

Литература

1. Михайловская, А. К. Использование индекса племенной ценности для оценки быкопроизводящих коров / А. К. Михайловская, Ж. И. Шеметовец // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. Т. 32(начало). – Минск 1996. – С. 18-21.
2. Саянова, О. В. Повышение темпов генетического прогресса по продуктивности скота белорусской черно-пестрой породы путем оптимизации программы селекции : дисс. ... канд. с.-х. наук / Саянова О.В. – Жодино 2005. – 129 с.
3. Казаровец, Н. В. Совершенствование черно-пестрого скота на основе принципов крупномасштабной селекции / Н. В. Казаровец. – Горки 1998. – 262 с.
4. Kliewer, R. H. Characteristics and genetic impact of U.S. Holsteins / R. H. Kliewer // Holstein Sci. Rep. – 1978. – N 5. – P. 1-4.
5. Еременко, В. И. Компьютерное прогнозирование желательного типа телосложения и удоя коров бурых пород / В. И. Еременко, В. И. Обливанцов // Зоотехния. – 2007. – № 12. – С. 7-8.
6. Крупномасштабная селекция в животноводстве / Н. З. Басовский [и др.]. – Киев, 1994. – 374 с.
7. Буркат, В. П. Лінійна оцінка корів за типом / В. П. Буркат, Ю. П. Полупан, І. В. Йовенко. – Київ : Аграрна Наука, 2004. – 88 с.

(поступила 3.03.2008 г.)

УДК 636.2.034:612.02

И.В. КОСТИКОВА

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАННИХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОСЛОЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДА

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

Введение. В последние десятилетия значительно изменилось направление и ускорились темпы микроэволюционных процессов в популяциях сельскохозяйственных животных, особенно в связи с интенсификацией селекционной работы, направленной на выведение и совершенствование пород, отвечающих экономическим, промышленным и эстетическим требованиям человека. Ускорение темпов селекции в скотоводстве можно обеспечить только применением современных биотехнологических методов воспроизводства, основанных на использовании клеточных репродуктивных технологий, которые активно внедряются в животноводство в последние годы. Одной из них является созревание и оплодотворение яйцеклеток *in vitro*, посредством которой может быть увеличен выход потомков от выдающихся самок. Моделирование систем дозревания ооцита – одна из важнейших задач, стоящих перед эмбриотехнологами. Известно, что реинициация мейоза

в ооците происходит в результате его извлечения из фолликула, однако этого не всегда достаточно для полноценного формирования яйцеклетки и приобретения ею способности к оплодотворению и дальнейшему развитию [1].

Одним из способов достижения синхронности созревания яйцеклетки, заключающейся в мейотическом преобразовании ядра, цитоплазматических изменениях и преобразовании мембран, является разработка культуральных систем, достаточно близких по своему биологическому составу к естественным условиям созревания и оплодотворения яйцеклеток и развития ранних зародышей крупного рогатого скота [2].

Часто при культивировании преимплантационных эмбрионов многие исследователи сталкиваются с клеточным блоком, когда развитие эмбриона останавливается на стадии 8-16 клеток. Созревание ооцитов и развитие эмбрионов вне организма находится в прямой зависимости от адекватности физиологическому процессу условий их культивирования. В настоящее время для преодоления блока используют соматические клетки, в частности, эпителиальные клетки яичевода, клетки кумулюса, гранулезные клетки. Из этих клеток получают монослой, который используется для культивирования преимплантационных эмбрионов [3]. «Поддерживающие» культуры могут создавать благоприятный для развития зародышей сигнально-информационный фон путем продукции ростовых факторов. Например, монослойные культуры эпителиальных клеток яичевода продуцируют простагландин E2, простагландин F2 альфа и эндотелин-1 [4]. Некоторые исследователи считают [5], что только данная система более полно отражает потребности зародышей крупного рогатого скота и позволяет получать наиболее полноценные эмбрионы. Применение сокультуральной системы не требует особого газового режима, что позволяет использовать моногазовый инкубатор. К числу недостатков относится трудоемкость препарирования культуры.

В течение последних лет в научной литературе появились лишь отдельные работы, в которых изучалось влияние культивируемых клеток яичевода или продуцируемых ими кондиционированных сред на развитие эмбрионов крупного рогатого скота. При этом подчеркивается вариабельность результативности эффектов совместного культивирования с эмбрионами, которая может быть обусловлена разнокачественностью различных культур клеток яичевода [6].

В связи с вышесказанным, целью работы явилась разработка способа получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма с использованием монослоя эпителиальных клеток яичевода.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Науч-

но-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Яичники и яйцеводы убитых на мясокомбинате коров доставляли в лабораторию в среде Хенкса с добавлением антибиотиков при температуре 28-36°C. В лаборатории яйцеводы освобождали от соединительной ткани и яичников. Затем их промывали несколько раз в свежих порциях среды Хенкса с антибиотиками.

При разработке способа учитывались технология выделения клеток яйцевода, степень формирования монослоя и эффективность применения монослоя клеток яйцевода определяемая по количеству созревших ооцитов, уровню дробления и выходу морул-бластоцист в среде ТС-199 с добавлением ФСГ, ЛГ и FSG-p. Качественный состав монослоя определяли визуально, учитывая равномерность слоя, его толщину, поврежденность, а также время его формирования. Количество клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева.

Монослой клеток яйцевода получали двумя способами:

1. Яйцевод заполняли 0,05%-ным раствором трипсина, предварительно зажав его концы зажимами. Затем на 20 мин яйцевод помещали в CO₂-инкубатор при 38,5°C и 5 % CO₂ в воздухе. По истечении времени инкубации яйцевод промывали непосредственно в пробирки и центрифугировали клетки три раза по 5 минут при 1000 оборотов в минуту. Осадок ресуспендировали небольшим количеством рабочего раствора и гомогенизировали пипетированием. Дважды центрифугировали с физиологическим раствором с гентамицином, а последний раз – отмывали в среде для созревания ооцитов ТС-199.

2. Клетки яйцевода получали путем выдавливания пинцетом в направлении от ампулярной части яйцевода к истмусу. Полученный материал гомогенизировали физиологическим раствором с добавлением антибиотиков методом ресуспендирования. Затем клетки подвергли центрифугированию аналогично первому способу.

Через 24-48 часов в чашках, куда высевали клетки яйцевода, образуется много активно передвигающихся пузырьков, которые отбирались и высевались в чашки для культивирования эмбрионов, т. к. эти пузырьки в дальнейшем и образуют монослой клеток яйцевода. Чашки с выделенными клетками культивировали с рабочей средой в инкубаторе при 38,5°C и 5 % CO₂ в воздухе. Смену среды проводили через каждые 48 часов и с помощью микроскопа проводили визуальную оценку степени разрастания слоя. При образовании 100 % монослоя клеток яйцевода на него помещали ооцит-кумуляные комплексы для созревания, а также эмбрионы крупного рогатого скота после оплодотворения. Ооцит-кумуляные комплексы получали методом рассечения ткани яичника лезвием безопасной бритвы. Поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумуляных комплексов

проводили микроскопическим исследованием. Затем их помещали в чашки Петри, содержащие монослой клеток яйцевода, сменив при этом рабочую среду, и ставили в CO₂-инкубатор на 24 часа для созревания при соблюдении вышеуказанных физических параметров. После оплодотворения зиготы также помещались на монослой клеток яйцевода, их инкубирование проходило в инкубаторе в течение 7-10 суток.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Одним из важных показателей при использовании монослоя клеток яйцевода является степень формирования монослоя. Считается, что он должен покрывать не менее 70 % поверхности культуральной чашки. При этом важным показателем является время, необходимое для формирования нужного количества монослоя (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты формирования монослоя эпителиальными клетками яйцевода в зависимости от способа выделения через 6-7 суток культивирования

Способ выделения эпителиальных клеток	Формирование монослоя (%)	
	При культивировании всей выделенной массы	При культивировании плавающих пузырьков
Сдавливание	30	40
Трипсинизация	70	100

Полученные результаты показали, что эпителиальные клетки яйцевода формируют в культуре монослой независимо от способа их выделения. Однако наиболее активно монослой образовывали клетки, полученные методом трипсинизации с последующим отбором активно передвигающихся пузырьков. Монослой (100 %) такие клетки образовывали через 6-7 дней. В случае, когда культивировалась вся полученная после трипсинизации клеточная масса, в такой же период времени было получено 70 % монослоя. Наименьшую популяцию образовывали клетки, полученные после механического сдавливания яйцевода и использования всей выделенной массы (30-40 % через 6-7 дней). Следует отметить, что в последнем случае 100 % монослой формировался к 10-14 дню культивирования.

При получении монослоя методом сдавливания количество клеток, поставленных на длительное культивирование, составило $1,1 \times 10^6$ кл. в 1 мл, при использовании метода трипсинизации – $2,7 \times 10^6$ кл./мл.

Таким образом, при получении монослоя эпителиальных клеток яйцевода предпочтительнее использовать формирующиеся через 24 часа активно передвигающиеся пузырьки, а отделение клеток проводить методом трипсинизации.

В дальнейшем выявлена зависимость выхода полноценных эмбрионов от качественных и количественных показателей монослоя клеток яйцевода (таблица 2).

Таблица 2 – Выход зародышей в зависимости от способа получения эпителиальных клеток яйцевода

Способ выделения эпителиальных клеток	Количество ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
Сдавливание	85	39-45,9	13-15,3
Трипсинизация	74	32-40,5	14-18,9

При использовании монослоя клеток, полученных методом сдавливания, уровень дробления зародышей составил 45,9 % от числа поставленных на культивирование (lim 12,5-57,1 %), при этом было получено 13 зародышей на стадии морула-бластоциста, или 15,3 % от числа клеток поставленных на созревание. При использовании монослоя клеток яйцевода, полученного методом трипсинизации, количество дробящихся клеток уменьшилось на 5,4 % (lim 25,0-50,0 %) по сравнению с предыдущим опытом, однако выход морул-бластоцист увеличился на 3,6 %. Кроме того, при использовании монослоя клеток, полученных методом трипсинизации, амплитуда колебаний показателя уровня дробления была значительно ниже, чем при использовании монослоя, полученного методом сдавливания.

Для продолжительной культуры клеток яйцевода использовали среду TC-199 с добавлением в качестве биологически-активного компонента фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов (Sigma) и FSG-p (США). В первом случае на созревание было поставлено 94 клетки, из них 52 оплодотворилось, что составило 55,3 % от числа поставленных на культивирование. Было получено 16 эмбрионов на стадии морула-бластоциста, что составило 17,0 % от числа оплодотворенных. Использование FSG-p привело к снижению уровня дробления на 13,8 % по сравнению с предыдущим опытом, и при этом выход эмбрионов на преимплантационной стадии составил 14,6 % (таблица 3).

Таким образом, для продолжительной культуры клеток яйцевода лучше использовать среду TC-199 с добавлением ФСГ и ЛГ производства фирмы Sigma, т. к. выход эмбрионов на преимплантационных стадиях был выше на 2,4 %.

Таблица 3 – Развитие эмбрионов крупного рогатого скота в различных культуральных системах с использованием монослоя эпителиальных клеток яйцевода

Состав среды	Количество ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
ТС-199+ ЛГ + ФСГ	94	52–55,3	16–17,0
ТС-199 + FSG-p	41	17–41,5	6–14,6

Закключение. Использование монослоя клеток яйцевода при получении эмбрионов крупного рогатого скота вне организма позволяет получать 15,3-18,9 % эмбрионов на преимплантационных стадиях.

При получении монослоя клеток яйцевода методом трипсинизации используются формирующиеся через 24 часа после постановки на культивирование активно передвигающиеся пузырьки, что позволяет уже через 6-7 суток, в отличие от метода выдавливания, получать 100%-ный монослой. При этом количество клеток составляет $2,7 \times 10^6$ кл./мл., выход морул-бластоцист – 18,9 %.

Продолжительную культуру клеток яйцевода получали на среде ТС-199 с добавлением ФСГ и ЛГ производства фирмы Sigma, что позволило достигнуть уровня дробления 55,3 % и выхода морул-бластоцист на преимплантационных стадиях 17,0 %.

Разработан способ получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма с использованием монослоя эпителиальных клеток яйцевода, позволяющий получать 17,0-18,9 % эмбрионов на преимплантационных стадиях.

Литература

1. Кузьмина, Т. И. Созревание яйцеклетки млекопитающих *in vitro* – базовый метод клетродуктивных технологий (достижения, проблемы, перспективы) / Т. И. Кузьмина // Современные достижения и проблемы Биотехнологии с.-х. животных : тез. докл. 6-ой междунар. конф. (19-20 дек. 2006 г.) / ВИЖ. – Дубровицы, 2006. – С. 108-113.
2. Зубец, М. В. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / М. В. Зубец, В. П. Буркат. – Киев : «БМТ», 1997. – 702 с.
3. Культивирование созревших и оплодотворенных *in vitro* ооцитов в средах с клетками воспроизводительного тракта / Н. И. Смылова [и др.] // Доклады Россельхозакадемии. – 1999. – № 2. – С. 47-49.
4. Wijayagunawardane, M. P. Prostaglandin E2, prostaglandin F2 alpha and endothelin-1 production by cow oviductal epithelial cell monolayers: effect of progesterone, estradiol 17 beta, oxytocin and luteinizing hormone / M. P. Wijayagunawardane, A. Miyamoto, A. Sato // Theriogenology. – 1999. – Vol. 52. – P. 791-801.
5. Сингина, Г. Н. Исследования развития эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* / Г. Н. Сингина, О. Л. Шатайло // Современные достижения и проблемы Биотехнологии с.-х. животных : тез. докл. 6-ой междунар. конф. (19-20 дек. 2006 г.) / ВИЖ. – Дубровицы, 2006. – С. 90-92.
6. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos cocultured with bovine oviductal epithelial cells obtained from oviducts ipsilateral to cystic follicles / H. Kamishita [et

УДК 636.2.034:612.6.02

В.В. КОЧЕТКОВ

ЭМБРИОПРОДУКТИВНОСТЬ КОРОВ-ДОНОРОВ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА

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

Введение. Высокопродуктивный молочный скот, как правило, наиболее подвержен различного рода заболеваниям. В их числе лидирующее положение занимают болезни половых органов и вымени (до 70 %), вследствие которых животные могут выбраковываться. Положение усугубляется также тем, что животные с высокой молочной продуктивностью попадают в группу быкопроизводящих коров, а особенно ценные выступают в качестве доноров эмбрионов.

Вместе с тем, технологией трансплантации зародышей крупного рогатого скота предусматривается проведение работ только со здоровым генетически ценным скотом. Однако очень часто (в 50-60 % случаев) возникает необходимость в нормализации воспроизводительной функции коров и в последующем их использовании в качестве доноров эмбрионов. Кроме этого, выбраковка животных по различным производственным причинам не всегда соизмерима с их племенной ценностью. При практически стабильной ежегодной замене 25-30 % поголовья скота племязаводов до 10-15 % бракуемых животных – ценный в племенном отношении скот, способный после определенной подготовки служить донорами зародышей [1].

Применение различных средств оздоровления полости матки доноров позволяет увеличить выход качественных эмбрионов на 11,5-19 % [3]. Интенсивная ее терапия специальными средствами (йодосол и др.), различными комбинациями антибиотиков и внутриматочными смесями в сочетании с массажем, как правило, приводит к выздоровлению животного после 3-5-х процедур. Отсутствие лечебного эффекта и получение неоплодотворенных яйцеклеток свидетельствует о необратимости патологических процессов, протекающих в эндометрии [2]. Такие коровы в большинстве случаев лечению не подлежат и выбраковываются.