

И.П. ШЕЙКО, И.В. КИРИЛЛОВА, А.И. ГАНДЖА, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ,
В.П. СИМОНЕНКО, О.П. КУРАК, Н.В. ЖУРИНА,
М.А. КОВАЛЬЧУК, О.В. БУРАКОВА, Л.В. ГЛУЩЕНКО

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПОСЛЕ ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОБРАБОТКИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO*

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

В статье представлен анализ жизнеспособности эмбрионов крупного рогатого скота после физических методов обработки половых клеток в технологии *in vitro*. Как показали исследования, при воздействии физическими факторами непосредственно на сперму быков-производителей перед процедурой капацитации в технологии *in vitro* улучшаются морфологические показатели спермопродукции: увеличивается процент общей подвижности, количество спермиев с прямолинейно-поступательным движением, снижается их количество с аномалиями развития в процессе созревания, что способствует повышению оплодотворяющей способности и переживаемости гамет вне организма и, как следствие, увеличению количества подробившихся ооцитов на 22,5-27,5 п. п. и выхода преимплантационных эмбрионов на 8,9-18,8 п. п. относительно контроля. Воздействие на оплодотворенные ооциты комплексным электромагнитным излучением способствует увеличению уровня трансформации подробившихся ооцитов в преимплантационные эмбрионы до 55,6 %, что выше, чем в контроле на 27,0 п. п.

Воздействие на половые клетки крупного рогатого скота комплексным спектром электромагнитного излучения позволяет получить 20,0-20,4 % годных к пересадке эмбрионов. После обработки половых клеток крупного рогатого скота электромагнитными волнами 37,5-41,9 % подробившихся эмбрионов достигает преимплантационных стадий и превышает показатель контроля на 8,9-13,3 п. п.

Ключевые слова: сперма, эмбрион, электромагнитное и лазерное излучение, крупный рогатый скот

I.P. SHEYKO, I.V. KIRYLAVA, A.I. GANDZHA, L.L. LETKEVICH, V.P. SIMONENKO,
O.P. KURAK, N.V. ZHURINA, M.A. KAVALCHUK, O.V. BURAKOVA,
L.V. HLUSHCHENKOO

VIABILITY OF CATTLE EMBRYOS AFTER PHYSICAL TREATMENT OF GAMETES IN *IN VITRO* TECHNIQUE

*Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus
for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

The paper presents analysis of viability of cattle embryos after physical treatment of gametes in *in vitro* technique. Studies have shown that when physical factors directly affected the sire semen, the morphological parameters of semen product improved in *in vitro* technique prior to capacitation procedure: the percentage of general motility increases, the number of spermatozoa with rectilinear translation motion, number of spermatozoa with developmental anomalies during maturation decreases, which increases the fertilizing ability and survival of

gametes *in vitro*, as a result, increases the number of cleaved oocytes by 22.5-27.5 p.p. and the yield of preimplantation embryos by 8.9-18.8 p.p. relative to the control. Treatment of fertilized oocytes with complex electromagnetic radiation increases the level of transformation of cleaved oocytes into preimplantation embryos by up to 55.6%, which is 27.0 p.p. higher compared to the control.

Treatment on gametes of cattle with a complex spectrum of electromagnetic radiation makes it possible to obtain 20.0-20.4% of embryos suitable for transplantation. After treating gametes of cattle with electromagnetic waves, 37.5-41.9% of cleaved embryos reach preimplantation stages and exceed the control index by 8.9-13.3 p.p.

Keywords: semen, embryo, electromagnetic and laser radiation, cattle

Введение. В последние годы появился заметный интерес к изучению возможности применения в области биологии размножения животных разнообразных физических методов обработки спермы и эмбрионов с целью повышения их криорезистентности и биологической полноценности. Положительное влияние биофизических методов (токи малой силы, ультразвук, лазерное излучение) на биологически активные точки организма (акупунктура) или полученный от них биоматериал (сперма, кровь и т. д.) сельскохозяйственных животных прослеживается в исследованиях разных авторов [1, 2, 3], однако данные об их воздействии на полученные вне организма эмбрионы не многочисленные, разноречивы и требуют более глубоких исследований.

Развитие квантовой электроники и создание лазерных аппаратов с низкоинтенсивным излучением (НИЛИ) послужило основой к их использованию в биостимуляции органов и тканей человека и животных. В ряде научных работ раскрыт и показан на человеке и животных механизм биостимулирующего и терапевтического эффекта НИЛИ [4, 5, 6]. Вместе с тем, механизм многообразного действия этих аппаратов на биологический организм еще до конца не изучен. В особенности это касается сельскохозяйственных объектов.

Интересной особенностью действия электромагнита на живые организмы является тот факт, что при обработке достаточно крупных организмов его действие может сказаться на органах, значительно удаленных от места воздействия. Это говорит о том, что в живых организмах имеются своеобразные «приемники» излучения и каналы передачи полученной информации. В отличие от привычных раздражителей эффект магнитного поля возникает через длительный латентный период и продолжается большой отрезок времени после окончания воздействия. Таким образом, электромагнитное воздействие не ограничивается только обрабатываемым участком, а вызывает ответную реакцию сердечно-сосудистой, нервной, гормональной, репродуктивной и других систем организма [7].

Исследования по определению эффектов слабых магнитных полей на эмбриональных клетках и ранних зародышах свидетельствуют о том, что путём физического воздействия можно неинвазивно влиять на

процессы клеточной пролиферации и дифференцировки, а также в целом на морфогенез. Существенное значение имеет выбор магнитного поля (МП), с помощью которого можно как подавлять основные клеточные процессы, так и активировать их. Выявлено стимулирующее действие комбинированного магнитного поля с крайне слабой переменной компонентой на развитие зародышей мыши со стадии 8-16 бластомеров, что способствует дифференцировке тотипотентных клеток на клетки внутренней клеточной массы и трофобласта [8]. Как известно, именно на стадии 8-16 бластомеров многие эмбрионы останавливаются в развитии (так называемый «блок развития *in vitro*») – в их геноме имеются существенные ошибки, доставшиеся от родительских гамет или возникшие в процессе их слияния [9]. Важно преодолеть этот блок развития, что и было предпринято в наших исследованиях.

Целью исследований стало изучение жизнеспособности эмбрионов крупного рогатого скота после физических методов обработки половых клеток в технологии *in vitro*.

Материал и методы исследований. Исследования проводились в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

При проведении исследований по изучению воздействия физических факторов на жизнеспособность ранних эмбрионов крупного рогатого скота было сформировано 3 опытных группы. Созревание ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) коров вне организма осуществляли в комплексной среде ТС-199 (фирма Sigma). В I опытной группе созревшие ооциты оплодотворяли капацизированной спермой быков-производителей, предварительно подвергавшейся воздействию: 1) электромагнитного излучения 60 секунд электромагнитная индукция 8 мТл – А; 2) электромагнитного излучения 30 секунд электромагнитная индукция 24 мТл – Б; 3) лазерного излучения 10 кГц 30 секунд – В; 4) комплексного воздействия магнит+лазер (ЭМИ 8мТл 60 сек+ЛИ 10 кГц 30сек) – Г; 5) комплекса магнит+лазер (ЭМИ 24мТл 30 сек+ЛИ 10 кГц 30сек) – Д. Во II опыте для обработки эмбрионов, предварительно созревших и оплодотворенных ооцитов крупного рогатого скота, были выбраны аналогичные параметры физического воздействия. В III опыте физическому воздействию магнита и лазера (с аналогичными параметрами воздействия) были подвергнуты как сперматозоиды быков-производителей перед процедурой капацитации, так и оплодотворённые ооциты. В контрольной группе все этапы получения эмбрионов (созревание, оплодотворение и культивирование вне организма) проводили по общепринятой методике, без использования физического воздействия на половые клетки.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Установлено влияние физического воздействия электромагнитного и лазерного излучения на половые клетки как самцов, так и самок крупного рогатого скота при их использовании в технологии экстракорпорального оплодотворения (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние физических факторов воздействия на жизнеспособность ранних эмбрионов крупного рогатого скота

Опытные группы	Воздействие физических факторов на этапе		Кол-во ооцитов n	Уровень дробления		Выход ранних эмбрионов	
	Капацитация спермы	Культирование эмбрионов		n	%	n	%
Контроль	–	–	23	7	30,4	2	8,7
I опыт	A	–	28	15	53,6	6	21,4
	B	–	22	12	54,5	5	22,7
	B	–	17	9	52,9	3	17,6
	Г	–	19	11	57,9	5	26,3
	Д	–	48	27	56,3	13	27,1
В среднем по I опыту			134	74	55,2	32	23,9
II опыт	–	A	13	6	46,2	3	23,1
	–	B	12	6	50,0	2	16,7
	–	B	10	4	40,0	2	20,0
	–	Г	15	8	53,3	3	20,0
	–	Д	18	9	50,0	5	27,7
В среднем по II опыту			68	33	48,5	13	19,1
III опыт	A	A	10	5	50,0	1	10,0
	B	B	14	6	42,9	2	14,3
	B	B	8	3	37,5	1	12,5
	Г	Г	15	6	40,0	2	11,1
	Д	Д	18	6	33,3	–	–
В среднем по III опыту			65	26	40,0	6	9,2

В первом опыте во всех группах выявлено, что после воздействия на сперму перед процедурой капацитации электромагнитным и лазерным излучением, как отдельно, так и в комплексе с установленными ранее режимами обработки, в среднем было получено 55,2 % подробившихся эмбрионов, что превышало контрольные показатели на 24,8 п. п., при этом было получено 23,9 % преимплантационных эмбрионов, что выше, чем в контроле на 15,2 п. п. Установлено, что оптимальными методами физического воздействия на сперму быков-производителей перед процедурой её созревания вне организма являются следующие: обработка спермы магнитом, индукция которого со-

ставляла 8 мТл в течение 1 минуты, в комплексе с лазером (30 сек), либо магнитом (24 мТл 30 сек) в комплексе с лазером (30 сек). При этом было дополнительно получено 25,9-27,5 п. п. подробившихся и 17,6-18,4 п. п. преимплантационных эмбрионов. Полученные данные согласуются с проведёнными нами ранее исследованиями, где было установлено, что при воздействии комплексным спектром электромагнитных волн (лучших вариантов электромагнитного и лазерного излучения) на сперму быков-производителей улучшаются морфологические показатели спермопродукции: увеличивается процент общей подвижности, их количество с прямолинейно-поступательным движением, снижается число спермиев с аномалиями развития в процессе созревания (наличие проксимальных капель (аномалии головки спермия), дистальных капель (аномалии тела спермия), изогнутых либо изломанных хвостов (аномалии хвостика спермия)), что способствует повышению оплодотворяющей способности и переживаемости гамет вне организма.

Во втором опыте, где физическому воздействию были подвергнуты оплодотворённые ооциты, отмечено некоторое снижение исследуемых показателей относительно I опытной группы: уровня дробления на 6,7 п. п. и выхода ранних эмбрионов на 4,8 п. п. Однако при данном способе физического воздействия на ооциты дополнительно было получено 18,1 п. п. подробившихся эмбрионов и 10,4 п. п. эмбрионов, пригодных к пересадке коровам-реципиентам, относительно контрольной группы. Полученные в данном эксперименте данные также согласуются с проведёнными ранее исследованиями: снижение числа подробившихся эмбрионов является следствием повышения числа спермиев с аномалиями развития и снижения их количества, обладающего прямолинейно-поступательным движением, как основного показателя готовности спермиев к оплодотворению, что уменьшает их оплодотворяющую способность. Однако следует отметить увеличение уровня трансформации подробившихся и подвергнутых комплексному физическому воздействию (магнитом 24 мТл 30сек в комплексе с лазером 30 сек) ооцитов в преимплантационные эмбрионы. В данной группе он составил 55,6 %, что выше, чем в I опыте на 5,6 п. п., и выше, чем в контроле на 27,0 п. п. Это говорит о том, что электромагнитное излучение стимулирует обменные процессы в гаметах, улучшает структурные компоненты и положительно влияет на биохимические показатели клеток после воздействия физических факторов на оплодотворенные ооциты, при этом повышается жизнеспособность ранних эмбрионов крупного рогатого скота.

В III опыте, когда электромагнитному и лазерному воздействию были подвергнуты как спермии перед процедурой капацитации, так и ооциты после оплодотворения, отмечено снижение числа подробивших-

ся ооцитов на 8,5-15,2 п. п. относительно I и II опытных групп, но при этом уровень дробления повысился на 9,6 п. п. относительно контрольной группы. Выход преимплантационных эмбрионов составил 9,2 %, что было на уровне контрольной группы. При этом 23,1 % подробившихся эмбрионов трансформировались в преимплантационные, что ниже, чем в контроле на 5,5 п. п. Это указывает на негативное влияние избыточного облучения при применении физических факторов воздействия как на спермии, так и на эмбрионы, так как из литературных источников известно, что эффект магнитного поля возникает через длительный латентный период и продолжается большой отрезок времени после окончания воздействия.

Таким образом, установлено, что целесообразно воздействовать физическими факторами (магнитом 24 мТл 30сек в комплексе с лазером 30 сек) непосредственно на сперму быков-производителей перед процедурой капациации *in vitro* для улучшения их морфологических показателей, либо только на оплодотворенные ооциты.

Были проанализированы средние показатели уровня дробления и выхода ранних эмбрионов при разных способах воздействия магнитным, лазерным излучением, а также лучших вариантов комплексного воздействия без учёта этапа, на котором проводилось воздействие физических факторов (рисунок 1).

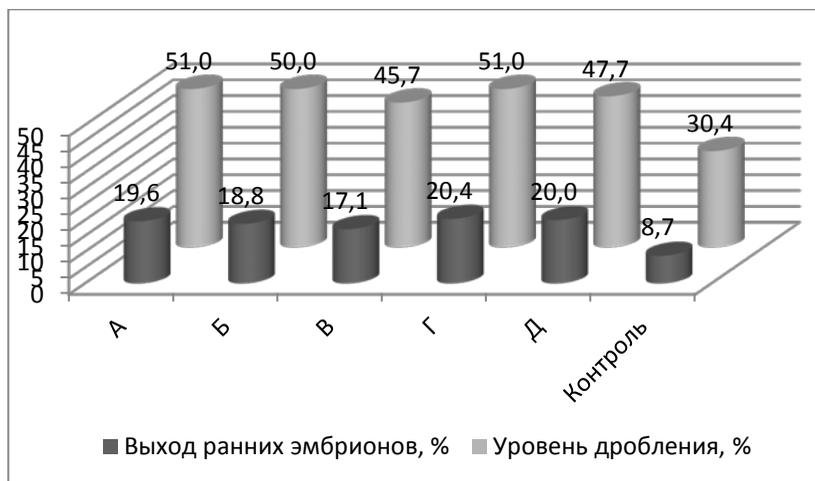


Рисунок 1 – Уровень дробления и выход преимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота в зависимости от способа воздействия физических факторов

Установлено, что воздействие физических факторов на половые клетки как самцов, так и самок крупного рогатого скота способствует

повышению выхода как подробившихся эмбрионов, так и количества пригодных к пересадке коровам-реципиентам, что говорит о положительном влиянии на процессы клеточной пролиферации и дифференцировки. При воздействии на половые клетки крупного рогатого скота электромагнитным излучением уровень дробления повышается до 45,7-51,0 %, что превышает показатели контрольной группы на 15,3-20,6 п. п. При этом выход морул-бластоцист, то есть готовых к трансплантации реципиентам эмбрионов, повышается до 17,1-20,4 %, что на 8,4-11,7 п. п. выше, чем в контроле.

Так как основным показателем экономической эффективности любого сельскохозяйственного предприятия является получение телят, то повышение выхода эмбрионов, пригодных к пересадке, является приоритетным. В связи с этим рекомендуется воздействовать на половые клетки крупного рогатого скота комплексным спектром электромагнитного излучения (магнит с индукцией 24 мТл 30сек в комплексе с лазером 30 сек, либо магнит с индукцией 8 мТл 60сек в комплексе с лазером 30 сек), что позволит получить 20,0-20,4 % годных к пересадке эмбрионов.

Ещё одним из важных показателей в технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота с использованием экстракорпорального оплодотворения является уровень трансформации подробившихся эмбрионов в морулы-бластоцисты. На рисунке 2 представлена диаграмма уровня трансформации оплодотворенных ооцитов в преимплантационные эмбрионы после воздействия физических факторов на половые клетки как быков-производителей, так и коров-доноров ооцитов *in vitro* с учётом вида и режима воздействия физических факторов.

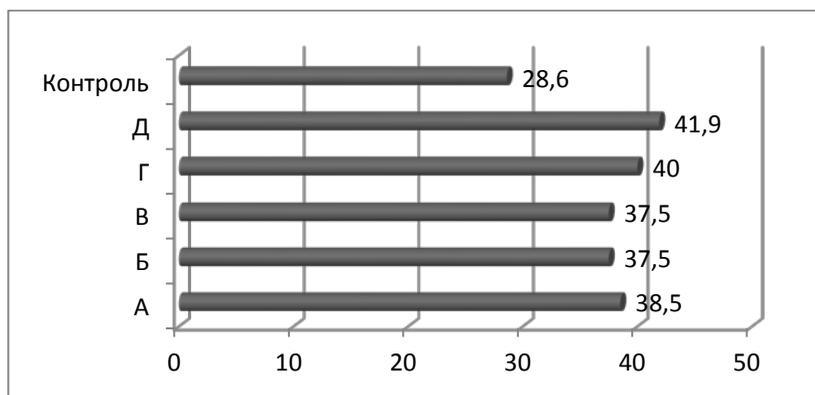


Рисунок 2 – Уровень трансформации подробившихся эмбрионов в морулы-бластоцисты с учётом вида и режима воздействия физических факторов

В целом, после обработки половых клеток крупного рогатого скота электромагнитными волнами 37,5-41,9 % подробившихся эмбрионов достигают преимплантационных стадий, что превышает показатель контроля на 8,9-13,3 п. п. После применения магнита совместно с лазером (опыт Г и Д) в технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* данный показатель повышается на 2,5-4,4 п. п. относительно остальных опытных групп и на 11,4-13,3 п. п. относительно контроля.

Таким образом, установлено положительное влияние физических факторов на жизнеспособность ранних эмбрионов, процессы их пролиферации и дифференцировки, а также повышение оплодотворяющей способности и переживаемости спермиев вне организма. При воздействии на половые клетки крупного рогатого скота электромагнитным излучением уровень дробления повышается до 45,7-51,0 %, что превышает показатели контрольной группы на 15,3-20,6 п. п. При этом выход морул-бластоцист, то есть готовых к трансплантации реципиентам эмбрионов, повышается до 17,1-20,4 %, что на 8,4-11,7 п. п. выше, чем в контроле. Установлена тенденция повышения выхода ранних зародышей после использования комплексного спектра физических факторов воздействия. В целом, после обработки половых клеток крупного рогатого скота электромагнитными волнами 37,5-41,9 % подробившихся эмбрионов достигает преимплантационных. После применения магнита совместно с лазером в технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* данный показатель повышается на 2,5-4,4 п. п. относительно остальных опытных групп и на 11,4-13,3 п. п. относительно контроля.

Заключение. 1. Установлено, что целесообразно воздействовать физическими факторами непосредственно на сперму быков-производителей перед процедурой капацитации *in vitro*, что способствует повышению их оплодотворяющей способности, переживаемости спермиев вне организма и, как следствие, увеличению количества подробившихся ооцитов на 22,5-27,5 п. п. и выхода преимплантационных эмбрионов на 8,9-18,8 п. п. относительно контроля. Воздействие на оплодотворённые ооциты комплексным электромагнитным излучением (магнитом 24 мТл 30 сек в комплексе с лазером 30 сек) способствует увеличению уровня трансформации подробившихся ооцитов в преимплантационные эмбрионы до 55,6 %, что выше, чем в контроле на 27,0 п. п.

2. Воздействие на половые клетки крупного рогатого скота комплексным спектром электромагнитного излучения (магнит с индукцией 24 мТл 30 сек в комплексе с лазером 30 сек либо магнит с индукцией 8 мТл 60 сек в комплексе с лазером 30 сек) позволит дополнительно получить 11,4-11,7 п. п. годных к пересадке эмбрионов.

3. После обработки половых клеток крупного рогатого скота электромагнитными волнами 37,5-41,9 % подробившихся эмбрионов достигает преимплантационных стадий и превышает показатель контроля на 8,9-13,3 п. п.

Литература

1. Агафонников, В. Ф. Влияние автономных электростимуляторов желудочно-кишечного тракта с эндогенным электрофорезом ионов цинка на сперматогенез / В. Ф. Агафонников, М. Н. Романовский // Мед. журн. Чувашии. – 1995. – № 3-4. – С. 126-132.
2. Короткевич, О. С. Влияние ультразвука на спермопродукцию хряков / О. С. Короткевич // Производство продуктов животноводства в условиях интенсивных технологий. – Новосибирск, 1990. – С. 75-78.
3. Елисейкин, Д. В. Особенности резистентности и воспроизводительной функции хряков при воздействии лазерным облучением : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Д. В. Елисейкин. – Витебск, 2003. – 20 с.
4. Бостонов, А. Б. Оплодотворяющая способность семени быков под влиянием лазерного облучения / А. Б. Бостонов // Здравсохранение Кыргызстана. – Бишкек, 2009. – № 1. – С. 135-137.
5. Бостонов, А. Б. Влияние низкоинтенсивного лазерного облучения на качество семени быков черно-пестрых пород скота / А. Б. Бостонов, К. М. Беккулиев // Вестник Кыргызского аграрного университета. – Бишкек, 2008. - № 1(9). – С. 188-190.
6. Бостонов, А. Б. Возможности улучшения воспроизводительных качеств быков-производителей лазерной биотехнологией / А. Б. Бостонов, К. М. Беккулиев, Ю. Г. Быковченко // Вестник с.-х. науки Казахстана. – 2008. – № 10. – С. 37-38.
7. Техника СВЧ и УВЧ в медицинских приборах : мет. пособие для студ. спец. «Медицинская электроника» / сост.: А. А. Тамело, Д. Ф. Молодкин. – Минск : БГУИР, 2005. – 27 с.
8. Влияние «нулевого» магнитного поля на рост эмбриональных клеток и ранних зародышей мыши в культуре *in vitro* / М. А. Осипенко [и др.] // Биофизика. – 2008. – Т. 53, Вып. 4. – С. 705-712.
9. Катмаков, П. С. Биотехнология в животноводстве : учеб. пособие / П. С. Катмаков, А. В. Бушов, В. П. Гавриленко. – Ульяновск : УГСХА, 2008. – 154 с.

Поступила 18.02.2020 г.