

А.И. ГАНДЖА, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, В.П. СИМОНЕНКО,
И.В. КИРИЛЛОВА

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА IN VITRO

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

Введение. Многие страны мира стремятся к достижению лидерства в области биотехнологии, и это является главным и приоритетным заданием их экономической политики. Биотехнология в животноводстве использует биологические процессы для получения необходимых продуктов и особей определенного генотипа нетрадиционными способами.

Одним из нерешенных вопросов в настоящее время является разработка состава питательных сред для культивирования гамет и эмбрионов крупного рогатого скота в системе *in vitro*.

Созревание фолликулов и ооцитов в яичниках млекопитающих находится под контролем многочисленных факторов, поступающих из кровеносной системы или синтезируемых локально. Как известно, гонадотропные гормоны являются главными регуляторами овариальной функции. В последние годы было установлено, что два других гормона гипофиза – пролактин и соматотропин (СТГ) – также участвуют в регуляции роста и развития овариальных фолликулов [1]. Кроме того, ряд имеющихся данных свидетельствует о влиянии этих гормонов на оогенез у различных видов млекопитающих. В частности, было установлено, что у мышей с инактивированным геном для лактогенного или соматотропного рецептора нарушается или ослабляется репродуктивная функция, в том числе нормальный процесс созревания ооцитов [2]. У женщин с пониженным содержанием СТГ в крови и фолликулярной жидкости наблюдалось снижение оплодотворяемости и качества ооцитов, а также жизнеспособности полученных *in vitro* эмбрионов [3]. Обработка овец СТГ во время суперовуляции приводила к повышению оплодотворяемости яйцеклеток *in vivo* и последующего качества эмбрионов [4]. При этом у различных видов млекопитающих в ооцитах и окружающих их кумулюсных клетках обнаружено наличие соматотропных и лактогенных рецепторов или их мРНК [5].

Но хотя сам метод существует уже довольно давно, потребности культивируемых клеток и оптимальные условия для их развития *in*

in vitro окончательно не определены. Поэтому актуальным остаются поиск и создание определенных питательных сред для культивирования клеток крупного рогатого скота.

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

Яичники получали на Минском и Борисовском мясокомбинатах и в убойном цехе ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области после убоя животного путем отсекаания от матки с помощью ножниц. Доставляли материал в лабораторию в стерильном солевом растворе Хенкса с добавлением 200 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина в бытовом термосе. Перед извлечением яйцеклеток из яичников их дважды промывали раствором Хенкса с добавлением антибиотиков. Извлечение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичников лезвием безопасной бритвы в растворе Хенкса в чашке Петри с добавлением 10 ед./мл гентамицина, 1 ед./мл гепарина и 1 % инактивированной фетальной сыворотки. После выделения ооцитов их поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумулюсных комплексов осуществляли по разработанной нами 5-бальной шкале под бинокулярным микроскопом МБС-10 при 16- и 56-кратном увеличении.

Ооцит-кумулюсные комплексы помещали в лунки планшета со средой для созревания на основе ТС-199 [Sigma] с добавлением соматотропина в дозах 5 нг/мл (I группа), 10 нг/мл (II группа) и 15 нг/мл (III группа) в CO₂-инкубатор на 24 часа. В качестве контроля использовали среду ТС-199 с добавлением 15%-ной фетальной сыворотки теленка (IV и VIII группы). Часть созревших ооцитов через 8, 16 и 24 часа очищали от клеток кумулюса с помощью микропипетки в 0,25%-ном растворе трипсина (2,5 мг трипсина на 1 мл физиологического раствора (0,9 г хлорида натрия на 100 мл бидистиллированной воды)). Затем помещали очищенные ооциты на обезжиренное предметное стекло в 1%-ный раствор цитрата натрия (100 мг цитрата натрия на 9,9 мл бидистиллированной воды) на 5-10 минут. После этого с помощью микропипетки убирали излишки цитрата натрия, выстраивали в ряд и наносили охлажденный до 4-5 °С фиксатор (3 мл метанола + 1 мл ледяной уксусной кислоты), высушивали на воздухе и добавляли краску. Через 15 минут готовые препараты помещали для промывки под проточную воду. Оставшуюся часть созревших ооцитов оплодотворяли замороженно-оттаянной спермой, которую помещали в пробирку с 1 мл питательной среды и оставляли в термостате на 1 час. В качестве питательных сред для капацитации использовали разработанную нами

питательную среду на основе Тироде [Sigma]. Надосадочную жидкость удаляли, помещали в другую пробирку, добавляли 1 мл среды для капацитации и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин. Верхний слой жидкости удаляли, осадок дважды отмывали средой для капацитации методом центрифугирования при 3000 об./мин, причем при втором отмывании в среду добавляли гепарин. Затем сперму отмывали дважды в среде для оплодотворения и в количестве 1×10^6 сперматозоидов в 1 мл добавляли к ооцитам, находящимся к этому времени в этой же среде. Помещали в CO₂-инкубатор на 18 часов для оплодотворения.

После процесса оплодотворения оплодотворенные ооцит-кумулюсные комплексы отмывали от среды для оплодотворения и помещали в среду для культивирования ранних зародышей, куда вводили соматотропный гормон в следующих режимах:

- 10 нг/мл СТГ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей после оплодотворения (V группа);
- 10 нг/мл СТГ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей на 8-16-клеточной стадии развития (VI группа);
- 5 нг/мл СТГ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей после оплодотворения и 5 нг/мл на 8-16-клеточной стадии развития (VII группа).

Эффективность созревания и оплодотворения ооцит-кумулюсных комплексов определяли по количеству и качеству созревших ооцитов, уровню дробления и выходу морул-бластоцист.

Анализ полученных цитогенетических препаратов проводили под бинокулярным микроскопом «Jenaval» при 900-кратном увеличении.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Известно, что гормон роста необходим для роста и развития организма, он также вовлекается в процесс половой дифференциации и полового созревания, в частности, в процессы стероидогенеза гонад, гаметогенеза и овуляции. Так, у коров гормон роста увеличивает число малых фолликулов, в позднем фолликулогенезе стимулирует стадии фолликулогенеза и предотвращает атрезию больших фолликулов. Таким образом, показано, что соматотропин играет важную роль в фолликулярной секреции, в механизмах образования доминантного фолликула, созреванию в нем биологически полноценной яйцеклетки.

В связи с этим на начальном этапе исследований нами были рассмотрены дозы внесения соматотропного гормона в среду для созревания ооцитов.

В результате проведенных исследований установлено (таблица 1), что добавление в среду для культивирования ооцитов соматотропного гормона привело к увеличению в сравнении с контролем созревших до

стадии метафаза II яйцеклеток на 5,7-8,0 %. Аналогичная зависимость наблюдалась и в развитии клеток после оплодотворения. Уровень дробления вырос по сравнению с контролем на 9,9-13,8 % и составил 53,7 % при введении в культуральную среду 5 нг/мл соматотропина, 54,3 % при концентрации соматотропина 15 нг/мл и 57,6 % при введении 10 нг/мл.

Из 95 клеток, поставленных на созревание, при использовании 5 нг/мл СТГ 23 (24,2 %) достигли стадии морула-бластоциста ($p < 0,01$). При увеличении дозы соматотропина до 15 нг/мл выход жизнеспособных эмбрионов составил 25,7 % ($p < 0,01$). Введение соматотропина в дозе 10 нг/мл позволило получить 23 преимплантационных эмбриона ($p < 0,001$), что составило 27,1 % от количества ооцитов, поставленных на культивирование.

Таблица 1 – Созревание ооцитов и выход преимплантационных эмбрионов под влиянием соматотропина

Группа	Среда для созревания ооцитов	Поставлено на культивирование, п	Созрело до метафазы II, п-%	Уровень дробления, п-%	Выход Мо-ВІ, п-%
I	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ	95	85-89,5	51-53,7	23-24,2**
II	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ	85	78-91,8	49-57,6	23-27,1***
III	ТС-199 + 15 нг/мл СТГ	70	64-91,4	38-54,3	18-25,7**
IV	ТС-199 (контроль)	80	67-83,8	35-43,8	11-13,8

Этот показатель превышает аналогичный в контроле на 13,3 %, в группе с 5 нг/мл СТГ – на 2,9 % и в группе с 15 нг/мл СТГ – на 1,4 %. Наши данные подтверждают тот факт, что эффект рекомбинантного бычьего соматотропного гормона на мейоз ооцитов коров носит дозозависимый характер.

Таким образом, использование среды для созревания ооцитов с добавлением соматотропного гормона в оптимальной дозе 10 нг/мл позволяет повысить уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II до 91,8 %, при этом уровень дробления составляет 57,6 %, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке, не менее 27,1 %.

Проведенный цитогенетический анализ стадий мейоза (таблица 2) свидетельствует о том, что ооциты обладают неодинаковым потенциалом к дальнейшему развитию. Так, после 8-часового культивирования в I-III опытных группах на стадии мейоза метафаза II находилось 4,3, 1,6 и 4,5 % ооцитов, соответственно, при этом уровень дегенерированных ооцитов составлял 10,6 %, 6,4 и 11,4 %. На других стадиях развития находилось от 84,1 % в III группе до 92,1% во II группе культивируемых ооцитов.

Наиболее высокая интенсивность созревания через последующие 8 часов наблюдалась в III группе и составляла 11,4 %, а наиболее низкая в I группе – 4,2 %. В контроле этот показатель находился на уровне 5,6%. В I группе также возросло количество дегенерированных ооцитов и составило 17,0 %, что на 6,4 % больше по отношению к 8-часовому культивированию.

Таблица 2 – Цитогенетический анализ созревания ооцитов

Группа	Среда для созревания ооцитов	Поставлено на культивирование, п	Время культивирования, ч	Стадия развития, п-%		Дегенерированные, п-%
				метафаза II	другие стадии	
I	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ	47	8	2-4,3	40-85,1	5-10,6
			16	4-8,5	35-74,5	8-17,0
			24	20-42,6	15-31,9	12-25,5
II	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ	63	8	1-1,6	58-92,1	4-6,4
			16	5-7,9	54-85,7	4-6,4
			24	45-71,4	13-20,6	5-7,9
III	ТС-199 + 15 нг/мл СТГ	44	8	2-4,5	37-84,1	5-11,4
			16	7-15,9	31-70,5	6-13,6
			24	24-54,5	12-27,3	8-18,2
IV	ТС-199 (контроль)	54	8	2-3,7	46-85,2	6-11,1
			16	5-9,3	44-81,5	5-9,3
			24	35-64,8	14-25,9	5-9,3

Самая высокая динамика развития отмечена в промежутке культивирования ооцитов от 16- до 24 часов. Так, до стадии метафаза II во второй группе развилось 71,4 % ооцитов, что составило 63,5 % роста по отношению к 16-часовому контролю. Интенсивность созревания в I и III группах находилась практически на одном уровне и составляла 34,1 и 38,6 %, соответственно. В контрольной группе этот показатель составлял 55,5 %.

Таким образом, наибольшей потенцией к инициации мейоза обладают ооциты, в среду для культивирования которых было включено 10 нг/мл соматотропного гормона. Стадии метафаза II через 8, 16 и 24 часа достигли 1,6 %, 7,9 и 71,4 % клеток, соответственно. При этом количество дегенерированных ооцитов через 24 часа культивирования находилось на уровне 7,9 %.

На следующем этапе исследований нами был рассмотрен вопрос о целесообразности введения соматотропного гормона в среду для культивирования ранних зародышей. Без создания оптимальных условий культивирования ранних зародышей их развитие блокируется на стадии 8-16 клеток, после чего наступает их дегенерация и гибель. Блок является природным видовым фактором. Возможно, что его наличие

обусловлено генетическими особенностями яйцеклетки и определяется активностью материнских генов еще в овогенезе. Возможно, это связано с запасом РНК, различной активностью ряда ферментов, структурой и особенностями функций митохондрий, различиями в проницаемости плазматической мембраны, обеспечивающей развитие эмбриона до более поздних стадий. Остановка в развитии при культивировании *in vitro* может быть также обусловлена неадекватностью условий для ооцитов в культуральной среде.

По результатам исследований установлено (таблица 3), что добавление в среду для культивирования соматотропного гормона в концентрации 10 нг/мл сразу после оплодотворения позволило получить 48,2% дробящихся зародышей. При двухразовом добавлении СТГ по 5 нг/мл после оплодотворения и на 8-16-клеточной стадии развития эмбрионов уровень дробления составил 47,1 %. Введение соматотропина только на стадии дробления 8-16 клеток в концентрации 10 нг/мл привело к получению 46,1 % дробящихся зародышей, что на 1,0 % меньше, чем при двукратном добавлении, и на 2,1 % меньше, чем при добавлении после оплодотворения, но на 2,9 % больше контроля. По выходу жизнеспособных эмбрионов на стадии дробления морула-бластоциста наблюдалась аналогичная картина. Так, этот показатель при использовании СТГ после оплодотворения составил 19,3 %, что на 3,1 % превышает контроль.

Таблица 3 – Влияние соматотропина на выход жизнеспособных зародышей

Группа	Среда для культивирования ранних эмбрионов	Поставлено на культивирование, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-ВЛ, n-%
VI	ТС-199+10 нг/мл СТГ (после оплодотворения)	83	40-48,2	16-19,3
VI	ТС-199+10 нг/мл СТГ (на стадии 8-16 кл.)	91	42-46,1	15-16,5
VII	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ (после оплодотворения) + 5 нг/мл СТГ (на стадии 8-16 кл.)	87	41-47,1	16-18,4
VIII	ТС-199 (контроль)	74	32-43,2	12-16,2

Использование соматотропина в 2 этапа позволило получить 18,4 % морул-бластоцист, что на 2,2 % больше контрольного показателя. Выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста при введении соматотропного гормона только на стадии блока 8-16 клеток находился практически на уровне контроля (+0,3 %) и составил 16,5 %.

Таким образом, оптимальным режимом ввода соматотропного гормона в среду для культивирования ранних зародышей является введение

ние его сразу после процесса оплодотворения. В результате чего выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста составляет 19,3 %, а уровень дробления – 48,2 %.

На заключительном этапе исследований нами был проведен сравнительный анализ режимов введения соматотропного гормона в среды для созревания ооцитов и культивирования ранних зародышей (таблица 4), при проведении которого были выявлены наилучшие результаты при добавлении соматотропина в среду для созревания ооцитов в концентрации 10 нг/мл. Так, до стадии метафаза II созрело 89,2 % ооцит-кумулюсных комплексов, что на 3,7 % больше, чем при концентрации 15 нг/мл, на 6,9 % больше, чем при введении соматотропного гормона в концентрации 5 нг/мл и на 7,7 % больше в сравнении с контролем.

Таблица 4 – Режимы введения соматотропного гормона в питательные среды

№ пп	Показа- тели	СРЕДА							
		для созревания ооцитов				для культивирования ранних зародышей			
		ТС-199 + 5 нг/мл СТГ	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ	ТС-199 + 15 нг/мл СТГ	ТС-199 (контроль)	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ (после оплод.)	ТС-199 + 10 нг/мл СТГ (на стадии 8-16 кл.)	ТС-199 + 5 нг/мл СТГ (после оплод.) + 5 нг/мл СТГ (на стадии 8-16 кл.)	ТС-199 (контроль)
		I групп	II групп	III групп	IV групп	V групп	VI групп	VII групп	VIII групп
1	Постав. на культив., п	64	74	69	65	61	63	72	66
2	Созрело до метафазы II, п-%	52-82,3	66-89,2	59-85,5	53-81,5	48-78,7	52-82,5	57-79,2	54-81,8
3	Уровень дробления, п-%	33-51,6	41-55,4	37-53,6	29-44,6	32-52,4	29-46,0	37-51,4	29-43,9
4	Выход Мо-VI, п-%	13-20,3	19-25,7	16-23,2	11-16,9	13-21,3	10-15,9	15-20,8	9-13,6

Введение соматотропного гормона в концентрации 10 нг/мл в среду для созревания ооцитов показало также лучшие результаты в сравнении с введением соматотропина в среду для культивирования ранних

зародышей. Так, уровень созревания до стадии метафаза II при введении соматотропина в концентрации 10 нг/мл сразу после оплодотворения в среду для культивирования ранних зародышей был на 10,5 % ниже, чем при введении соматотропина в аналогичной концентрации в среду для созревания ооцитов, и на 6,7 и 10,0 %, соответственно, ниже при добавлении соматотропного гормона в концентрации 10 нг/мл на стадии дробления 8-16 клеток и в концентрации 5 нг/мл сразу после процесса оплодотворения и на стадии 8-16 клеточного дробления, соответственно.

Аналогичная тенденция наблюдалась по уровню дробления и выходу преимплантационных эмбрионов. Так, уровень дробления во II группе превышал на 1,8 % этот показатель в III группе, на 3,0 % – в V группе, на 3,8 % – в I группе, на 4,0 % – в VII группе, на 9,4 % – в VI группе и на 10,8 % – в IV группе. Выход полноценных эмбрионов на стадии морула-бластоциста при введении соматотропного гормона в концентрации 10 нг/мл в среду для созревания ооцитов составил 25,7%. При использовании соматотропина в концентрации 15 нг/мл этот показатель составил 23,2 % (-2,5 %), при 5 нг/мл – 20,3 % (-5,4 %), в контроле – 16,9 % (-8,8 %). Выход жизнеспособных эмбрионов в V группе был ниже, чем во II на 4,4 %, чем в VI группе – на 9,8 % и в VII группе – на 4,9 %.

Таким образом, целесообразно использовать соматотропный гормон в концентрации 10 нг/мл для введения его в состав среды для культивирования ооцит-кумулюсных комплексов. При использовании такого режима созревает до стадии метафаза II 89,2 % ооцитов, выход жизнеспособных эмбрионов составляет 25,7 % при уровне дробления 55,4 %.

Заключение. 1. Использование среды для созревания ооцитов с добавлением соматотропного гормона в оптимальной дозе 10 нг/мл позволяет повысить уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II до 89,2-91,8 %, при этом уровень дробления составляет 55,4-57,6%, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке, – 25,7-27,1 %.

2. Наибольшей потенцией к инициации мейоза обладают ооциты, в среду для культивирования которых было включено 10 нг/мл соматотропного гормона. Стадии метафаза II через 8, 16 и 24 часа достигли 1,6, 7,9 и 71,4 % клеток, соответственно. При этом количество дегенерированных ооцитов через 24 часа культивирования находилось на уровне 7,9 %.

3. Оптимальным режимом ввода соматотропного гормона в среду для культивирования ранних зародышей является введение его сразу после процесса оплодотворения. В результате чего выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста составляет 19,3 %, а выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста составляет 19,3 %, а выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста составляет 19,3 %, а выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста составляет 19,3 %.

при уровне дробления – 48,2 %.

Литература

1. Hull, K. L. Growth hormone: roles in female reproduction / K. L. Hull, S. Harvey // J. Endocrinol. – 2001. – Vol. 168. – P. 1-23.
2. Bartke, A. Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction. What are we learning from transgenic and knock-out animals? / A. Bartke // Steroids. – 1999. – Vol. 64. – P. 598-604.
3. Effect of transitory hyperprolactinemia on in vitro fertilization of human oocytes / M. C. Mendes [et al.] // J. Reprod. Med. – 2001. – Vol. 46. – P. 444-450.
4. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes / J. Folch [et al.] // Theriogenology. – 2001. – Vol. 55. – P. 1777-1785.
5. Cellular localization and changes in expression of prolactin receptor isoform in sheep ovary throughout the estrous cycle / R. A. Picazo [et al.] // Reproduction. – 2004. – Vol. 128. – P. 545-553.
6. Tarkowski, A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // Cytogenetic. – 1966. – Vol. 1. – P. 394-400.

(поступила 5.03.2012 г.)

УДК 636.1.082.2

М.А. ГОРБУКОВ, Ю.И. ГЕРМАН, В.И. ЧАВЛЫТКО,
В.Н. ДАЙЛИДЁНОК, А.И. ГЕРМАН

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ЖЕРЕБЦОВ И КОБЫЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ СОЗДАНИИ НОВЫХ ЗАВОДСКИХ ЛИНИЙ БЕЛОРУССКОЙ УПРЯЖНОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ

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

Введение. Белорусская упряжная порода лошадей является в настоящее время наиболее распространенной и востребованной в республике. На современном этапе развития сельскохозяйственного производства основным ее назначением является использование в качестве улучшателя породы в рабочепользовательном коневодстве. Несмотря на активную модернизацию производительных сил в деревне, здесь имеется немало работ, где малозатратная энергосберегающая живая тяговая сила является необходимой и экономически выгодной. Активизируется использование лошадей белорусской упряжной породы в досуговом коневодстве, агротуризме, в развиваемых крестьянских, фермерских хозяйствах [1]. До недавнего времени активно использовались в коневодстве Беларуси лошади и таких крупных пород как литовская, советская тяжеловозные, торийская, латвийская упряжная. В