

## УРОВЕНЬ ПЕНЕТРАЦИИ ООЦИТОВ В РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В.П. СИМОНЕНКО

И.П. ШЕЙКО, доктор сельскохозяйственных наук, академик

А.И. ГАНДЖА, кандидат сельскохозяйственных наук

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, кандидат сельскохозяйственных наук

РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»

Реферат. Установлен уровень пенетрации ооцитов в различных режимах культивирования: время совместного инкубирования спермиев с яйцеклетками – 18-20 часов; объём питательных сред Тиродe и Тиродe-М – не менее 0,5 мл; плотность размещения – 0,04-0,05 клеток на 1 мм<sup>2</sup>, что позволяет получать 52,1-57,4 % дробящихся клеток.

Ключевые слова: ооциты, зародыши, спермии, дробление, оплодотворение, питательная среда.

**Введение.** Культивирование и оплодотворение ооцитов коров означают, что последовательность очень сложных физиологических процессов, протекающих *in vivo* в динамически изменяющейся среде, должны проходить *in vitro* в относительно простых и статических условиях. В искусственных условиях этот процесс протекает по следующей схеме: извлечение ооцитов, их культивирование, капацитация сперматозоидов, оплодотворение ооцитов, культивирование эмбрионов [1, 2, 8, 11].

Известно, что для успешного оплодотворения ооцитов сперматозоиды млекопитающих проходят процесс созревания, или капацитации. В естественных условиях это происходит в половых путях самок и заключается в изменении характера плавательной активности и преобразовании строения клеточных мембран на головке спермиев. Эти преобразования состоят в удалении поверхностной оболочки спермиев, а также в обеспечении исходно неподвижных половых клеток необходимыми веществами для придания им плавательной активности. Окончательной стадией преобразования спермиев (фаза капацитации) при постановке опытов *in vitro* можно считать приобретение ими оплодотворяющей способности [3, 4, 5, 7, 10].

В связи с вышесказанным, целью наших исследований являлось изучение уровня пенетрации ооцитов при различных режимах культивирования и использования различных питательных сред.

**Материал и методы исследований.** Исследования были проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Институт животноводства НАН Беларуси».

Яичники коров доставляли с Минского мясокомбината в лаборато-

рию генетики сельскохозяйственных животных в растворе Хенкса. Выделение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичника лезвием безопасной бритвы в среде с добавлением 1 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 ед./мл гентамицина и 1 ед./мл гепарина. Дозревание ооцит-кумулясных комплексов проходило в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере при максимальной влажности и температуре 38°C в среде TC-199 (Sigma) с добавлением 25 мМ/л буфера HEPES, 10 ед./мл гентамицина и 15 % сыворотки плодов коровы. Капацитацию спермы проводили по методу swim up. Оплодотворение яйцеклеток осуществляли в каплях среды для оплодотворения под слоем минерального масла, после чего зиготы помещались для дальнейшего развития в среду TC-199 с 15 % эмбриональной сыворотки.

Для изучения эффективности пенетрации ооцитов в зависимости от времени совместной инкубации мы использовали различные временные рамки совместной инкубации ооцитов со спермой: 3 ч.; 3,1-6 ч.; 6,1-9 ч.; 9,1-12 ч.; 12,1-15 ч.; 15,1-18 ч.; 18,1-20 ч.; 20,1-24 ч.

Изучение уровня оплодотворяемости яйцеклеток в культуре *in vitro* в зависимости от объема среды проводили в чашках с разным объемом питательной среды: 3; 0,5 и 0,3 мл.

Для изучения эффективности оплодотворения ооцитов в зависимости от количества клеток на единицу площади мы использовали чашки с разной площадью и проанализировали плотность посадки, которая составила: 0,05; 0,04; 0,1; 0,2; 0,3 ооцита на мм<sup>2</sup>.

Оплодотворение ооцитов проводили в следующих средах: TC-199, Тироде, Тироде модифицированная, Игла.

Все манипуляции с ооцитами, оценку активности сперматозоидов, стадий развития и качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота осуществляли под микроскопом МБС-10 при увеличении в 60 крат.

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** Для успешного оплодотворения и дальнейшего развития ранних зародышей большое значение имеет время совместного инкубирования ооцитов со сперматозоидами.

В табл. 1 представлены результаты совместной инкубации спермиев с ооцитами. Как видно из таблицы, оплодотворяемость находится в прямой зависимости от продолжительности совместного культивирования гамет. Так, при трехчасовом культивировании спермиев с ооцитами получено 14,9 % дробящихся зародышей, из них – 19,2 % морул-бластоцист, что составило 2,8 % от общего количества использованных в опыте ооцитов. Увеличение времени совместного инкубирования клеток до 6 и 9 часов повысило оплодотворяемость ооцитов на 2,2 и 12,9 %, выход морул-бластоцист по отношению к количеству оплодотворенных клеток остался на прежнем уровне – 18,7 и 22,0 %, что составило 3,2 и 6,1 % от всех ооцитов данных опытных групп. Даль-

нейшее возрастание продолжительности пребывания спермиев и яйцеклеток в одной чашке до 12 и 15 часов позволило получить 32,5 и 40 % ( $P<0,01$ ) дробящихся зародышей, из них - 32,2 и 29,7 % эмбрионов – на предимплантационных стадиях, что соответствует 10,5 и 11,8 % от общего количества поставленных на культивирование клеток. При 18-тичасовом инкубировании оплодотворилось 47,4 % ( $P<0,001$ ) яйцеклеток, из них получено 32,1 % Мо-В1, что составило 15,2 % от всех клеток в группе. Наиболее оптимальным является время 18,1-20,0 часов. В данном случае получено 57,4 % ( $P<0,001$ ) дробящихся зародышей, из них 37,6 % – Мо-В1, что составило 21 % от всех ооцитов в группе.

Таблица 1

Выход жизнеспособных эмбрионов в зависимости от продолжительности оплодотворения

| Продолжительность совместной инкубации спермы с ооцитами, ч | Оплодотворено ооцитов, n | Уровень дробления |         | Выход Мо-В1 |      |
|---|--------------------------|-------------------|---------|-------------|------|
|   |                          | n                 | %       | n           | %    |
| 3,0   | 174                      | 26                | 14,9    | 5           | 19,2 |
| 3,1-6,0   | 187                      | 32                | 17,1    | 6           | 18,7 |
| 6,1-9,0   | 180                      | 50                | 27,8    | 11          | 22,0 |
| 9,1-12,0  | 191                      | 62                | 32,5    | 20          | 32,2 |
| 12,1-15,0   | 160                      | 64                | 40,0**  | 19          | 29,7 |
| 15,1-18,0   | 171                      | 81                | 47,4*** | 26          | 32,1 |
| 18,1-20,0   | 204                      | 117               | 57,4*** | 43          | 36,8 |
| 20,1-24,0   | 157                      | 86                | 54,8*** | 25          | 29,1 |

Дальнейшее увеличение времени до 24 часов снизило количество оплодотворенных ооцитов на 2,6 % и на 8,5 % – Мо-В1. Выход ранних зародышей на предимплантационных стадиях по отношению к общему количеству поставленных в опыте ооцит-кумулясных комплексов снизился на 5,1 %.

Таким образом, продолжительность совместного культивирования сперматозоидов с яйцеклетками в синтетических, питательных средах должна составлять 18-20 часов, что позволяет получать 57,4 % дробящихся клеток и 36,8 % зародышей на стадии морула-бластоциста.

На следующем этапе исследований нами изучалось влияние объема среды на оплодотворяемость ооцитов. Как видно из табл. 2, наилучший уровень дробления оказался в группе ооцитов, культивировавшихся в 0,5 мл среды. Он составил 61,7 %, что на 7,2 и 13,7 % превышает аналогичный показатель в группах ооцитов с объемом среды для культивирования 3,0 мл и 0,3 мл соответственно. Что касается выхода жизнеспособных зародышей, то результаты выглядят следующим образом: так, самый высокий выход морул-бластоцист (18,1 %) наблюдался в группе ооцитов, культивировавшихся в 3,0 мл среды, что на 1,5 и 3,3 % выше по отношению к другим группам. В группе ооцитов, по-

мешенных в 0,3 мл питательной среды, наблюдался низкий выход морул-бластоцист при относительно высоком уровне дробления (48 %). По-видимому, малые объемы питательной среды не обеспечивают в достаточной степени интенсивность метаболизма дробящихся эмбрионов.

Таблица 2

Влияние объёма среды на пенетрацию ооцитов

| Объём среды, мл | Оплодотворено ооцитов, n | Уровень дробления |      | Выход Мо-В1 |      |
|-----------------|--------------------------|-------------------|------|-------------|------|
|                 |                          | n                 | %    | n           | %    |
| 3,0             | 132                      | 72                | 54,5 | 13          | 18,1 |
| 0,5             | 68                       | 42                | 61,7 | 7           | 16,6 |
| 0,3             | 104                      | 54                | 48,0 | 8           | 14,8 |

Таким образом, для проведения работ по получению ранних эмбрионов вне организма необходимо использовать синтетическую среду в объеме не менее 0,5 мл, что позволяет получать 54,5-61,7 % дробящихся зародышей.

В процессе исследований нами также изучалось влияние количества клеток, помещенных на единицу площади (табл. 3). Наилучшие результаты получены в группах с плотностью посадки 0,04 и 0,05 ооц/мм<sup>2</sup>. Так, уровень дробления в них составляет 53,6 и 52,1 % соответственно. Аналогичные показатели получены и по выходу жизнеспособных эмбрионов. Так, выход полноценных зародышей в группе с плотностью посадки 0,05 ооц/мм<sup>2</sup> составил 24,0 %, что на 1,8 % больше по отношению к группе с 0,04 ооц/мм<sup>2</sup>, на 4,8 % – по отношению к группе с 0,3 ооц/мм<sup>2</sup>, а также на 5,8 и 14,6 % к группам с 0,1 и 0,2 ооц/мм<sup>2</sup> соответственно. Плотность размещения на 1 мм<sup>2</sup> от 0,1 до 0,3 ооцитов оказала негативное влияние на процессы пролиферации ооцит-кумулясных комплексов, несмотря на то, что оплодотворяемость клеток находилась на уровне 45,8-50,1 %. Выход морул-бластоцист составил 8,3-9,8 % от общего количества ооцитов, поставленных на культивирование в группах.

Таблица 3

Зависимость оплодотворяемости ооцитов от количества клеток на единицу площади

| Плотность посадки, ооц/мм <sup>2</sup> | Оплодотворено ооцитов, n | Уровень дробления |      | Выход Мо-В1 |      |
|--|--------------------------|-------------------|------|-------------|------|
|  |                          | n                 | %    | n           | %    |
| 0,04                                   | 84                       | 45                | 53,6 | 10          | 22,2 |
| 0,05                                   | 48                       | 25                | 52,1 | 6           | 24,0 |
| 0,1                                    | 24                       | 11                | 45,8 | 2           | 18,2 |
| 0,2                                    | 71                       | 36                | 50,1 | 7           | 9,4  |
| 0,3                                    | 53                       | 26                | 49,1 | 5           | 19,2 |

Таким образом, оптимальной плотностью является размещение

0,04-0,05 клеток на 1 мм<sup>2</sup>, что позволяет получать 52,1-53,6 % дробящихся зародышей с выходом 11,9-12,5 % морул-бластоцист от поставленных на инкубацию ооцит-кумулюсных комплексов.

В процессе оплодотворения вне организма огромное значение придается составу и качеству питательной среды, в которой происходит совместное инкубирование ооцитов и сперматозоидов.

В табл. 4 представлены результаты влияния различных сред на оплодотворяемость ооцитов. Для исследований было взято 4 среды: ТС-199, Тироде, Тироде модифицированная и среда Игла. Наилучший результат показали среды Тироде и Тироде модифицированная. Так, уровень дробления в них составлял 26,7 и 24,6 % соответственно, против ТС-199 – 12,8 % и среды Игла – 15,4 %, а выход жизнеспособных эмбрионов – 21,1 и 25,5 % соответственно, против ТС-199 – 8,0 % и среды Игла – 6,7 %.

Таблица 4

Оплодотворение ооцитов в различных средах

| Среды                   | Оплодотворенно ооцитов, n | Уровень дробления |      | Выход Мо-В1 |      |
|-------------------------|---------------------------|-------------------|------|-------------|------|
|                         |                           | n                 | %    | n           | %    |
| ТС – 199                | 195                       | 25                | 12,8 | 2           | 8,0  |
| Тироде                  | 195                       | 52                | 26,7 | 11          | 21,1 |
| Тироде модифицированная | 195                       | 48                | 24,6 | 12          | 25,5 |
| Игла                    | 195                       | 30                | 15,4 | 2           | 6,7  |

Таким образом, использование синтетических, питательных сред Тироде и Тироде-М способствует оплодотворению 24,6-26,7 % яйцеклеток с выходом 21,1-25,5 % жизнеспособных эмбрионов.

**Выводы.** 1. Продолжительность совместного культивирования спермиев с яйцеклетками в синтетических, питательных средах должна составлять 18-20 часов, что позволяет получать 57,4 % дробящихся клеток и 21 % зародышей на стадии морула-бластоциста.

2. Объем синтетических, питательных сред в культуре *in vitro* должен быть не менее 0,5 мл, это способствует дроблению 54,5-61,7 % клеток, поставленных на культивирование.

3. Оптимальной плотностью является размещение 0,04-0,05 клеток на 1 мм<sup>2</sup>, что позволяет получать 52,1-53,6 % дробящихся зародышей с выходом 11,9-12,5 % морул-бластоцист от поставленных на инкубацию ооцит-кумулюсных комплексов.

4. Использование синтетических, питательных сред Тироде и Тироде-М способствует оплодотворению 24,6-26,7 % яйцеклеток с выходом 21,1-25,5 % жизнеспособных эмбрионов от количества дробящихся клеток.

#### Литература.

1. Грин, Н. Оплодотворение: Биология / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. – М.: «Мир», 1993. – 320 с.
2. Ибрагимов, Ю. Сравнительное изучение ФСГ-Р и фоллитропина при вызывании у коров суперовуляции // Тез. докл. II респ. науч.-произв. конф. – Львов, 1988. – С. 48.
3. Качанская, В.В. Модификация сред для оплодотворения ооцитов коров путем введения в них биологически активных веществ / В.В. Качанская, Т.И. Кузьмина // Бюл. ВНИИРГЖ. – Л., 1987. – Вып. 195. – С. 24-25.
4. Кесян, А.З. Разработка условий для обеспечения развития и кроконсервации эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.З. Кесян. – М., 1993. – 17 с.
5. Оплодотворение ооцитов млекопитающих вне организма / Ю.Д. Клинский [и др.] // Сельское хозяйство за рубежом. – 1984. – № 3. – С. 49-53.
6. Маленко, Г.П. Получение ранних зародышей крупного рогатого скота при созревании и оплодотворении ооцитов вне организма // Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных: тез. докл. междунар. конф. – Боровск, 1980. – С. 127-128.
7. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* небольшим числом сперматозоидов с помощью их микроинъекции в перивителиновое пространство яйцеклетки / Г. Шведерски [и др.] // Биологические основы высокой продуктивности с.-х. животных: материалы междунар. конф. – Боровск, 1991. – С. 40-48.
8. Bedford, J.M. Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa // *Journal Agricultural Reproduction*. – 1968. – Vol. 18. – P. 125.
9. Chian, R. Cumulus cells act as sperm trap during *in vitro* fertilization of bovine oocytes / R. Chian, C. Park, M. Sirard // *Theriogenology*. – 1996. – P. 258.
10. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF) / S. Coskun [et al.] // *Theriogenology*. – 1991. – Vol. 36. – № 3. – P. 485-494.
11. Shellauder, K. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous coco serum / K. Shellauder, F. Fuhrer, B.G. Brachuutt // *Theriogenology*. – 1990. – Vol. 33. – № 1. – P. 477-485.
12. The influence of sperm-oocyte incubation time and breed of bull on *in vitro* embryo development in cattle / C. Sumatri [et al.] // *Theriogenology*. – 1996. – Vol. 45. – № 1. – P. 269.

УДК 636.2.033

## МЯСНАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ТЕЛЯТ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ

К.В. СИНЕВИЧ

С.А. ПЕТРУШКО, доктор сельскохозяйственных наук, профессор

Р.В. ЛОБАН, кандидат сельскохозяйственных наук

РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»

С.А. ГОРДЫНЕЦ

УП «БелНИКТИММП»

Реферат. Установлено, что по мясной продуктивности и качеству мяса помесные мен-анжу х лимузинские бычки, выращенные на подсосе до живой массы 160-170 кг, значительно превосходят аналогов чёрно-пёстрой породы, выращенных по технологии