

А.И. ГАНДЖА, В.П. СИМОНЕНКО, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ,
И.В. КИРИЛЛОВА, О.П. КУРАК, Н.В. ЖУРИНА, М.А. КОВАЛЬЧУК

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОЛАКТИНА В СИСТЕМЕ ВОСПРОИЗВОДСТВА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА IN VITRO

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

Введение. Современные методы репродуктивных технологий, в основе которых лежит базовый способ дозревания ооцитов *in vitro*, такие как экстракорпоральное оплодотворение, клонирование, трансгенез, получение эмбриональных стволовых клеток, были разработаны и интенсифицируются благодаря научным исследованиям в области исследования механизмов регуляции фолликуло- и оогенеза [1].

Несмотря на достижения эмбриотехнологий, которые доказывают возможность использования особей, полученных путем клонирования или трансгенеза в животноводстве, фармакологии и в медицине, эффективность этих технологий находится на низком уровне. По-прежнему актуальным остается вопрос о приобретении яйцеклеткой, созревшей *in vitro*, компетентности к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбрионов. Процесс завершения мейоза вне организма зависит от многих факторов, среди которых немаловажную роль играет система культивирования. За последние 30 лет исследователями проделана большая работа по оптимизации моделей дозревания ооцитов. В работах использовались модели интрафолликулярного культивирования, культивирование на стенках фолликулов, среды, кондиционированные клетками гранулезы и т. д. Использование клеточных элементов фолликулов обеспечивало повышение уровня созревших клеток и выхода эмбрионов. Введение в среды для культивирования различных гормонов и биологически активных веществ позволяет выявлять характер их воздействия на состояние хроматина соматических клеток фолликула и гамет, оценивать перспективность их потенции к оплодотворению и дальнейшему формированию эмбрионов.

В настоящее время ведущая роль гипофизарных гормонов (фолликулостимулирующего и лютеинизирующего) в регуляции фолликуло- и оогенеза твердо установлена. Также установлено, что основным вторичным посредником в механизмах передачи сигналов гонадотропных гормонов в фолликулярные клетки является циклический аденозинмо-

нофосфат (цАМФ), который выполняет центральную роль в регуляции мейоза ооцитов. Одна из функций ПРЛ заключается в модуляции регуляторного действия гонадотропных гормонов на функциональную активность фолликулярных клеток, однако механизм этого модулирующего влияния до сих пор не ясен. В связи с этим исследование взаимодействия сигнальных путей, активируемых гонадотропными гормонами, в первую очередь, цАМФ-зависимого пути, и пролактином в ооцит-кумулясных комплексах, имеет актуальное значение для понимания фундаментальных механизмов, лежащих в основе регуляции овариальной функции [2].

Некоторыми исследованиями [3] установлено, что пролактин оказывает стимулирующий эффект на созревание ооцитов. Установлено, что качество ооцитов, полученных от суперовулированных телок, коррелирует с увеличенным содержанием в фолликулах пролактина. Установлено, что пролактин, добавленный в культуральную среду в процессе созревания ооцитов, благоприятно влияет в дальнейшем при оплодотворении *in vitro* на выход полноценных эмбрионов на стадии бластоцисты. Показано, что гомозиготные самки мышей с инактивированным геном для лактогенного рецептора бесплодны, вследствие многочисленных репродуктивных аномалий, включая овуляцию, увеличение количества не возобновивших мейоз ооцитов, понижение оплодотворяемости яйцеклеток и их способности к дальнейшему развитию. Полученные недавно данные об экспрессии мРНК рецепторов пролактина в ооцитах и ранних эмбрионах мышей, а также в овариальных клетках овец указывают на возможность прямого воздействия пролактина на формирование зрелой яйцеклетки [4].

Материалы и методы исследований. Исследования выполнены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования 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-

кумулясных комплексов осуществляли по разработанной нами 5-бальной шкале под бинокулярным микроскопом МБС-10 при 16- и 56-кратном увеличении.

Для дальнейшей работы отбирали клетки с многослойным компактным или слегка разрыхленным кумулюсом, плотно прилегающим к зоне пеллюцида, мелкозернистой или имеющей небольшие участки гранулярной конденсации ооплазмы, равномерно заполняющей прозрачную оболочку, которая равномерна по толщине, не имеет никаких дефектов, округлая по форме.

Ооцит-кумулясные комплексы помещали в лунки планшета со средой для созревания на основе ТС-199 [Sigma] с добавлением пролактина в дозах 10 нг/мл (I группа), 50 нг/мл (II группа), 100 нг/мл (III группа) и 150 нг/мл (IV группа) в CO₂-инкубатор на 24 часа. В качестве контроля использовали среду ТС-199 с добавлением 15%-ной фетальной сыворотки теленка (V группа). Созревшие ооциты 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 ооцит-кумулясные комплексы отмывали от среды для оплодотворения и помещали в среду для культивирования ранних зародышей, куда вводили пролактин в следующих режимах:

- 50 нг/мл ПРЛ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей после оплодотворения (I группа);
- 50 нг/мл ПРЛ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей на 8-16-клеточной стадии развития (II группа);
- 25 нг/мл ПРЛ добавляли в среду для культивирования ранних зародышей после оплодотворения и 25 нг/мл на 8-16-клеточной стадии развития (III группа).

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

Результаты эксперимента и их обсуждение. По результатам исследований установлено, что добавление в среду для культивирования пролактина привело к увеличению в сравнении с контролем созревших до стадии метафаза II яйцеклеток на 0,8-8,3 % (таблица 1). Аналогичная зависимость наблюдалась и в развитии клеток после оплодотворения. Уровень дробления вырос по сравнению с контролем на 3,2-10,9% и составил 55,3 % при введении в культуральную среду 50 нг/мл пролактина, 52,8 % при концентрации пролактина 100 нг/мл, 51,8 % при концентрации пролактина 10 нг/мл и 47,6 % при введении 150 нг/мл ПРЛ.

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

Группа	Среда для созревания ооцитов	Поставлено на культивирование, n	Созрело до метафазы II, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
I	ТС-199 + 10 нг/мл ПРЛ	79	64-81,0	41-51,8	15-19,0
II	ТС-199 + 50 нг/мл ПРЛ	94	83-88,3	52-55,3	24-25,5
III	ТС-199 + 100 нг/мл ПРЛ	87	77-88,5	46-52,8	20-23,0
IV	ТС-199 + 150 нг/мл ПРЛ	63	53-84,1	30-47,6	13-20,6
V	ТС-199 (контроль)	81	65-80,2	36-44,4	12-14,8

Из 79 клеток, поставленных на созревание, при использовании 10 нг/мл ПРЛ 15 (19,0 %) достигли стадии морула-бластоциста. При увеличении дозы пролактина до 100 нг/мл выход жизнеспособных эмбрионов составил 23,0 %. Дальнейшее увеличение дозы введения до 150 нг/мл привело к снижению этого показателя до 20,6 %. Введение пролактина в дозе 50 нг/мл позволило получить 24 преимплантационных эмбриона, что составило 25,5 % от количества ооцитов, поставленных на культивирование. Этот показатель превышает аналогичный в контроле на 10,7 %.

Таким образом, использование среды для созревания ооцитов с добавлением пролактина в оптимальной дозе 50нг/мл позволяет повысить уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II до 88,3 %, при этом уровень дробления составляет 55,3 %, а выход эмбрионов,

пригодных к пересадке, не менее 25,5 %.

На следующем этапе исследований были разработаны режимы введения пролактина при культивировании ранних зародышей (таблица 2). По результатам исследований установлено, что добавление в среду для культивирования ранних зародышей пролактина привело к увеличению в сравнении с контролем уровня дробления на 3,5-4,9 %, который составил 48,8 % при введении в культуральную среду 50 нг/мл пролактина сразу после оплодотворения, 48,3 % при введении пролактина в концентрации 25 нг/мл сразу после оплодотворения и 25 нг/мл на стадии 8-16 клеток, а также 47,4 % при концентрации пролактина 50 нг/мл на стадии дробления 8-16 клеток.

Таблица 2 – Влияние пролактина на выход жизнеспособных зародышей

Группа	Среда для культивирования ранних эмбрионов	Поставлено на культивирование ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
I	ТС-199+50 нг/мл ПРЛ (после оплодотворения)	86	42-48,8	17-19,8
II	ТС-199+50 нг/мл ПРЛ (на стадии 8-16 кл.)	78	37-47,4	13-16,7
III	ТС-199 + 25 нг/мл ПРЛ (после оплодотворения) + 25 нг/мл ПРЛ (на стадии 8-16 кл.)	87	42-48,3	16-18,4
IV	ТС-199 (контроль)	82	36-43,9	12-14,6

Из 86 клеток, поставленных на созревание, при использовании пролактина в концентрации 50 нг/мл сразу после оплодотворения 17 (19,8 %) достигли стадии морула-бластоциста, что на 5,2 % больше в сравнении с контрольным показателем. При введении ПРЛ одновременно в культуральную среду на стадии дробления 8-16 клеток выход жизнеспособных эмбрионов составил 16,7 %, что на 2,1 % выше в сравнении с контролем, но на 3,1 % ниже, чем в I опытной группе. Двухразовое введение пролактина в концентрации 25 нг/мл сразу после оплодотворения и на стадии дробления 8-16 клеток позволило повысить выход преимплантационных эмбрионов на 1,7 % в сравнении со II опытной группой и на 3,8 % в сравнении с контролем.

Таким образом, использование среды для культивирования ранних зародышей с добавлением пролактина в оптимальной дозе 50 нг/мл сразу после оплодотворения позволяет достигнуть уровня дробления

48,8 %, а выхода эмбрионов, пригодных к пересадке, – не менее 19,8%.

Заключение. 1. Использование усовершенствованной среды для созревания ооцитов с добавлением пролактина в дозе 50 нг/мл позволяет повысить уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II до 88,3 %, при этом уровень дробления составляет 55,3 %, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке, – не менее 25,5 %.

2. Использование усовершенствованной среды для культивирования ранних зародышей с добавлением пролактина в дозе 50 нг/мл сразу после оплодотворения позволяет повысить уровень дробления до 48,8 %, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке, – не менее 19,8 %.

Литература

1. Stimulation of c-Src by prolactin is independent of Jak2 / J. A. Fresno Vara [et al.] // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 345. – P. 17-24.

2. Effects of prolactin on intracellular stored calcium in the course of bovine oocyte maturation in vitro / T. I. Kuzmina [et al.] // *Theriogenology.* – 1999. – Vol. 51. – P. 1363-1374.

3. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramideinduced apoptosis in human granulosa cells / C. M. Prolactin [et al.] // *Human Reproduction.* – 2003. – Vol. 18, N 12. – P. 2672-2677.

4. 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.

Поступила 28.02.2013 г.

УДК 636.1.061

М.А. ГОРБУКОВ, Ю.И. GERMAN, В.И. ЧАВЛЫТКО,
В.Н. ДАЙЛИДЕНОК, А.И. GERMAN

ПЛЕМЕННЫЕ КАЧЕСТВА ЛОШАДЕЙ СОЗДАВАЕМЫХ ЛИНИЙ БЕЛОРУССКОЙ УПРЯЖНОЙ ПОРОДЫ

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

Введение. В соответствии с государственной научно-технической программой «Агротехнологический комплекс – устойчивое развитие» на 2011-2015 годы предусмотрено выполнение комплекса мероприятий по созданию новых заводских линий лошадей белорусской упряжной породы, включающих жеребцов и кобыл, на 3-4 % превосходящих по совокупности признаков отечественных и зарубежных аналогов, способных к выполнению энергоемких малозатратных работ, эффективных при ис-