

УДК 636.2.034:612.02

А.И. ГАНДЖА, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, И.В. КОСТИКОВА

ПОЛУЧЕНИЕ РАННИХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОНОСЛОЯ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТОК

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству»

Введение. Активное внедрение клеточных репродуктивных технологий в животноводство является приоритетным в экономической политике многих стран мира. Резкое снижение воспроизводительной функции высокопродуктивных молочных коров становится мировой проблемой, решение которой заключается в применении современных достижений биотехнологии репродукции, к которой относится и технология получения преимплантационных эмбрионов из созревших вне организма яйцеклеток. В настоящее время во многих лабораториях мира разработаны системы дозревания ооцитов из яичников убитых на мясокомбинате коров. Однако вне организма получать стабильный результат не представляется возможным в силу ряда причин, основной из которой является разнородность яичников убитых животных [1].

В условиях *in vivo* созревание ооцитов – это кульминация длительного периода их роста и развития в растущем фолликуле и короткий период мейотического созревания при овуляции. Спонтанное мейотическое созревание ооцитов в условиях *in vitro* обуславливается искусственным высвобождением последнего из ингибиторной среды фолликула [2, 3].

Более того, при созревании *in vivo* структурные элементы фолликулов обеспечивают многообразие биохимических и морфологических изменений, результатом которых является нормальное развитие и рост яйцеклеток, их дальнейшее оплодотворение и развитие. Моделирование условий созревания ооцитов коров на основе использования монослойных культур соматических клеток фолликула подразумевает, прежде всего, разработку оптимального состава сред, обеспечивающих полноценное созревание ооцитов и их развитие в эмбрионы после оплодотворения.

В частности, к соматическим клеткам относятся клетки кумулюса, играющие большую роль в обменных процессах ооцита, а также, бла-

годаря наличию гиалуроновой кислоты, способствующие процессу оплодотворения [4].

Многие авторы отмечают, что созревание ооцитов зависит не от размеров фолликулов и стадии цикла, а от клеточного окружения, целостности ооплазмы и стадии хроматина. Поэтому применение монослоя кумулюсных клеток увеличивает уровень дробления клеток до 71,0-80,0 %, выход морул-бластоцист – до 27,2-28,7 % [5, 6, 7, 8, 10].

На цитоплазматическое созревание ооцитов, как показали опыты на овцах, оказывают влияние клетки кумулюса и определенные гормоны. Кумулюс-интактные ооциты, культивировавшиеся *in vitro* в системе, содержащей ФСГ, ЛГ и эстрадиол 17 β , после пересадки реципиентам развились в 37 % случаев до бластоцисты [9]. Кроме того, существует тесная связь между типом кумулюса, окружающего ооцит и созреванием ооцита. Отсутствие кумулюсного окружения вызывает, как правило, дегенерацию клеток [11]. В то же время, при использовании монослоя клеток кумулюса или при использовании кондиционных сред наблюдалось значительное снижение признаков дегенерации [8].

Таким образом, при использовании монослойной культуры кумулюсных клеток возрастает процент дробления и оплодотворения ооцитов *in vitro*, тогда как без кумулюсных клеток развитие эмбрионов чаще всего блокируется на 6-10-клеточной стадии развития.

В связи с вышесказанным представляется актуальным выполнение исследований, направленных на поиск наиболее эффективных способов применения монослойных культур клеток кумулюса для культивирования эмбрионов животных.

Целью работы стало получение эмбрионов крупного рогатого скота вне организма на основе использования монослоя кумулюсных клеток.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Яичники убитых на мясокомбинате коров доставляли в лабораторию в среде Хенкса с добавлением антибиотиков при температуре 28-36 $^{\circ}$ C. Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли методом рассечения ткани яичника лезвием безопасной бритвы. Поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумулюсных комплексов проводили микроскопическим исследованием с использованием микроскопа МБС-10 при увеличении 16-56 крат. Для получения кумулюсных клеток отбирали ооцит-кумулюсные комплексы с многослойным компактным или слегка разрыхленным кумулюсом, плотно прилегающим к зоне пеллюциды, мелкозернистой или имеющей небольшие участки гранулярной конденсации ооплазмы, равномерно заполняющей про-

зрачную оболочку, которая равномерна по толщине, опалесцирует, не имеет никаких дефектов, округлая по форме. В опыте использовались ооцит-кумулюсные комплексы с компактным, рыхлым и частично отслоившимся кумулюсом, а также кумулюс, полученный из ооцитов на разных стадиях цитологического созревания. Кумулюсные клетки получали методом пипетирования ооцит-кумулюсных комплексов после их инкубации в 0,1 % растворе гиалуронидазы в течение 5-10 мин при температуре 37,5°C. Затем их переносили в чашки Петри, содержащие питательную среду, и помещали в CO₂ инкубатор на 24 ч. По истечении срока инкубирования в эту же чашку вносили свежевыведенные ооциты для созревания. Другим способом инкубирования ооцитов на монослое кумулюсных клеток было их сокультивирование с ооцитами в питательной среде, т. е. клетки кумулюса не отделялись от ооцита, а культивировались в виде комплекса. Созревание ооцитов проводилось при температуре 39°C во влажной среде, содержащей 5 % CO₂, под минеральным маслом в течение 24 ч. Эффективность применения монослоя кумулюсных клеток определяли по количеству созревших ооцитов, уровню дробления и выходу морул-бластоцист. Качественный состав монослоя определяли визуально, учитывая равномерность слоя, его толщину, поврежденность.

Результаты исследований и их обсуждение. Известно, что в процессе созревания ооцитов важную роль играют кумулюсные клетки. Поступление в ооциты питательных веществ, которые не могут синтезироваться в самом ооците, из окружающей среды осуществляется благодаря наличию щелевых контактов между цитоплазматическими отростками фолликулярных клеток, проходящих через прозрачную оболочку, и плазматической мембраной ооцита. Считается также, что они генерируют сигналы, обуславливающие развитие ядерного аппарата клетки и синтез структурных белков.

Проведённые исследования показали, что использование клеток кумулюса способствовало увеличению количества созревших ооцитов на 5,2-5,7 %, уровня дробления – на 14,0-14,6 % и выхода эмбрионов – на 13,8-12,5 % в зависимости от способа его получения по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Следует отметить, что уровень дробления при культивировании ооцит-кумулюсных комплексов был ниже на 0,6 % по сравнению с использованием монослоя кумулюса, полученного на сутки раньше, а выход эмбрионов на стадии морула-бластоциста был выше на 0,7 %.

Таблица 1

Эффективность использования клеток кумулюса при созревании ооцитов

Группы клеток	Кол-во ооцитов, поставленных на созревание	Созрело до метафазы II, п-%	Уровень дробления, п-%	Выход морул-бластоцист, п-%
Контроль (без кумулюса)	45	34-75,6	9-26,5	1-2,9
Ооциты с кумулюсом	52	42-80,8	17-40,5	7-16,7
Ооциты на монослое клеток кумулюса (через 24ч.)	48	39-81,3	16-41,1	6-15,4

При выделении ооцит-кумулюсных комплексов наблюдается значительное их разнообразие по морфологическим признакам. Для полноценного созревания ооцита и достижения им способности к оплодотворению и дальнейшему развитию необходимо полноценное протекание метаболических процессов, которое не возможно без наличия кумулюсных клеток. Влияние качества ооцит-кумулюсных комплексов на уровень созревания и выход морул-бластоцист показан в табл. 2.

Таблица 2

Влияние качества кумулюсных клеток на созревание ооцитов

Показатели	Кол-во ооцитов, п	Созревших до метафазы II, п-%	Уровень дробления, п-%	Морул-бластоцист, п-%
Компактный кумулюс	39	28-71,8	16-41,0	6-15,4
Рыхлый кумулюс	55	32-58,8	17-30,9	6-10,9
Ооциты + кл. кумулюса	51	37-72,5	21-41,2	8-15,7
Ооциты с частично отслоившимся кумулюсом	69	36-52,1	18-26,1	5-7,2

Установлено, что при сокультивировании ооцит-кумулюсных комплексов с плотным, компактным кумулюсом, а также при использовании предварительно полученного монослоя кумулюсных клеток выход созревших до стадии метафаза II ооцитов составил 71,8-72,5 %, что на 13,0-13,7 % выше по сравнению с клетками с рыхлым кумулюсом и на 19,7-20,4 % в сравнении с клетками с частично отслоившимся кумулюсом. Аналогичная зависимость наблюдается и по выходу морул-бластоцист – 15,4-15,7 % против 10,9-7,2 %, соответственно.

В дальнейших исследованиях мы выявили зависимость выхода полноценных эмбрионов от количественных и качественных показателей монослоя кумулюсных клеток. Использовали две группы ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК): ОКК 1 – ооциты с компактным куму-

люсом не менее 3-х слоев, ОКК 2 – ооциты с фрагментированным кумулюсом (менее 3-х слоев) (табл. 3).

Таблица 3

Эффективность культивирования ооцит-кумулюсных комплексов в зависимости от качественных показателей

Группы	Качество ооцитов	Количество ооцитов, n	Созрели до метафазы II, n-%	Кол-во морул-бластоцист, n-%
Контроль	ОКК 1	163	112-68,7	20-12,3
	ОКК2	141	81-57,4	15-10,6
Свежевыделенный кумулюс	ОКК 1	157	114-72,6	29-18,5
	ОКК2	164	104-63,4	26-15,8
Монослой кумулюса (через 24ч)	ОКК 1	159	112-70,4	28-17,6
	ОКК2	167	98-58,7	18-10,8

В качестве контроля ооциты сокультивировались вместе с кумулюсными клетками. Отдельно культивировались ооциты с компактным и фрагментированным кумулюсом.

Установлено, что культивирование ооцитов с компактным кумулюсом, как на монослое кумулюсных клеток, так и на свежевыделенном кумулюсе, приводило к увеличению уровня их созревания на 3,9-1,7 % по сравнению с контролем и на 6,2-5,3 % выхода преимплантационных эмбрионов, соответственно. Аналогичная зависимость наблюдается и при культивировании ооцит-кумулюсных комплексов с фрагментированным кумулюсом (63,4-58,7 % против 57,4 % выхода созревших ооцитов в контроле).

Таким образом, установлено, что увеличение количества кумулюсных клеток за счёт дополнительного их внесения в культуральную среду способствовало повышению выхода преимплантационных эмбрионов до 17,6-18,5 %.

Заключение. 1. Разработаны условия эффективного использования монослоя кумулюсных клеток, позволяющие получать 80,8-81,3 % созревших до стадии оплодотворения ооцитов при уровне дробления 40,5-41,2 %. Выход преимплантационных эмбрионов составил 16,7-18,5 % от числа созревших яйцеклеток.

2. Использование ооцит-кумулюсных комплексов с компактным кумулюсом, а также дополнительное введение кумулюсных клеток в систему созревания ооцитов позволяет получать не менее 15,4-15,7 % эмбрионов на преимплантационных стадиях при уровне дробления 41,0-41,2 %.

3. Установлено, что при использовании клеток с компактным многослойным кумулюсом по сравнению с ооцитами с фрагментированным кумулюсным слоем выход созревших до стадии оплодотворения

клеток увеличился на 9,2; 11,3 и 12,3 %, а выход морул-бластоцист – на 1,7; 2,7 и 6,8 % соответственно, в зависимости от системы дозревания.

Литература

1. Кузьмина, Т. И. Созревании яйцеклетки млекопитающих *in vitro* – базовый метод клеточных репродуктивных технологий (достижения, проблемы, перспективы) / Т. И. Кузьмина // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных : материалы 6-й Сеждунар. конф., 19-20 дек. 2006 г. / ВИЖ. – Дубровицы, 2006. – С. 108–113.
2. Сметанина, И. Г. Влияние некоторых экзогенных факторов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Сметанина И.Г. – Боровск, 2001. – 27 с.
3. Sutton, M. L. Effects of *in vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity / M. L. Sutton, R. B. Gilchrist, G. Thompson // *Human Reprod. Update*. – 2003. – Vol. 9, № 1. – P. 35-48.
4. Зубец, М. В. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / М. В. Зубец, В. П. Буркат. – К. : БМТ, 1997. – 702 с.
5. Pregnancies after coculture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes / K. Goto [et al.] // *J. Reprod. Fert.* – 1989. – Vol. 83, N 2. – P. 753-758.
6. Effect of cumulus cells during IVM on bovine early embryonic development / A. Bruynzue [et al.] // *Theriogenology*. – 1997. – Vol.47, № 1. – P. 32-37.
7. Influence of cumulus cells on *in vitro* maturation and fertilization of equine oocytes / M. B. Marcos [et al.] // *Theriogenology*. – 1996. – Vol. 1, N 1. – P. 263.
8. Игнатенко, Л. В. Использование кондиционных сред для культивирования ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота / Л. В. Игнатенко, Л. Д. Галиева, Б. Е. Свиридов // Актуальные проблемы биологии в животноводстве : тез. докл. – Боровск, 1995. – С. 182.
9. Завертяев, Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / Б. П. Завертяев. – М. : Агропромиздат, 1989. – 256 с.
10. Оплодотворение ооцитов млекопитающих вне организма / Ю. Д. Клинский [и др.] // *Сельское хозяйство за рубежом*. – 1984. – № 3. – С. 49-53.
11. Кабира, И. О. Культивирование и оплодотворение яйцеклеток *in vitro* / И. О. Кабира // Повышение эффективности продуктивных и племенных качеств сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. / ЛСХИ. – Л., 1990. – С. 17-21.