

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-

жающих потенциал развития эмбрионов, крайне актуальна.

Энергетический статус преимплантационных эмбрионов млекопитающих – фактор, определяющий их дальнейшее развитие. Многие аспекты регуляции систем энергообеспечения в клетках ранних зародышей, в частности, внутриклеточные сигналы, определяющие соотношение гликолиза и окислительного фосфорилирования, пока не ясны. Поскольку энергетический метаболизм ооцитов и ранних преимплантационных эмбрионов предопределяет потенциал их развития, по интенсивности синтеза основного «аккумулятора» энергии – аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и его внутриклеточному содержанию – можно судить о характере происходящих в эмбриональных клетках функциональных сдвигов [4].

Для определения эффективности развития эмбрионов крупного рогатого скота в условиях *in vitro* необходимо исследовать активность ферментов и других биохимических комплексов, стоящих на узловых этапах метаболизма эмбриональных клеток, в частности, состояние митохондрий, энергетический статус, метаболизм глюкозы, внутриклеточное содержание АТФ и эндогенных порфиринов.

Исходя из вышесказанного, целью наших исследований явилось усовершенствование условий развития зародышей вне организма, изучение метаболических критериев оценки жизнеспособности зародышей крупного рогатого скота на разных этапах его развития.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» и лаборатории биофизики и инженерии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси».

Выделение ооцитов осуществляли из яичников убитых на мясокомбинате коров, а их созревание – путём культивирования вне организма в условиях CO₂-инкубатора. Оплодотворялись ооциты заморожено-оттаянной спермой быка после проведения процедуры капацитации. Для культивирования ранних зародышей использовали среду для созревания на основе среды ТС-199 с добавлением эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. В качестве источника естественных факторов роста использовали монослои кумулюса и яйцевода. Использовали два способа получения монослоя кумулюсных клеток. В первом случае ооциты сокультивировали на монослое кумулюсных клеток (1-й опыт). Во втором – кумулюсные клетки получали методом пипетирования и затем в течение 24 ч получали монослой клеток, на который помещали свежeweделенные ооциты (2-й опыт). В качестве контроля использовались ооциты без кумулюса. Получение клеток яйцевода проводили двумя способами. В первом случае яйцеводы сдавливали

пинцетом в направлении от ампуляторной части яйцевода к истмусу, затем промывали при помощи физиологического раствора без Ca^{++} и Mg^{++} . Полученное содержимое центрифугировали, а осадок дезагрегировали в том же растворе многократно с помощью пипетки. Во втором опыте на конец яйцевода, противоположный ампулярному, накладывали лигатуру. В просвет добавляли 0,05%-ный раствор трипсина и перетягивали второй конец. Затем промывали непосредственно в пробирке 10-ю мл рабочей среды и центрифугировали. При образовании 100%-го монослоя клеток яйцевода на него помещали ооциткумулюсные комплексы для созревания, а также эмбрионы крупного рогатого скота после оплодотворения. С помощью лампы «Биоптрон» (BIOPTRON AG) проводили обработку направленным поляризованным светом яичников и эмбрионов в разные сроки культивирования в течение 10 секунд.

Суммарный уровень эндогенных порфиринов в преимплантационных эмбрионах оценивали по их накоплению в клетках после внесения в культуральную среду 0,8 мМ α -аминолевулиновой кислоты (АЛК) и инкубации образцов при 37°C в течение 18 ч. Количественное определение порфириновых пигментов проводили по интенсивности флуоресценции клеточных суспензий после перевода эмбриональных клеток в 1,5 М HCl. Количественный и качественный состав отдельных видов порфиринов – прото- (ПП), копро- (КП) и уропорфирина (УП) – определяли по методу Римингтона. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Solar (РБ). В качестве флуоресцирующего стандарта использовали родамин-В.

Для определения внутриклеточного уровня гемма эмбрионы трижды отмывали от культуральной среды забуференным фосфатами физиологическим раствором (ЗФР).

После перевода эмбриональных клеток и ооцитов в ЗФР хемилюминесцентным методом по интенсивности свечения флуоресцирующего продукта в реакции с люциферин-люциферазой (Биолар, Латвия) в них определяли содержание АТФ. В контрольной пробе в измерительную кювету вместо комбинированного препарата люциферина и люциферазы вносили 100 мкл стандартного раствора АТФ.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Изучено влияние вырабатываемых клеточными системами факторов роста (эпидермальный, инсулиноподобный) на развитие эмбрионов крупного рогатого скота, полученных вне организма.

Известно, то в процессе созревания ооцитов важную роль играют фолликулярные клетки.

Установлено, что использование монослоя кумулюса в качестве источника биологически-активных веществ способствовало увеличению количества созревших ооцитов на 5,2-5,7 % по отношению к кон-

трольной группе. Уровень дробления в опытных группах составил 40,5-41,7 % ($P>0,05$), что превышает аналогичный показатель контрольной группы на 14,0 и 15,2 % соответственно. В контрольной группе эмбрионов на преимплантационных стадиях получено не было, т. к. их развитие остановилось на стадии 4-х и 8-16 клеток. В то же время, выход эмбрионов в опытных группах составил 16,7-17,3 % в зависимости от способа получения монослоя кумулюсных клеток. Из 8 эмбрионов, полученных во II группе, на стадии морула находились 5, что составляет 12,8 % от числа оплодотворенных. Три развились до стадии бластоциста, при этом уровень трансформации морул в бластоцисты составил 37,5 %. Несмотря на то, что в I группе выход морул составил 17,3 % по отношению к числу дробящихся, уровень трансформации морул в бластоцисты был всего лишь 22,2 %, что говорит о ещё одном блоке развития при переходе со стадии морулы к стадии бластоцисты, преодоление которого возможно либо пересадкой эмбрионов на стадии морулы реципиентам, либо дальнейшим совершенствованием систем культивирования ранних эмбрионов.

Монослойные культуры эпителиальных клеток яйцевода продуцируют простагландин E2, простагландин F2 альфа и эндотелин-1 [2]. Ряд исследователей считает, что только данная система более полно отражает потребности зародышей крупного рогатого скота и позволяет получать наиболее полноценные эмбрионы [3].

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 оплодотворенных клеток. При использовании монослоя клеток яйцевода, полученного методом трипсинизации, количество дробящихся клеток уменьшилось на 2,7 % (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. В этой группе было получено 8 морул и 6 бластоцист. Уровень трансформации морул в бластоцисты составил 42,9 %, что превышает аналогичный показатель в предыдущей группе на 12,1 %.

Изучено влияние инсулиноподобного и эпидермального факторов роста на выход полноценных эмбрионов *in vitro*, пригодных к пересадке. Установлено положительное влияние факторов роста на созревание ооцитов и развитие эмбрионов вне организма (таблица 1). Добавление в среду для созревания инсулиноподобного фактора роста привело к увеличению созревших до метафазы II ооцитов на 11,2 %, в то же вре-

мя, при использовании эпидермального фактора роста этот показатель снизился на 8,7 % по сравнению с контролем и на 19,9 % по сравнению с первой группой. Наиболее высокий показатель созревания яйцеклеток был в группе клеток, культивировавшихся с ИПФР и ЭФР в среде для созревания, и составил 91,9 %. Причём, при добавлении в среду для созревания ИПФР и ИПФР с ЭФР этот показатель был достоверно выше по сравнению с группой клеток, культивировавшихся только с ЭФР.

Таблица 1 – Влияние инсулиноподобного и эпидермального факторов роста на получение эмбрионов коров в условиях *in vitro*

Группы клеток	Кол-во ооцитов, n	Созрело до метафазы II, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
Контроль	55	41-74,5	26-47,2	8-14,5
Среда для созревания + ИПФР	63	54-85,7**	33-52,4	12-19,1
Среда для созревания + ЭФР	58	38-65,8	27-49,1	10-17,2
Среда для созревания +ИПФР+ЭФР	62	57-91,9***	35-56,5	16-25,8

Примечание: здесь и далее ** – $P > 0,01$; *** – $P > 0,001$

Уровень дробления клеток во всех опытных группах был выше по сравнению с контролем. При добавлении в среду для созревания ЭФР поделилось 49,1 % зародышей, что на 1,9 % выше контрольной группы. При использовании в среде для созревания ИПФР этот показатель превышал аналогичный в вышеуказанной группе на 3,3 % и на 5,2 % в контрольной группе. Использование в комплексе двух факторов роста привело к дроблению 56,5 % клеток, что выше по сравнению с контролем на 9,3 % и на 7,4 и 4,1 % соответственно по сравнению с другими группами. В этой же группе был и самый высокий уровень выхода преимплантационных эмбрионов – 16 из 62, что составляет 25,8 %. При использовании одного их факторов роста этот показатель был ниже по сравнению с их комплексным использованием, но превышал показатель в контрольной группе на 2,7-4,6 %, соответственно.

Нами были проведены исследования по выявлению влияния соматотропина на уровень созревания ооцитов и выход преимплантацион-

ных эмбрионов *in vitro* (таблица 2). В качестве контроля использовали среду ТС-199 с добавлением 15%-ной фетальной сыворотки телёнка.

Таблица 2 – Влияние соматотропина на созревание ооцитов и выход преимплантационных эмбрионов

Среда	Кол-во ооцитов, п	Созрело до метафазы II, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
ТС-199	80	67-83,8	35-43,8	11-13,8
ТС-199 + 5 нг/мл СТГ	95	85-89,5	51-53,7	23-24,2
ТС-199 + 10 нг/мл СТГ	85	78-91,8	49-57,6	23-27,1**

Исследования показали, что добавление в среду для культивирования соматотропного гормона привело к увеличению созревших до стадии метафаза II яйцеклеток на 5,7-8,0 % по сравнению с контролем и составило 89,5-91,8 %. Это говорит о том, что процесс атрезии соматических клеток фолликулов, являющийся одной из причин низкого выхода преимплантационных эмбрионов при культивировании последних вне организма, снижается при применении соматотропина. Из 95 клеток, поставленных на созревание, при использовании 5 нг/мл СТГ 23 достигли стадии морула-бластоциста, что составило 24,2 % от числа поставленных на культивирование. При этом уровень дробления составил 53,7 %, что превысило показатель в контрольной группе на 9,9%. При увеличении дозы соматотропина до 10 нг/мл было получено 27,1 % ранних эмбриона от количества ооцитов (n=85), поставленных на культивирование. Это показатель превышает аналогичный в контроле на 13,3 % (P>0,01), а в группе с 5 нг/мл СТГ – на 2,9 %. Аналогичная зависимость наблюдалась и в развитии клеток после оплодотворения. Уровень дробления вырос по сравнению с контролем на 13,8% и составил 57,6 %.

Одним из способов повышения жизнеспособности эмбрионов является воздействие на них биофизическими приборами в процессе созревания. Приборы «Биоптрон» излучают линейно поляризованный свет с длиной волны 400-2000 нм.

Использование направленного поляризованного света позволило увеличить выход эмбрионов на преимплантационных стадиях на 3,2-9,9 % по сравнению с контролем в зависимости от способа применения лампы. Так, при облучении яичников после доставки с мясокомбината и ооцитов перед оплодотворением по 10 сек выход эмбрионов увели-

чился на 5,7 %, в то же время ооцитов перед оплодотворением и эмбрионов на 4-й день культивирования по 10 сек только на 3,2 %.

Обработка зигот после оплодотворения, затем ежедневно в течение 7 дней по 10 сек однократно привела к получению 25 % эмбрионов от числа клеток, поставленных на культивирование, что превышает аналогичный показатель в контроле на 9,9 %. При этом уровень дробления клеток в контрольной группе достоверно превышал аналогичный показатель в опытных группах от 2,2 до 17,7 %.

При регистрации порфириновой флуоресценции в преимплантационных эмбрионах нами практически обнаружены только следовые количества свободных порфиринов – промежуточных продуктов синтеза гема. В тоже время, анализ содержания свободного гема в эмбриональных клетках показал, что его уровень равен 0,04 пМ гема на клетку (бластомер эмбриона).

В следующей серии экспериментов нами был применён подход для оценки процесса порфирино- и гемообразования с использованием раннего их предшественника – АЛК. Установлено, что ранние эмбрионы, культивируемые в среде ТС-199, способны к индуцируемому АЛК синтезу безметалльных порфиринов. При внесении в среду ТС-199 экзогенной АЛК в концентрации 0,8 мМ в клетках эмбриона наблюдается длительное, в течение нескольких часов, накопление порфиринов.

Спектры флуоресценции суспензий эмбрионов в ЗФР имеют два максимума при 640 нм и 665 нм. Спектр возбуждения флуоресценции характеризуется выраженным максимумом при 410 нм и более длинноволновыми четырьмя минорными пиками в области 500-620 нм.

При экстракции ПП из клеток в раствор 1,5 М соляной кислоты спектр флуоресценции сдвигается в коротковолновую область и характеризуется двумя максимумами при 598-602 нм и 645-655 нм. Из всех исследованных популяций преимплантационных эмбрионов экстрагируется в основном три вида порфиринов – ПП, КП и УП. При этом наиболее высок уровень внутриклеточного накопления ПП.

Содержание КП и УП значительно меньше (рисунки 1 и 2).

Отношение количества ПП к КП составляет 4,5, ПП к УП – 5,4, а КП к УП – 1,32. Отдельные клеточные суспензии, полученные из эмбрионов 2, 4, 8, 16 и 32 бластомеров практически не отличались по параметру, характеризующему отношение интенсивности порфириновой флуоресценции к интенсивности белковой (триптофановой) флуоресценции клеток после инкубации с АЛК в течение 18 часов.

Чтобы выяснить возможную зависимость между стадией развития эмбриона и его энергетическим статусом, мы провели сравнительное исследование содержания АТФ в ооцитах и клетках ранних зародышей, состоящих из 2, 4, 8, 16, 32 бластомеров, полученных в условиях *in vitro*.

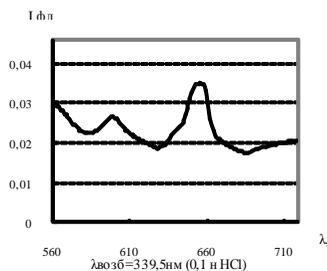


Рисунок 1 – Спектр флуоресценции копропорофирина в в суспензии эмбриональных клеток, инкубированных 18 ч в присутствии 0,8 мМ АЛК

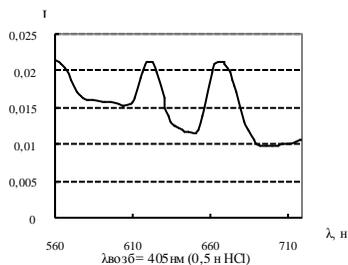


Рисунок 2 – Спектр флуоресценции уропорофирина в суспензии эмбриональных клеток, инкубированных 18 ч в присутствии 0,8 мМ АЛК

Установлено, что количество АТФ в свежевыделенных ооцитах в среднем колеблется от 2,4 до 3,0 пмоль на клетку, при последующем их культивировании в течение 7 дней в стандартных условиях внутриклеточный уровень макроэрга в ооцитах снижается до 1,9-2,0 пмоль/кл.

После оплодотворения ооцитов и развития эмбрионов до 2-х, 4-х и 8-ми бластомеров количество АТФ в эмбриональных клетках практически не изменяется и сохраняется на уровне 2,5 пмоль на клетку. На более поздних стадиях эмбрионального развития (16-32 бластомера) отмечено падение внутриклеточной концентрации АТФ (рисунки 3 и 4). Известно, что вплоть до 16-клеточной стадии развития эмбрионов утилизация глюкозы градуально увеличивается и в качестве энергетического субстрата ими активно используется пируват.

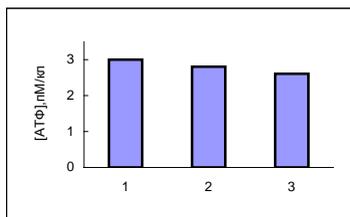


Рисунок 3 – Внутриклеточное содержание АТФ в преимплантационных эмбрионах быка: 1-2-х, 2-4-х и 3-8-ми клеточных.

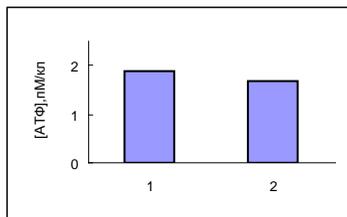


Рисунок 4 – Внутриклеточное содержание АТФ в преимплантационных эмбрионах быка: 1-16-ти и 2-32-х клеточных.

Однако следует отметить выраженную зависимость содержания АТФ в эмбриональных клетках от условий культивирования эмбрионов, а не от стадии их развития. Так, эмбрионы, клетки которых проявляли высокую резистентность к витальным красителям и, следовательно, находились в более активном функциональном состоянии, имели в 3-4 раза более высокое содержание АТФ по сравнению с клетками морфологически измененных эмбрионов.

С другой стороны, возможно, что отрицательная динамика внутриклеточного уровня АТФ обусловлена снижением вклада окислительного фосфорилирования энергетических субстратов и увеличением синтеза АТФ путём гликолиза, наиболее предпочтительного пути для энергообеспечения пролиферативно активных клеток, к которым относятся эмбриональные клетки. Этот сдвиг к гликолизу на стадии 32-х бластомеров у преимплантационных эмбрионов, возможно, обеспечивает им более активные анаболические процессы и высокий пролиферативный потенциал.

Заключение. Использование в качестве источников факторов роста монослойных культур клеток кумулюса позволяет получать 16,7-17,3% эмбрионов на стадии морула-бластоциста при уровне трансформации морул в бластоцисты 22,2-37,5 %, при использовании эпителиальных клеток яйцевода выход преимплантационных зародышей составляет 15,3-18,9 % с уровнем трансформации 30,8-42,9 %. Использование инсулиноподобного и эпидермального факторов роста способствует развитию эмбрионов крупного рогатого скота до стадии морулы-бластоцисты и позволяет получать 25,8 % эмбрионов, пригодных к пересадке при уровне дробления 56,5 %.

Использование соматотропного гормона позволяет повысить уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II до 91,8 %, при этом выход эмбрионов, пригодных к пересадке, составляет не менее 27,1 %.

Применение поляризованного света при получении ранних эмбрионов крупного рогатого скота вне организма позволяет увеличить выход морул-бластоцист на 9,9 %.

Установлено, что эмбриональные клетки коров содержат 0,04 пМ гема/кл и следовые количества эндогенных порфиринов. Эмбриональные клетки коров разных стадий развития (2-32 бластомеров) способны к индуцируемому АЛК синтезу протопорфирина IX, копропорфирина и уропорфирина. В клетках преимущественно накапливается протопорфирина IX. Содержание АТФ в эмбриональных клетках зависит от функционального состояния эмбрионов и составляет 3,0-8,0 пмоль/кл.

Литература

1. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / под ред. М. В. Зубец, В. П.

Буркат. – Киев : БМТ, 2001. – 723 с.

2. 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, K. Sato // *Theriogenology*. – 1999. – Vol. 52. – P. 791-801.

3. 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 : материалы 6-й Междунар. конф. (19-20 дек. 2006 г.)*. – Дубровицы, 2006. – С. 167-171.

4. Swain, J. E. [et al.] // *Reproduction*. – 2002. – Vol. 123. – P. 253-260.

(поступила 27.02.2009 г.)

УДК 636.2:612.64.089.67.

Л.В. ГОЛУБЕЦ, М.П. СТАРОВОЙТОВА, А.Е. ОТРОЩЕНКО

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭСТРАЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ *IN VITRO*

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Введение. После извлечения из фолликулов полученные ооцит-кумулусные комплексы (ОКК) должны быть максимально обеспечены всеми питательными компонентами так, как это происходит в условиях *in vivo*, т. е. в организме матери. В питательной среде должно присутствовать всё то, что способствует выживанию клетки, её пролиферации и дифференцировке.

В настоящее время частично выяснены потребности клеток в питательных веществах, для удовлетворения которых составляются и используются сложные, химически-определённые среды, такие, например, как ТС-199, Менезо, Хэм, которые обеспечивают клетку основным набором микроэлементов, витаминов, аминокислот. Однако без наличия гормональной и энергетической составляющей получить положительный результат в культуре *in vitro* практически невозможно. В качестве такой биологически активной добавки чаще всего используется сыворотка крови крупного рогатого скота.

Сыворотка представляет собой чрезвычайно сложный комплекс соединений, точный состав которого до настоящего времени окончательно не выяснен. Однако основные функции, которыми она обладает, определены достаточно чётко: обеспечение клеток гормональной составляющей, способствование прикреплению и распластыванию клеток, а также обеспечение их транспортными белками, минеральными веществами, липидами, факторами роста [1].