

А.И. ГАНДЖА¹, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, В.П. СИМОНЕНКО¹,
И.В. КИРИЛЛОВА¹, И.И. КОНЕВА², О.В. КВИТКО², Я.И. ШЕЙКО²

ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОСЛОЯ КЛЕТОК ГРАНУЛЁЗЫ

¹РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

²ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук
Беларуси»

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. Однако достижения репродуктивной биотехнологии на основе производства эмбрионов *in vitro* во многом еще не реализованы в практике племенного дела и селекции сельскохозяйственных животных, т. к. выход биологически полноценных зародышей, достигших стадии бластоцисты и пригодных для трансплантации реципиентам, недостаточно высок и не стабилен. Моделирование систем дозревания ооцита – одна из важнейших задач, стоящих перед эмбриотехнологами. Это обуславливается рядом объективных и субъективных причин, связанных с интенсивным ведением отрасли животноводства.

Созревание ооцитов и развитие эмбрионов вне организма находится в прямой зависимости от адекватности физиологическому процессу условий их культивирования. Клетки гранулёзы, окружающие ооциты в фолликулах яичников, играют важную роль в создании условий, требуемых для развития фолликулов, овуляции, оплодотворения, развития и имплантации эмбрионов [1]. Они не только принимают участие в синтезе эстрадиола, но и способствуют капацитации спермы, акросомной реакции и пенетрации сперматозоидами зоны пеллюцида. Только в присутствии фолликулярных клеток происходит образование пирувата, который, в свою очередь, влияет на созревание ооцитов и необходим для роста эмбриона, а также первого и второго деления. Фолликулярная жидкость содержит большое число ростовых факторов,

которые вовлекаются в процессы раннего эмбрионального развития, а её присутствие в среде капацитации создаёт тот биохимический фон, который содействует синхронному дроблению и успешному развитию эмбрионов.

Большинство исследователей используют клетки гранулёзы для преодоления блока дробления при культивировании *in vitro*. В то же время, установлен эффект положительного влияния гранулёзы на созревание вне организма ооцитов коров, хотя при этом возникает риск увеличения количества гамет с нарушением хромосомного аппарата. Причиной этого явления может быть нарушение гормонального баланса, так как нет возможности при культивировании учитывать количество клеток, окружающих ооцит, а они, как и те, что добавляют в культуральную среду, являются продуцентами стероидных гормонов.

Клеточная гибель именно клеток кумулюса (той части фолликулярных гранулёзных клеток, которые непосредственно окружают яйцеклетку), а не яйцеклеток, негативно коррелирует с компетентностью ооцитов к развитию [2]. Позитивное влияние гепарин-связывающего ростового дифференцировочного фактора на продукцию эмбрионов обусловлено ингибированием апоптоза клеток гранулёзы, что свидетельствует о том, что защита гранулёзных клеток от гибели обеспечивает лучшую продукцию растворимых факторов, стимулирующих эмбриональное развитие. В свете этих данных получает объяснение то, что воздействия, улучшающие выход эмбрионов на стадии бластоцисты, опосредованы благоприятными эффектами на клетки гранулёзы, включая клетки кумулюса [3, 4].

Исходя из вышесказанного, нами были проведены исследования, направленные на поиск наиболее эффективных способов культивирования эмбрионов животных с использованием монослойной культуры клеток гранулёзы, а также определены закономерности роста, развития и гибели последних в монослойных культурах.

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

Ооцит-кумулюсные комплексы получали методом рассечения лезвием безопасной бритвы ткани яичников убитых на мясокомбинате коров, доставленных в лабораторию в среде Хенкса с добавлением антибиотиков. Поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумулюсных комплексов проводили микроскопическим исследованием. Клетки гранулёзы получали из антральных фолликулов, отсасывая фолликулярную жидкость шприцом. Затем методом центри-

фугирования и ресуспендирования трижды отмывали клетки гранулёзы средой для культивирования (2000 об./мин. по 10 мин.) и помещали в чашку Петри для образования монослоя. Чашки с клетками помещали в CO₂ инкубатор на 24 часа для созревания в присутствии 5 % углекислого газа, повышенной влажности и температуре 38,5°C. Перед культивированием подсчитывали количество клеток с помощью камеры Горяева. Через 7, 24 и 168 часов на образовавшийся монослой помещали ооцит-кумулясные комплексы (ОКК), сменив при этом рабочую среду, и ставили их для дальнейшего созревания в CO₂ инкубатор при наблюдении вышеуказанных физических параметров. Кроме того, на созревший монослой клеток гранулёзы помещали яйцеклетки после процедуры оплодотворения. Вместе с ОКК добавляли фолликулярную жидкость, т. к. содержащиеся в ней вещества ингибируют апоптоз клеток и стимулируют их пролиферацию. После оплодотворения зиготы также помещались на монослой клеток гранулёзы, их инкубирование проходило в инкубаторе в течение 7-10 суток. Созревание ооцитов, их оплодотворение и развитие эмбрионов до преимплантационных стадий проводили по разработанной ранее в лаборатории методике. Эффективность применения монослоя клеток гранулёзы определяли по количеству созревших ооцитов, уровню дробления и выходу морул-бластоцист. Качественный состав монослоя определяли визуально, учитывая равномерность слоя, его толщину, повреждённость.

Для изучения процессов дифференцировки, пролиферации и гибели клеток их суспензия помещалась в сосуд Карреля. После добавления CO₂ (5 % объёма) с помощью шприца сосуд Карреля герметически закупоривался резиновой пробкой и помещался в термостатируемую камеру инвертированного микроскопа. Непрерывная компьютерная видеозапись выбранного участка клеточной культуры выполнялась в течение всего срока культивирования клеток. Видеосъёмка живых клеток происходила с частотой 1 кадр в минуту. В опытах по количественному анализу процессов дифференцировки, пролиферации и клеточной гибели в сосуды Карреля помещали специально изготовленные стеклянные вкладыши, которые имеют размеры 25 x 10 x 1 мм и разделены на квадратные (1x1 мм) ростовые участки бороздками шириной 0,2 мм и глубиной 0,05 мм (бороздки препятствуют перемещению клеток из одного квадрата в другой, что обеспечивает удобство микроскопического анализа в динамике роста субкультур). Через различные периоды (дни – недели) культивирования живые клеточные культуры количественно анализировались при помощи инвертированного микроскопа. Для исключения влияния вариации между разными квадратными участками ростовой поверхности на результат количественного анализа во все сроки подсчёт клеток проводился в одних и тех же участках.

Результаты эксперимента и их обсуждение. В условиях *in vivo* созревание ооцитов – это кульминация длительного периода их роста и развития в растущем фолликуле и короткий период мейотического созревания при овуляции. При этом структурные элементы фолликулов обеспечивают многообразие биохимических и морфологических изменений, результатом которых является нормальное развитие и рост яйцеклеток, их дальнейшее оплодотворение и развитие. Моделирование процесса дозревания ооцитов в культуральных средах с клеточными элементами фолликула, в частности, клетками гранулёзы, позволяет не только достигнуть полноценного созревания ооцитов, но и сохранить их способность к развитию до эмбриона на стадии морула-бластоциста после оплодотворения, а также полный потенциал к развитию после пересадки. Исследованиями ряда авторов доказана способность фолликулярных клеток секретировать соматотропный гормон роста и инсулиноподобный фактор роста I, которые, в свою очередь, могут играть роль внутриовариальных паракринных и аутокринных факторов. Кроме того, одной из важнейших функций гранулёзных клеток является из стероидогенная активность. Считается, что стероиды, в том числе и эстрадиол, стимулируют полноценное созревание ооцитов, способствуя синтезу ряда факторов, ответственных за оплодотворение. По-видимому, «поддерживающие» монослойные культуры путём продукции ростовых факторов, а также посредством межклеточных контактов создают благоприятный для развития зародышей сигнально-информационный фон.

Изучение эффективности применения монослоя гранулёзных клеток, полученных из фолликулов разного диаметра, показало, что выход дробящихся зародышей при использовании клеток гранулёзы из фолликулов диаметром 3-6 мм был выше по сравнению с контрольной группой на 12,2 % и составил 64,2 % от числа поставленных на культивирование. В то же время, при использовании монослоя клеток гранулёзы из фолликулов диаметром более 10 мм этот показатель был значительно ниже и составил всего 40,7 %, что на 23,5 % ниже по сравнению с предыдущей группой и на 11,3 % по сравнению с контролем. Выход преимплантационных эмбрионов при культивировании с использованием монослоя клеток гранулёзы из фолликулов диаметром 3-6 мм составил 17,3 %, причём морул было получено 9, или 11,1 % от числа поставленных на культивирование, а бластоцист – 5 (6,2 %). Уровень трансформации морул в бластоцисты составил 35,7 %. Во II группе было получено 10 морул, что составило 11,6 % от числа оплодотворенных ооцитов, бластоцист не получено.

Для выявления зависимости выхода полноценных эмбрионов от качественных и количественных показателей монослоя клеток гранулёзы было прокультивировано 235 ооцитов со свежeweделенными клетками

гранулёзы, 139 – на монослой клеток гранулёзы через 7 часов созревания, 57 – на монослой клеток гранулёзы через 24 часа созревания и 59 – при использовании гранулёзы через 7 дней после созревания (таблица 1). В качестве контроля использовались системы культивирования без клеток гранулёзы.

Таблица 1 – Зависимость выхода эмбрионов от качественных и количественных показателей монослоя клеток гранулёзы.

Условия посадки яйцеклеток на монослой	Процент покрытия поверхности лунки, %	Кол-во оплодотворенных ооцитов, n	Уровень дробления, n%	Выход преимплантационных эмбрионов, n%
Свежевыделенные клетки гранулёзы	Отдельные скопления клеток	235	126-53,6	30-12,8
Монослой через 7 часов после выделения	70	139	72-51,8	24-17,2
Монослой через 24 часа после выделения	100	57	31-54,4	11-19,2
Гранулёза после 168 часов хранения при t+5°C	100	59	30-50,8	10-16,9
Контроль	–	75	39-52,0	11-14,6

Результаты исследований показали, что при использовании созревшего в течение 24 ч монослоя клеток гранулёзы было получено 19,2 % преимплантационных эмбрионов при уровне дробления 54,4 %, что превышало аналогичные показатели в контрольной группе 4,6 и 2,4 %. Наиболее низкий показатель выхода эмбрионов был получен при использовании свежевыделенных клеток гранулёзы – 12,8 %. Использование монослоя гранулёзы через 168 часов хранения при t +5°C позволило получить 16,9 % морул-бластоцист при уровне дробления 50,8 %.

Уровень дробления и выход преимплантационных эмбрионов в зависимости от качества используемого монослоя представлены в таблице 2. При использовании суспензии уровень дробления ооцитов составил всего 26,3 %, что почти в два раза ниже по сравнению с группой, культивировавшейся на сформированном монослое клеток гранулёзы. Выход преимплантационных эмбрионов также в этой группе был ниже по сравнению с аналогичным показателем другой группы на 4,8%. Однако при использовании монослоя клеток гранулёзы бласто-

цист получено не было, в то время как при использовании суспензии было получено 2 бластоцисты, и уровень трансформации морул в бластоцисты составил 12,5 %.

Таблица 2 – Выход преимплантационных эмбрионов при использовании сформированного и суспензии клеток гранулёзы.

Клетки гранулёзы	Количество ооцитов, n	Уровень дробления, n – %	Выход Мо, n – %	Выход В1, n – %	Уровень трансформации, %
Суспензия	118	31–26,3	14–11,8	2–1,7	12,5
Монослой	87	44–50,6	16–18,4	–	–

Изучение процессов пролиферации в монослое клеток гранулёзы проводились в лаборатории моделирования клеточных процессов ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси». Фолликулярную жидкость с клетками гранулёзы получали посредством аспирации фолликулов с помощью шприца и делили на две фракции. Первую фракцию без предварительной отмывки клеток от фолликулярной жидкости добавляли во флакон с культуральной средой, герметически закупоривали резиновой пробкой и помещали в термостат (37°C). Клетки из второй фракции трижды отмывали от фолликулярной жидкости (ресуспендировали осадок клеток в растворе Хэнкса и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут), переносили в культуральный флакон и после добавления CO₂ помещали в термостат (37°C). После первого дня культивирования во всех шести культурах клетки прикрепились к ростовому субстрату и начали распластываться. После следующего дня культивирования количество распластанных клеток увеличилось во всех культурах (приблизительно одинаково). Таким образом, было обнаружено, что при посеве клеток в культуральную среду без их отделения от фолликулярной жидкости, содержащей факторы, препятствующие клеточной гибели (апоптозу), образуется активно пролиферирующая клеточная культура без апоптотической гибели отдельных клеток.

Для получения долговременной культуры клетки диспергировали в 1 мл ростовой среды и дополнительно добавили третью часть (0,5 мл) фолликулярной жидкости, стерилизованной фильтрацией через бактериальный фильтр. Добавив 5 % CO₂, поместили флаконы с клетками в термостат (37°C). В дальнейшем анализировали клеточные культуры с помощью компьютерной видеосъёмки. Было обнаружено, что добавление фолликулярной жидкости к культуральной среде, по сравнению

со стандартной средой, обеспечивает интенсивную пролиферацию клеток и возможность их продолжительного культивирования без признаков клеточного старения. Так, в течение первых 10 дней культивирования при исходном добавлении к среде трети фолликулярной жидкости образовался густой клеточный монослой, который сохранялся в течение 40 дней наблюдения и, по-видимому, может поддерживаться в дальнейшем. В то же время, без применения фолликулярной жидкости клетки сначала размножаются, но затем быстро стареют, и в них наблюдаются в основном крупные неделящиеся клетки (рис. 1-4).

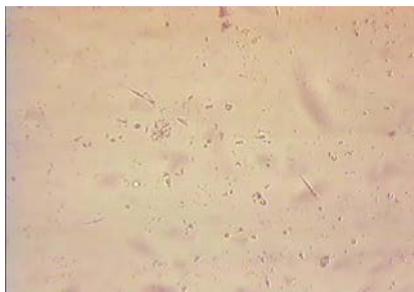


Рис. 1 – Культура клеток гранулёзы после 2 дней культивирования

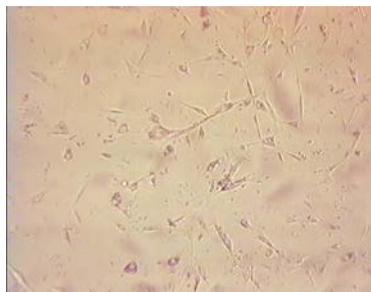


Рис. 2 – Культура клеток гранулёзы после 6 дней культивирования

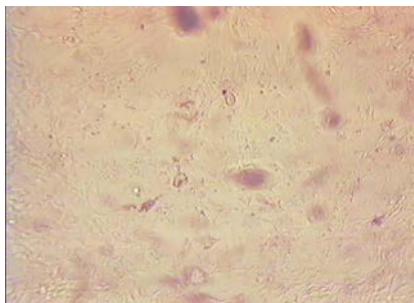


Рис. 3 – Культура клеток гранулёзы после 10 дней культивирования

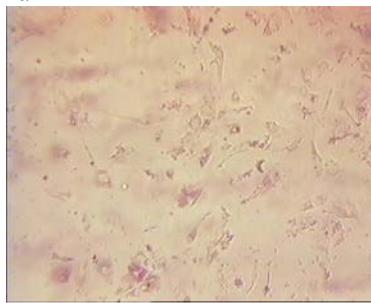


Рис. 4 – Культура клеток гранулёзы без добавления фолликулярной жидкости к культуральной среде после 13 дней культивирования

Особенно интересно, что фолликулярная жидкость оказалась эффективной не только при её исходном добавлении в культуральную среду. Добавление одной трети фолликулярной жидкости обеспечивало ярко выраженный омолаживающий эффект и последующих 8 дней после смены культуральной среды с добавлением третьей части фол-

ликулярной жидкости. После добавления третьей части фолликулярной жидкости к культуре клеток, культивировавшейся в течение 13 дней без неё, по истечении 13 дней культивирования без неё и в течение последующих 8 дней культивирования число клеток значительно увеличилось. На компьютерных видеозаписях было обнаружено много митотических делений, причём в деление вступали не только мелкие, но и крупные постаревшие клетки. В дальнейшем (наблюдение до 40 дней) в данную культуру при еженедельной смене среды добавляли 10% фолликулярной жидкости. В течение этого срока в культуре увеличилось количество густых монослойных участков, состоящих в основном из мелких клеток, хотя были также отдельные крупные постаревшие клетки.

Заключение. Разработаны условия использования монослоя клеток гранулёзы в технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма, позволяющие получать 18,4-19,2 % эмбрионов на преимплантационных стадиях.

Использование сформированного монослоя клеток гранулёзы позволяет получать 18,4 % эмбрионов, пригодных к пересадке, в то время как при использовании свежевыделенных клеток этот показатель составляет всего лишь 12,8 %.

Использование гранулёзных клеток из антральных фолликулов диаметром 3-6 мм приводило к получению 17,3 % преимплантационных эмбрионов при уровне дробления 64,2 %. При этом уровень трансформации морул в бластоцисты составил 35,7 %, что превысило аналогичный показатель в контроле на 15,7 %.

Для получения долговременной культуры клеток гранулёзы фолликулов яичника крупного рогатого скота целесообразно добавление в среду для культивирования фолликулярной жидкости, стерилизуемой фильтрацией, в сочетании с предпосевной обработкой клеток концентрированным раствором подобранной комбинации антибактериальных и антимикотических антибиотиков.

Литература

1. Basis of Voltage-Dependent Potassium Currents in Porcine Granulosa Cells / D. E. Mason [et al.] // *Mol. Molecular Pharmacol.* – 2002. – Vol. 61. – P. 201-213.
2. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence / Y. Q. Yuan [et al.] // *Theriogenology.* – 2005. – Vol. 63(8). – P. 2147-2163.
3. Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the developmental competence of bovine oocytes during in vitro maturation period are promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects / S. Ikeda [et al.] // *Reproduction.* – 2006 – Vol. 132. – P. 549-557.
4. Gutierrez, C. G. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics / C. G. Gutierrez, B. K. Campbell, R. Webb // *Biology of*

УДК 636.2.034.612.602

А.И. ГАНДЖА¹, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, В.П. СИМОНЕНКО¹,
И.В. КИРИЛЛОВА¹, Е.С. ЛОБАНОК², В.П. НИКОЛЬСКАЯ²

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ УСЛОВИЙ РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫШЕЙ КОРОВ ВНЕ ОРГАНИЗМА

¹РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной
академии наук Беларуси»

Введение. В настоящее время снижение фертильности молочных высокопродуктивных коров становится мировой проблемой, для решения которой привлекаются современные достижения биотехнологии репродукции, разрабатываются специальные программы для так называемых «проблемных» животных. Одним из направлений клеточных репродуктивных технологий является получение эмбрионов крупного рогатого скота вне организма матери. Следует отметить, что, несмотря на многочисленные попытки моделирования систем дозревания и оплодотворения ооцитов *in vitro*, культивирования ранних зародышей с целью стандартизации методики и приведения её к коммерциализации, добиться стабильного получения результатов не удалось. Одним из нерешённых вопросов в настоящее время является создание условий для культивирования ранних зародышей, полученных в результате оплодотворения созревших вне организма ооцитов.

Функциональная неполноценность эмбрионов в условиях культивирования неразрывно связана с изменением метаболического и энергетического потенциала их клеток. Реализуясь на молекулярном уровне, она определяет характер и особенности реагирования последних на внешний сигнал. Метаболические процессы кардинальным образом изменяются в течение эмбрионального развития вследствие активации генома, интенсификации синтеза белка, анаболических и других процессов [1]. Поэтому исследование активности ключевых ферментов и структурно-функционального состояния биологических комплексов, стоящих на узловых этапах метаболизма эмбриональных клеток, приобретает особую значимость, а разработка параметров, отра-