

И.В. КИРИЛЛОВА

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАННИХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОНОСЛОЯ ЭНДОМЕТРИЯ МАТКИ

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].

Оплодотворение созревших ооцитов с целью получения эмбрионов на стадиях морулы и бластоцисты – одно из перспективных направлений биотехнологии, позволяющих наиболее эффективно использовать воспроизводительный потенциал самок, особенно КРС. Однако получение эмбрионов вне организма до сих пор малоэффективно, так как эмбриональное развитие является результатом тонкого взаимодействия между генетической программой хромосом каждого зародыша и половыми путями самки. Культуральные среды достаточно отработаны для получения эмбрионов на определенных стадиях развития, однако возникают различные патологии, препятствующие этому процессу. Сбалансирование различных факторов, способствующих успешному оплодотворению ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* (ростовые факторы; факторы окружающей среды; энергетические вещества (ионы, аминокислоты, витамины), создающие среду для роста эмбрионов и др.), позволяет регулировать успешное эмбриональное развитие [2].

Моделирование условий созревания ооцитов коров на основе использования монослойных культур соматических клеток подразумевает, прежде всего, разработку оптимального состава сред, обеспечивающих полноценное созревание ооцитов и их развитие в эмбрионы

после оплодотворения [3].

Эндометрий представляет собой однослойный призматический мерцательный эпителий и снабжён многочисленными маточными трубными железами, секрет которых является необходимым питательным материалом для зародыша на первых этапах развития.

Был проведён опыт по изучению влияния монослоя фибробластов эндометрия матки, содержащихся в культуральной среде. Эмбрионы, полученные на 7-й день эстрального цикла у 6-ти коров и тёлочек, были разделены пополам с помощью техники микроманипуляции. Часть половинок в дальнейшем культивировалась в синтетической среде Хэм F-10 + 10% телячьей эмбриональной сыворотки, а другая часть – в такой же среде, содержащей монослой фибробластов эндометрия матки. Развитие эмбрионов оценивали через каждые 12 часов. В целом жизнеспособность культивируемых половинок эмбрионов на клеточном монослое была в 1,6 раз выше при 12-часовом культивировании и в 3,4 раза выше при 72-часовом культивировании [4].

Ряд исследователей случайным образом помещали зиготы либо в стандартную культуральную среду, либо в систему сокультивирования с эпителиальными клетками маточных труб. Все эмбрионы в обычной культуре остановились в своём развитии на 2-16-клеточной стадиях на 3-й день. В системе сокультивирования из числа оплодотворённых клеток 56,5 % эмбрионов были блокированы на стадии 2-16 клеток, остановились на стадии морулы 13,1 %, а 30,4 % эмбрионов достигли стадии бластоцисты [5]. Схожие результаты были получены и другими исследователями при получении эмбрионов свиней [6], при получении эмбрионов крупного рогатого скота, которые культивировались в матке овцы [7].

В связи с вышесказанным, целью работы явилась разработка способа получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма на основе использования монослоя эндометрия матки.

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

Яичники и верхняя треть рога матки убитых на мясокомбинате коров доставляли в лабораторию в среде Хенкса с добавлением антибиотиков при температуре 28-36 °С. Получение клеток эндометрия матки проводили четырьмя способами: 1) В лаборатории, в стерильном боксе, на тканях делали Т-образный неглубокий надрез и препарировали серозную оболочку. Затем рассекали глублежащие ткани и через образовавшееся отверстие иссекали стерильными ножницами фрагменты тканей, которые помещали в среду с антибиотиками. Ткань несколько раз промывали, измельчали ножницами до размеров кусочков 1-2 мм и

дезагрегировали 0,25%-ным раствором трипсина на магнитной мешалке. Продолжительность каждого цикла составляла 30-35 минут. Суспензию от первых трёх циклов сливали, так как она содержит 70-80 % нежизнеспособных клеток. Затем проводили центрифугирование после добавления сыворотки крупного рогатого скота (при 1000 об./мин.) 15 минут с последующим ресуспендированием осадка. Полученную суспензию инкубировали в питательной среде при +38,5 °С, 5 % CO₂ и 98% влажности до образования монослоя. Первую смену среды проводили через 24-48 часов культивирования в зависимости от интенсивности роста клеток. 2) Вторым способом получения клеток эндометрия матки было их механическое соскребание с последующим центрифугированием и инкубированием их в CO₂-инкубаторе при аналогичных физических параметрах. 3) Рог матки заполняли 0,05%-ным раствором трипсина, предварительно зажав его концы зажимами. Затем на 20 мин. матку помещали в CO₂-инкубатор при 38,5 °С и 5 % CO₂ в воздухе. По истечении времени инкубации матку 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 в физиологическом растворе с гентамицином, а последний раз отмывали в среде для созревания ооцитов ТС-199. 4) Клетки эндометрия получали путем выдавливания пинцетом. Полученный материал гомогенизировали физиологическим раствором с добавлением антибиотиков методом ресуспендирования. Затем клетки подвергали центрифугированию аналогично третьему способу.

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

Для повышения оплодотворяющей способности спермы при её созревании или оплодотворении ооцитов вне организма, с целью повышения эффективности получения преимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота использовали синтетический аналог простагландина F_{2α} (эстрофан). Также применяли воздействие лазерного излучения или поляризованного света для повышения жизнеспособности спермы в условиях *in vitro*. С этой целью использовали магнитно-лазерный аппарат «Вектор-03» (частота 5Гц в течение 5 сек.) и лампу поляризованного света «Биоптрон» (время экспозиции 10 сек.). По окончании оплодотворения ооциты отмывали от сперматозоидов и по-

мешали в среду для культивирования на монослой клеток эндометрия матки.

Биометрическая обработка данных проведена общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Для культивирования эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro*, использовали созревший монослой эпителиальных клеток матки. Получение эмбрионов крупного рогатого скота вне организма проводилось по разработанной в нашей лаборатории методике.

В результате исследований установлено, что в зависимости от способа получения первичных эпителиальных клеток матки уровень дробления составил от 33,9 % при использовании метода трипсинизации и магнитной мешалки до 63,2 % при использовании метода выдавливания в комплексе с центрифугированием. При использовании метода соскребания или трипсинизации, но без магнитной мешалки, эти показатели составили, соответственно, 41,6 и 50,0 %. Выход преимплантационных эмбрионов при использовании метода трипсинизации и магнитной мешалки достиг наиболее высокого уровня и составил 11,1%, а наиболее низкий – при получении эпителиальных клеток соскребанием – 5,0 % (таблица 1).

Таблица 1 – Выход преимплантационных эмбрионов при культивировании на монослой клеток эндометрия матки, полученном разными способами

Способ получения монослоя клеток матки	Количество ооцитов, n	Уровень дробления, n – %	Выход Мо–ВІ, n – %	Выход ВІ, n – %	Уровень трансформации, %
Метод соскребания	60	25 – 41,6	3 – 5,0	1 – 1,6	33,3
Метод трипсинизации на магнитной мешалке	189	64 – 33,9	21 – 11,1	2 – 1,0	9,5
Метод выдавливания	19	12 – 63,2	1 – 5,2	–	–
Метод трипсинизации путем зажима ее концов	18	9 – 50,0	1 – 5,5	–	–

Следует отметить, что при использовании монослоя клеток эндометрия, полученного методом соскребания, была получена 1 бластоциста, а уровень трансформации морул в бластоцисты составил 33,3 %. При трипсинизации, с использованием магнитной мешалки, этот показатель составил всего лишь 9,5 %. Таким образом, при использовании монослоя эпителиальных клеток матки уровень дробления составил 33,9-63,2 %, а выход морул-бластоцист 5,0-11,1 % в зависимости от способа выделения первичных клеток.

Изучено влияние лазерного излучения (магнитно-лазерный аппарат «Вектор-03») и поляризованного света (прибор «Биоптрон») на ооциты, культивируемые на монослое клеток эндометрия матки (таблица 2).

Таблица 2 – Выход преимплантационных эмбрионов при культивировании ооцитов с клетками эндометрия матки после их обработки приборами «Вектор-03» и «Биоптрон»

Опыт	Количество ооцитов, n	Уровень дробления, n – %	Выход Мо-В1, n – %
Лазер перед оплодотворением 5 Гц 10 сек, монослой матки, полученный методом соскребания	11	7 – 63,6	1 – 9,1
Лазер перед оплодотворением 5 Гц 10 сек (контроль)	29	12 – 41,4	1 – 3,4
Биоптрон после инкубатора 10 сек, монослой матки, полученной методом выдавливания	10	7 – 70,0	1 – 10,0
Биоптрон после инкубатора 10 сек без монослоя (контроль)	19	8 – 42,0	–

Использование лазерного излучения перед оплодотворением в комплексе с монослоем эпителиальных клеток матки привело к получению 9,1 % эмбрионов, пригодных к пересадке, при уровне дробления – 63,6 %. В то же время аналогичные показатели в контрольной группе (без монослойной культуры) составили 3,4 и 41,4 %, что ниже, чем в опытной на 5,7 и 22,2 %, соответственно. При использовании направленного поляризованного света уровень дробления увеличился

по сравнению с I опытной группой на 6,4 % и составил 70,0 %. Выход морул-бластоцист находился на том же уровне.

Для повышения оплодотворяющей способности спермы использовался синтетический аналог простагландина F_{2α} – эстрофан, и затем оплодотворенные ооциты культивировали на монослое эндометрия матки (таблица 3).

Таблица 3 – Выход эмбрионов при культивировании с клетками эндометрия матки после добавления простагландина в среду для капацитации

Опыт	Количество ооцитов, n	Уровень дробления, n – %	Выход Мо-В1, n – %
Эстрофан, монослой матки	17	7 – 41,2	1 – 14,3
Монослой матки (без эстрофана)	18	6 – 33,3	–
Эстрофан (без монослоя матки)	8	7 – 87,5*	2 – 28,6
Контроль (капацитация без эстрофана и культивирование без монослоя матки)	19	10 – 52,6	2 – 20,0

Примечание: *P < 0,05

Было установлено, что применение простагландина F_{2α} с дальнейшим культивированием на монослое клеток эндометрия матки позволило получить 41,2 % дробящихся зародышей, но при этом выход морул-бластоцист составил 14,3 % от числа дробящихся. При культивировании ооцитов на монослое матки, после оплодотворения спермой, которая капацитировалась без применения простагландина, уровень дробления составил 33,3 %, а преимплантационных эмбрионов получено не было. В опытной группе, где в среду для капацитации сперматозоидов было добавлено 25 мкг/мл эстрофана, уровень дробления и выход преимплантационных эмбрионов достиг максимального результата и составил 87,5 и 28,6 %, что достоверно выше (P<0,05) по сравнению с группой, которая культивировалась без простагландина, но на монослое эндометрия матки. В то же время эти показатели в контроле-

ной группе составили 52,6 и 20,0 %, соответственно, что превышает аналогичные данные в I и II опытных группах на 11,4-19,3 % и 5,7-20,0%, соответственно.

Кроме того, эмбрионы на монослой эпителиальных клеток матки пересаживались на 6-й день после оплодотворения.

В естественных условиях оплодотворенные зародыши попадают в матку на 5-7-й день после оплодотворения. Нами была проведена серия опытов по использованию монослоя эпителиальных клеток матки на 6-й день после оплодотворения. При этом выход морул-бластоцист увеличился до 30,8 %, что значительно превысило аналогичный показатель в предыдущих опытных группах, однако следует учитывать тот фактор, что на монослой помещались уже дробящиеся клетки, их запас жизнеспособности был выше, чем при постановке на опыт общего массива клеток.

Добавление эстральной сыворотки при помещении дробящихся зародышей на монослой клеток эндометрия матки позволило увеличить выход морул-бластоцист до 46,6 %. При этом следует отметить, что в первом случае уровень трансформации морул в бластоцисты был выше и составил 25,0 %, что превышает аналогичный показатель во II группе (с сывороткой) на 10,7 % (таблица 4).

Таблица 4 – Выход эмбрионов при их культивировании на монослое клеток эндометрия матки на 6-й день после оплодотворения

Опыт	Количество зародышей, n	Выход преимплантационных эмбрионов, n –%			Уровень трансформации, %
		Мо-В1	Мо	В1	
Эмбрионы посажены на монослой матки на 6-й день после оплодотворения	13	4–30,8	3–23,0	1–7,8	25,0
Эмбрионы посажены на монослой матки на 6-й день после оплодотворения + эстральная сыворотка	15	7–46,6	6–40,0	1–6,6	14,3

Заключение. Использование монослойной культуры эпителиальных клеток матки в технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* позволило получить 5,0-11,1 % преимплантационных эмбрионов при уровне дробления 33,9-63,2% в зависимости от способа получения соматических клеток.

Использование синтетического аналога простагландина F_{2α} (эстрофана) в комплексе с монослоем эпителиальных клеток позволяет повысить оплодотворяющую способность спермы при её созревании, а отсюда и уровень дробления ооцитов на 7,9 %.

Применение лазерного излучения или поляризованного света для повышения жизнеспособности спермы в условиях *in vitro* в комплексе с монослоем эпителиальных клеток матки увеличивает уровень дробления на 22,2 и 28,0 % и выход морул-бластоцист на 5,7 и 10,0 %, соответственно.

Добавление эстральной сыворотки при помещении дробящихся зародышей на монослой клеток эндометрия матки позволяет увеличить выход морул-бластоцист до 46,6 %.

Литература

1. Кузьмина, Т. И. Биологические аспекты экстракорпорального созревания, оплодотворения ооцитов и партеногенетического развития эмбрионов сельскохозяйственных животных / Т. И. Кузьмина // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных : материалы междунар. науч. конф. (18-19 нояб. 2003 г.). – М., 2003. – С. 40-45
2. Favio, Gantolfi // *Theviogenology*. – 1994. – Vol. 41. – P. 95-100.
3. Кузьмина, Т. И. Экстракорпоральное оплодотворение коров на основе тканевых культур фолликула в целях совершенствования технологии оплодотворения *in vitro* / Т. И. Кузьмина, Г. А. Шагиахметова // *Цитология*. – 2006. – Т. 48, № 12. – С. 1010-1015
4. Voelker, S. A Use of a uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos / S. A. Voelker, G. F. Ambozski, K. G. Hill // *Theriogenology*. – 1985. – Vol. 24, № 3. – P. 271-281.
5. Развитие незрелых ооцитов до стадии хэтчинга бластоцисты после созревания и оплодотворения *in vitro* при использовании систем со-культивирования // *Проблемы репродукции*. – 1999. – Т. 5, № 1. – С. 79.
6. Allen, R. L. In vitro development of porcine embryos in coculture with endometrial cell monolayers of culture supernatants / R. L. Allen, R. W. Wright // *J. Anim. Sci.* – 1984. – Vol. 59. – P. 1657-1661.
7. Rexroad, C. J. The ovine uterus as a host for *in vitro*-produced bovine embryos / C. J. Rexroad, A. M. Powell // *Theriogenology*. – 1999. – Vol. 15, № 52(2). – P. 351-364.

(поступила 24.02.2011 г.)