

А.И. ГАНДЖА¹, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, Т.И. КУЗЬМИНА²,
В.П. СИМОНЕНКО¹, И.В. КИРИЛЛОВА¹, Е.Д. РАКОВИЧ¹,
О.П. КУРАК¹, Н.В. ЖУРИНА¹, М.А. КОВАЛЬЧУК¹

СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В СКОТОВОДСТВЕ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

¹*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

²*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и разведения животных, г. Санкт-Петербург, Россия*

Получение эмбрионов крупного рогатого скота с использованием клеточных репродуктивных технологий является одним из самых развивающихся методов сохранения генетического потенциала племенных животных. Усовершенствованная технология получения ранних зародышей вне организма для ускоренного размножения и сохранения высокоценных животных в скотоводстве Республики Беларусь позволяет получать 78,8-83,2 % созревших до стадии оплодотворения ооцитов, 20,2-22,4 % преимплантационных зародышей с приживляемостью 40,0-45 %.

Ключевые слова: клеточные репродуктивные технологии в скотоводстве, биотехнологические методы в воспроизводстве крупного рогатого скота, экстракорпоральное оплодотворение ооцитов коров, сохранение генетических ресурсов в животноводстве.

A.I. GANDZHA¹, L.L. LETKEVICH¹, T.I. KUZMINA², V.P. SIMONENKO¹,
I.V. KIRILLOVA¹, E.D. RAKOVICH¹, O.P. KURAK¹, N.V. ZHURINA¹,
M.A. KOVALCHUK¹

STATE AND PROSPECTS OF DEVELOPMENT OF CELLULAR REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES IN CATTLE BREEDING IN THE REPUBLIC OF BELARUS

¹*Research and Production Center of the National academy of sciences of Belarus
for Livestock Breeding, Zhodino, Belarus*

²*All-Union research institute for Genetics and Animal husbandry,
St. Petersburg, Russia*

Production of bovine embryos using cellular reproductive technologies is one of the most developing methods for preserving the genetic potential of breeding animals. Improved technology for in-vitro obtaining early embryos for rapid reproduction and preservation of high-value animals in cattle breeding in the Republic of Belarus makes it possible to obtain 78.8-83.2 % of oocytes matured before the oocytes fertilization stage, 20.2-22.4 % of pre-implantation embryos with acceptability of 40,0-45 %.

Key words: cellular reproductive technologies in cattle breeding, biotechnological methods in cattle reproduction, extracorporeal fertilization of bovine oocytes, preservation of genetic resources in livestock breeding.

Введение. Животноводство является одной из основных отраслей

сельского хозяйства Республики Беларусь. Развитие этой отрасли, направленное на получение конкурентоспособной импортозамещающей продукции, сегодня невозможно без использования новых биотехнологических методов, генной и клеточной инженерии. Применение биотехнологических методов ускоренного воспроизведения и сохранения генофонда пород позволяет в разы повысить выход племенного молодняка от одной коровы, сократить генерационный интервал между поколениями и значительно ускорить процесс качественного улучшения популяций крупного рогатого скота. К биотехнологическим методам, активно используемым в практике скотоводства, относятся искусственное осеменение, получение эмбрионов *in vivo* (суперовуляция), получение эмбрионов *in vitro* из ооцитов убитых на мясокомбинате коров или прижизненно извлеченных. Их использование, в отличие от общепринятых методов, позволяет получать преимплантационные эмбрионы вне организма, а после их трансплантации реципиентам – племенной молодняк с заданными технологическими параметрами. Перечисленные биотехнологические направления применяются в комплексе, дополняя друг друга, основная цель которых заключается в повышении селекционного процесса, расширении возможностей использования репродуктивного потенциала не только быков-производителей, но и материнского стада [1]. Кроме того, в связи с возрастающей необходимостью сохранения генетического разнообразия и ресурсов, созданием банков генов, заманчивым представляется разработка методов хранения конкурентоспособной племенной продукции крупного рогатого скота на стадии ооцитов и ранних эмбрионов.

Получение эмбрионов крупного рогатого скота вне организма матери является сегодня одним из самых динамично развивающихся биотехнологических методов интенсификации использования репродуктивного и генетического потенциала племенных животных. В связи с этим представляют определённый интерес наработки, полученные в этой области исследований, а также их дальнейшие перспективы.

Была поставлена **цель** – провести анализ результатов использования клеточных репродуктивных технологий в молочном скотоводстве Республики Беларусь.

Материал и методика исследований. Лаборатория молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» занимается проблемой экстракорпорального оплодотворения ооцитов крупного рогатого скота с 2000 года. Яичники получали после убоя животного путём отсекания от матки с помощью ножниц и доставляли в лабораторию в растворе Хенкса в бытовом термосе. Созревание оо-

цитов, их оплодотворение и культивирование ранних зародышей проводили в условиях CO₂-инкубатора при 38,5 °С и 5 % CO₂ по общепринятым методикам [2]. Технология включает несколько этапов: 1) подбор адекватных синтетических питательных сред, биологически активных компонентов к ним и условий культивирования; 2) отбор доноров и доставка яичников в лабораторию; 3) получение ооцит-кумулясных комплексов; 4) поиск и оценка качества ооцит-кумулясных комплексов; 5) созревание ооцитов; 6) подготовка сперматозоидов к оплодотворению ооцитов и сама процедура оплодотворения; 7) культивирование ранних зародышей и оценка их качества; 8) пересадка ранних зародышей реципиентам или их криоконсервирование. Работа на всех этапах проводится с соблюдением правил асептики и антисептики.

Для защиты эмбрионов от криповреждений использовали проникающие криопротекторы на основе многоатомных спиртов: 1,4М глицерин и 1,5М этиленгликоль (EMCARE) или приготовленный в лаборатории с использованием компонентов фирмы SIGMA 1,5М 1,2-пропандиол. Замораживали преимплантационные эмбрионы в пайеттах с помощью программного замораживателя CryoLogic CL-8800i. Оттаивание проводили путём погружения пайетты на 10 сек в водяную баню 38 °С после предварительной выдержки на воздухе 10 сек.

Состояние митохондрий оценивали с помощью потенциал-чувствительного зонда родамина 123 (Rd123). Внутриклеточное содержание АТФ определяли хемилюминесцентным методом в интервале длин волн 560-580 нм.

Результаты эксперимента и их обсуждение. За указанный период отработана и внедрена в производство усовершенствованная технология получения ранних зародышей вне организма для ускоренного размножения и сохранения высокоценных животных в скотоводстве, позволяющая получать 78,8-83,2 % созревших до стадии оплодотворения ооцитов, 20,2-22,4 % преимплантационных зародышей при уровне дробления 45,6-50,3 % и приживляемости около 40,0-45 %. В процессе исследований установлено влияние отдельных биологических (эстральной сыворотки крови коров, соматотропина, эстрофана, эпибрасинолида, кофеина, монослоев соматических клеток репродуктивного тракта самок крупного рогатого скота, факторов роста, иммортализованной линии соматических клеток фибробластов мыши) и физических (лазерного излучения и поляризованного света) факторов на выход эмбрионов в различных системах культивирования [3, 4, 5, 6], результаты представлены на диаграмме 1.

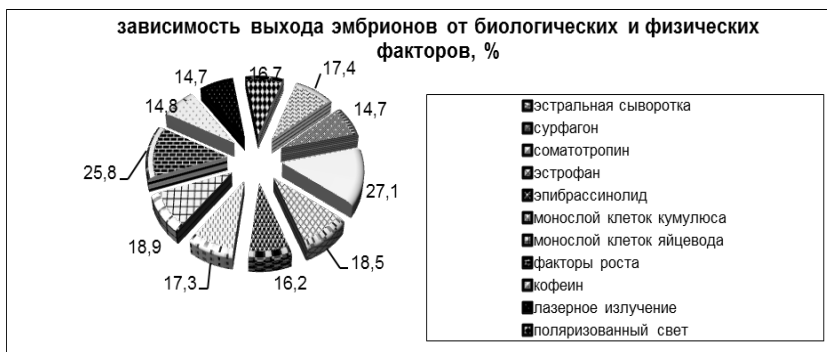
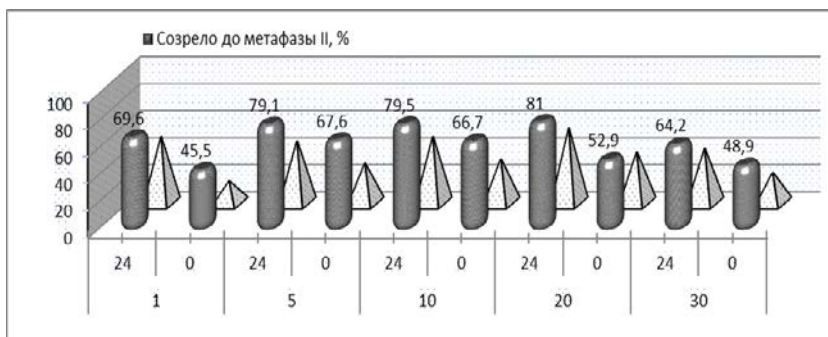


Рисунок 1 – Влияние биологических и физических факторов на выход эмбрионов вне организма

Несмотря на активное внедрение биотехнологических методов в воспроизводство самок крупного рогатого скота большая часть потенциального запаса нереализованного генетического материала яйцеклеток высокопродуктивных коров не используется в селекционном процессе. В решении этого вопроса по-прежнему перспективным направлением остаётся разработка способов длительного хранения фрагментов яичников, ооцит-кумулюсных комплексов и ранних зародышей, полученных вне организма, в глубокозамороженном состоянии при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Создание криобанка ооцитов, зигот и эмбрионов путем их глубокого замораживания в жидком азоте является на современном этапе одним из приоритетных и перспективных методов сохранения генетических ресурсов пород сельскохозяйственных животных.

При разработке способа криоконсервирования гамет самок крупного рогатого скота изучена жизнеспособность ооцитов при варьировании состава криопротекторов, базовых сред и условий созревания вне организма [7]. Достигнута криотолерантность деконсервированных ооцитов, позволяющая после их оплодотворения вне организма получать дробящихся зародышей на 3-12 % больше по сравнению с существующим вариантом (рисунок 2).

Анализ проведённых исследований криотолерантности деконсервированных ооцитов, а также криорезистентности ранних зародышей позволили разработать методологию сохранения генетических ресурсов в скотоводстве с использованием клеточных репродуктивных технологий и криоконсервирования. Установлено, что наиболее эффективным криопротектором является 1,4М глицерин, после насыщения в нем до 40 % ранних зародышей сохраняют жизнеспособность (рисунок 3).



0; 24 (ч) – время культивирования ооцитов; 1; 5; 10; 20; 30 – количество ооцитов в группах.

Рисунок 2 – Криотолерантность ооцитов коров после витрификации в зависимости от условий созревания

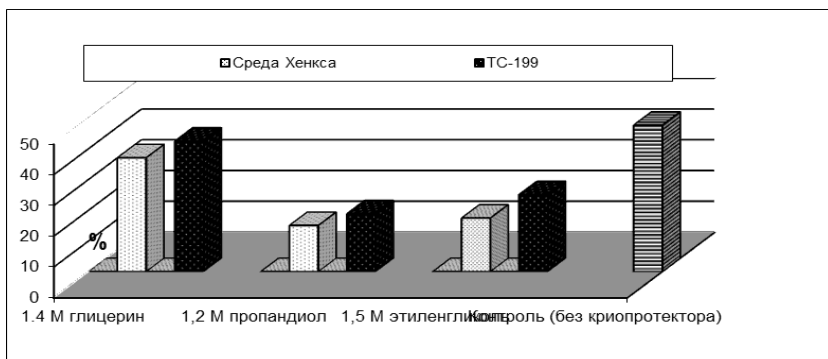


Рисунок 3 – Влияние криопротектора и базовой среды на развитие ранних зародышей in vitro

Наиболее широко в практике клеточных репродуктивных технологий используются в качестве монослойных субстратов клетки кумулюса и гранулёзы, реже – яйцевода [8]. Однако при их применении увеличивается риск бактериального и микотического заражения питательных сред, что приводит к уменьшению эффективности получения эмбрионов вне организма вследствие их дегенерации и гибели. С целью предотвращения указанных негативных явлений нами разработан метод использования иммортализованных линий соматических клеток фибробластов мыши после цитостатической обработки, позволяющий достичь созревания ооцитов до стадии метафаза II на уровне 81,4 % и получать до 25,7 % преимплантационных эмбрионов при

уровне дробления 48,3-55,4 % (рисунок 4).

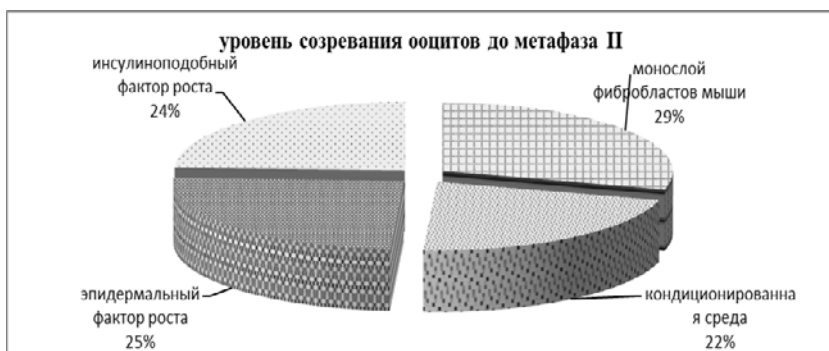


Рисунок 4 – Влияние иммортализованной линии фибробластов мыши на уровень созревания ооцитов

В настоящее время оценка качества ооцитов и ранних эмбрионов проводится по морфологическим критериям, что остаётся одним из наиболее субъективных приёмов тестирования их функционального состояния. Для исключения субъективизма и разработки объективных высокочувствительных методов анализа жизнеспособности, отражающих их статус, предпринята попытка оценки состояния метаболизма нативных и деконсервированных ооцитов и зародышей коров, полученных вне организма, по внутриклеточной концентрации АТФ и состоянию митохондрий.

Установлено, что внутриклеточная концентрация АТФ и состояние митохондрий по количеству связанного с клетками флуоресцентного красителя родамина 123 могут служить критерием оценки метаболической активности как нативных, так и деконсервированных ооцитов и эмбрионов коров, полученных вне организма: интенсивность флуоресценции Rd123 для ооцитов – 3,74 отн. ед., для эмбрионов – 2,9 отн. ед.; внутриклеточный уровень АТФ – 7,0 пМ/ ооцит и 5,1 пМ/эмбрион соответственно [9].

Тенденции развития репродуктивных технологий в последние годы свидетельствуют о том, что получение ранних эмбрионов коров вне организма из интактных и деконсервированных ооцитов по-прежнему остаётся актуальным вопросом в плане сохранения генофонда животных. На основании анализа собственных исследований и информационного материала можно выделить основные перспективные направления исследований в данной области:

- поиск и конструирование новых способов получения эмбрионов *in vitro*;

- поиск новых подходов в изучении морфологических, цитогенетических, биофизических особенностей строения гамет и ранних зародышей, создание условий и прогнозирование потенции к оплодотворению и последующему дроблению;
- разработка методов криоконсервации ооцитов, эмбрионов и репродуктивных тканей, преимущественно техники витрификации;
- оптимизация состава сред для созревания, оплодотворения и культивирования эмбрионов, разработка новых криофилактиков;
- определение пола, наследственных заболеваний и продуктивных признаков на стадии эмбрионов.
- создание банка конкурентоспособной импортозамещающей племенной продукции на стадии гамет и ранних эмбрионов.

В данном контексте в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» ведутся исследования по всем заявленным направлениям, которые найдут своё достойное место в практике в вопросах воспроизведения высокоценных генотипов животных, способствующих ускорению селекции и сохранению генетических ресурсов Республики Беларусь.

Заключение:

1. Усовершенствованная технология получения ранних зародышей вне организма для ускоренного размножения и сохранения высокоценных животных в скотоводстве позволяет получать 78,8-83,2 % созревших до стадии оплодотворения ооцитов, 20,2-22,4 % преимплантационных зародышей при уровне дробления 45,6-50,3 % и приживляемости около 40,0-45 %.

2. Наиболее эффективным криопротектором является 1,4М глицерин, после насыщения в нём до 40 % ранних зародышей сохраняют жизнеспособность.

3. Использование иммортализованных линий соматических клеток фибробластов мыши после цитостатической обработки позволяет достичь созревания ооцитов до стадии метафаза II на уровне 81,4 % и получать до 25,7 % преимплантационных эмбрионов при уровне дробления 48,3-55,4 %.

4. Внутриклеточная концентрация АТФ и состояние митохондрий по количеству связанного с клетками родамина 123 могут служить критерием оценки метаболизма ооцитов и эмбрионов коров, полученных вне организма: интенсивность флуоресценции Rd123 для ооцитов – 3,74 отн. ед., для эмбрионов – 2,9 отн. ед.; внутриклеточный уровень АТФ – 7,0 пМ/ ооцит и 5,1 пМ/эмбрион соответственно [9].

5. Клеточные репродуктивные технологии, применяемые в практике скотоводства Республики Беларусь, по-прежнему являются пер-

спективным направлением исследований, позволяющим не только многократного увеличить интенсивность использования генетического потенциала племенных животных, но и способствовать сохранению и управлению генетическими ресурсами в животноводстве.

Литература

1. Использование биотехнологических методов в решении современных проблем репродукции сельскохозяйственных животных, как стратегия инновационного развития животноводства в Республике Беларусь / Л. В. Голубец, А. С. Дешко, М. П. Старовойтова, Е. К. Стецкевич // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : материалы XV междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 45-летию образования кафедр свиноводства и мелкого животноводства и крупного животноводства и переработки животноводческой продукции УО «БГСХА». – Горки, 2012. – С. 321-326.

2. Усовершенствованная технология получения ранних зародышей вне организма для ускоренного размножения и сохранения высокоценных животных в скотоводстве : методические рекомендации / А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич, В. П. Симоненко, И. В. Кирилова, Е. С. Лобанок. – Жодино, 2011. – 35 с.

3. Оптимизация культуральных сред для созревания и оплодотворения ооцитов коров вне организма / А.И. Ганджа, И. П. Шейко, Л. Л. Леткевич, Т. И. Кузьмина // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2013. – № 1. – С. 88-92.

4. Оптимальные режимы получения и использования монослойных культур клеток репродуктивного тракта коров в процедуре эко / И. В. Кириллова, А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич, В. П. Симоненко, О. П. Курак, Н.В. Журина, М. А. Ковальчук // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сб. науч. ст. по материалам XVII Междунар. науч.- практ. конф., Гродно, 16 мая 2014 г. – Гродно : ГГАУ, 2014. – Ветеринария. Зоотехния. – С. 208-209.

5. Использование соматотропного гормона в питательных средах для созревания ооцитов и культивирования ранних зародышей in vitro / В. П. Симоненко, А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич, И. В. Кириллова, О. П. Курак, Н. В. Журина, М. А. Ковальчук // Учёные записки УО «ВГАВМ». – Витебск, 2015. – Т. 51, вып. 1, ч. 1. – С. 142-146.

6. Ганджа, А. И. Влияние биофизического воздействия на созревание ооцитов вне организма / А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич, В. П. Симоненко // Зоотехнічна наука Поділля: історія, проблеми, перспективи : матеріали междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-літтю основания и 55-літтю возрождения биотехнол. фак. ПАТУ, 16-18 марта 2010 г. – Каменец-Подольский, 2010. – С. 51-53.

7. Жизнеспособность деконсервированных ооцитов коров после витрификации фрагментов яичников и овариальных фолликулов с использованием комбинации криопротекторов / Л.Л. Леткевич, А. И. Ганджа, Т. И. Кузьмина, В. П. Симоненко, И. В. Кириллова, О. П. Курак, Н. В. Журина, М. А. Ковальчук, Н. А. Лобан // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. – Жодино, 2015. – Т. 50, ч. 1. – С. 109-117.

8. Синхронизация моделируемых систем эко крупного рогатого скота с естественными условиями репродуктивного тракта / И. В. Кириллова, А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич, В. П. Симоненко, О. П. Курак, Н.В. Журина, М. А. Ковальчук // Интенсивность и конкурентоспособность отраслей животноводства : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию со дня рожд. и 50-летию трудовой деят. Заслуж. деятеля науки РФ, Заслуж. ученого Брянской области, Почетного проф. Брянского ГАУ, д-ра с.-х. наук, проф. Гамко Леонида Никифоровича, 21-22 апр. 2016 г. – Кокино, 2016. – С. 230-233.

9. Сохранность и метаболизм деконсервированных ооцитов и ранних зародышей коров / А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич, В. П. Симоненко, Е. С. Лобанок, В. П. Никольская // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2010 – Т. 45, ч. 1. – С. 28-35.

Поступила 21.02.2019 г.