - 1/12.

Влияние соотношения ооцит/объем на эффективность получения эмбрионов в системе *in vitro* при площади культуральной поверхности 12,6 см² представлено в таблице 2.

Таблица 2 - Влияние соотношения ооцит/объем на эффективность получения эмбрионов в системе *in vitro* при площади культуральной поверхности 12,6 см²

Объем среды, мкл	Кол-во ооцигов, п	Соотношение Ооцит/объем	Количество дробящихся зародышей	Количество Мо+ Бл, п-%	Количество Бл, п-%
1500	10	1/150	3-30,0	1-10,0	-
	50	1/30	23-46,0	7-14,0	6-12,0
	100	1/15	43-43,0	18-18,0	10-10,0
	150	1/10	68-45,3	22-14,7	13-8,7
2500	10	1/250	3-30,0	12-12,0	-
	50	1/50	21-42,0	6-12,0	3-6,0
	100	1/25	50-50,0	15-15,0	15-15,0
	150	1/17	71-47,4	26-17,4	17-11,4
3000	10	1/300	2-20,0	1-10,0	-
	50	1/60	20-40,0	6-12,0	4-8,0
	100	1/30	53-53,0	22-22,0	12-12,0
	150	1/20	77-51,4	29-19,4	19-12,7
3500	10	1/350	4-40,0	2-20,0	-
	50	1/70	19-38,0	7-14,0	5-10,0
	100	1/35	48-48,0	21-21,0	14-14,0
	150	1/23	74-49,4	28-18,7	21-14,0

Как показывает анализ представленных в таблице 2 данных, при объеме среды 1500 мкл соотношение ооцит/объем составило 1/150, 1/30, 1/15, 1/10, а выход зародышей 0%, 12, 10 и 8,7%, соответственно. При объеме среды 2500 мкл соответствующие показатели составили 1/250, 1/50, 1/25, 1/17 и 0%, 6, 15 и 11,4%. При объеме среды 3000 мкл и соотношении ооцит/объем 1/300 эмбрионов не получено. При соотношении 1/60 выход blastocyst составил 8,0%. При соотношении 1/30 -12% и при соотношении 1/20 -12,%. Что касается объема 3500 мкл, то

соотношение ооцит/объем составило 1/350, 1/70, 1/35 и 1/23, а выход эмбрионов соответственно 0%, 10, 14 и 14%.

Заключение. Таким образом, более высокие результаты были получены при соотношении ооцит/объем 1:15-1:35 (при площади культуральной поверхности 12,6 см²) и 1:4-1:12 (при площади культуральной поверхности 3,14 см²). При этом выход бластоцист колебался в пределах 10-15%, а уровень оплодотворения составлял 43,0-53,0% и 40-56%, соответственно. В среднем выход эмбрионов на предимплантационной стадии составил 12 и 12,4%, а уровень оплодотворения 48,5-48,4%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carolan, C. In vitro production of bovine embryos using individual oocytes / C. Carolan et al. // *Molecular Reproduction and development*. - 1996. Vol. 45. - P. 145-150.
2. Cordon, J. Reproductive technologies in farm animals / J. Cordon. - 2004. - 347 p.
3. Mizushima, S. Fertilizability and development capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemical defined medium / S. Mizushima, Q. Purui // *Theryogenology*. - 2001. Vol. 55. - P. 1431-1455.
4. Naqao, Y. Effect of embryo density, oxygen concentration and medium composition on in vitro development of bovine early embryos / Y. Naqao et al. // *Theryogenology*. - 1998. Vol. 43. - № 1. - P. 210.
5. Palasz, A. The effect of volume of culture medium and embryo density in vitro development of bovine embryos / A. Palasz et al. // *Theryogenology*. - 1998. Vol. 49. - №1. - P. 212.
6. Ward, F. Effect of group size and oocyte to medium volume post - fertilization on the development of bovine embryos in vitro / F. Ward, B. Enright // *Theryogenology*. - 2000. Vol. 53. - P. 306.
7. Kato, H. Effects of follicular fluid and follicular walls on bovine oocyte maturation // H. Kato // *Theryogenology*. - 1998. - Vol. 49, №1. - P. 313.
8. Dewit, A. Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine Cumulus-Oocyte-complexes / A. Dewit, M.L. Cesar // *J. Dairy Sci.* - 2001. - Vol. 84. - P. 1800-1804.