

2009. – 19 с.

4. Физиология сельскохозяйственных животных / Ю. И. Никитин [и др.] ; под общ. ред. Ю. И. Никитина. – Минск : Техноперспектива, 2006. – 463 с.

5. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики : справочник / под ред. проф. И. П. Кондрахина. – М. : КолосС, 2004. – 520 с.

6. Финогонов, А. Ю. Биохимические показатели крови животных в норме и при патологии : монография / А. Ю. Финогонов. – Минск : ООО «Инфозэксперт», 2011. – 192 с.

Поступила 5.04.2013 г.

УДК 636.2.034:612.02

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

ВЛИЯНИЕ Фолликулярной жидкости НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ КОРОВ ВНЕ ОРГАНИЗМА

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

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

Введение. Фолликулярная жидкость (ФЖ) легко можно получить в достаточном количестве во время процедур вспомогательной репродукции [1], она является единственной натуральной средой, обладающей всеми необходимыми гормональными и биохимическими компонентами для активации капацитативных свойств и акросомной реакции сперматозоидов, их проникновения через прозрачную оболочку ооцита. По сообщениям И.О. Грищенко и других [2], оплодотворение ооцитов активно подвижными спермиями, выделенными в среде, содержащей фолликулярную жидкость, которая содержит клетки гранулезы, заметно уменьшает число эмбрионов с признаками фрагментации и повышает частоту наступления беременности. Положительный эффект ФЖ объясняется тем, что по стандартной технике экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) ооциты тщательно отмываются от ФЖ и находящиеся в ней клетки кумулюса и гранулезы и переносятся в чистую среду, таким образом, искусственно нарушается взаимодействие между ними [3]. Эти структуры имеют специальные мембранные контакты, являющиеся основой биохимической связи между клетками и способствующие взаимному обмену ионов и веществ с небольшой молекулярной массой [1]. Только в присутствии фолликулярных клеток

происходит образование пирувата, влияющего на созревание ооцитов и необходимого для роста эмбриона, а также первого и второго деления. Фолликулярная жидкость содержит большое количество ростовых факторов, которые вовлекаются в процессы раннего эмбрионального развития, и ее присутствие в среде капацитации создает тот биохимический фон, который содействует синхронному дроблению и успешному развитию эмбрионов [1, 4].

В связи с вышеизложенным целью наших исследований явилось установление влияния фолликулярной жидкости коров на пролиферацию соматических клеток фолликула, которые синтезируют биологически активные вещества, необходимые для роста и развития эмбрионов, и являются субстратом для получения преимплантационных эмбрионов вне организма матери.

Материал и методика исследований. Исследования выполнены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» с участием сотрудников лаборатории моделирования клеточных процессов ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси».

Яичники убитых на Минском и Борисовском мясокомбинатах, а также в убойных цехах СПК «Агрокомбинат Снов» и ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» коров доставляли в лабораторию в среде Хенкса с добавлением антибиотиков (50 нг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина или 50 мг/мл гентамицина) при температуре 28-36 °С. Ооцит-кумуляные комплексы выделяли методом рассечения ткани яичника лезвием безопасной бритвы в чашке Петри в солевом растворе Хенкса с добавлением 1%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 ед./мл гентамицина и 1 ед./мл гепарина. Поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумуляных комплексов проводили по пятибалльной шкале с использованием микроскопа МБС-10 при 16-56-кратном увеличении.

Фолликулярную жидкость с клетками гранулезы получали посредством аспирации фолликулов с помощью шприца от убитых на мясокомбинате животных. Для анализа пролиферативной активности живых клеточных культур соматические клетки высевали в сосуды Карреля при посевной площади 100-300 тыс. на 1 см² поверхности в ростовой среде, включающей 90 % среды Игла и 10 % эмбриональной сыворотки телят с добавлением антибиотиков. В сосуды Карреля добавляли СО₂ (5 % объема сосуда) с помощью шприца, сосуды герметически закупоривали резиновыми пробками и помещали в камеру инвертированного микроскопа с температурой 37 °С. Визуально выбирали участок культуры на дне сосуда Карреля и выполняли автоматическое

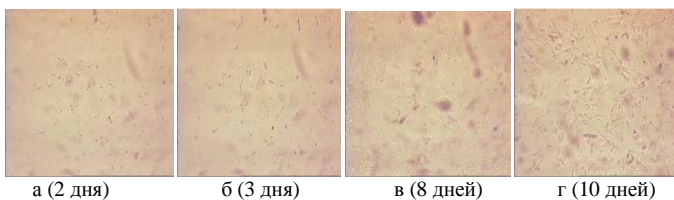
фотографирование клеток в течение различных сроков (до двух месяцев). Используемая камера позволила проводить видеосъемку клеток с частотой 1 кадр в минуту, что обеспечивает фиксацию быстропротекающих процессов изменения формы и движения соматических клеток.

В контрольной группе ооцит-кумулюсные комплексы помещали в лунки планшета со средой для созревания на основе ТС-199 и KSOM (контроль I и контроль II). В первой серии опытов к питательной среде ТС-199 и во второй серии опытов к среде KSOM была добавлена фолликулярная жидкость, полученная из фолликулов диаметром 3-6 мм (опыт I, опыт III) и ≥ 10 мм (опыт II, опыт IV).

Созревшие ооциты оплодотворяли заморожено-оттаянной спермой быка после проведения процедуры капацитации. После разморозки сперму помещали в 1 мл среды для капацитации и ставили на 1 час в CO₂-инкубатор для проведения *swim up* процедуры, при которой наиболее активная часть сперматозоидов всплывает в верхние слои питательной среды. Данную фракцию сперматозоидов собирали, помещали в другую пробирку с питательной средой для капацитации сперматозоидов и дважды подвергали процедуре центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 минут. При втором отмывании в среду добавляли гепарин (150 ед./мл). Затем сперму дважды отмывали средой для оплодотворения ооцитов, приготовленной на основе среды Тироде. Сперматозоиды в количестве 1×10^6 на 1 мл среды добавляли к ооцитам, находящимся в среде для оплодотворения. По окончании оплодотворения ооциты отмывали от сперматозоидов и помещали в среду для культивирования.

Эффективность созревания и оплодотворения ооцит-кумулюсных комплексов определяли по уровню дробления и выходу преимплантационных эмбрионов.

Результаты эксперимента и их обсуждение. При анализе полученных фотоснимков установлено, 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 образовывался густой клеточных монослой, который сохранялся в течение 40 дней наблюдения (рисунок 1 а-г).



а (2 дня) б (3 дня) в (8 дней) г (10 дней)
 Рисунок 1 – Культура клеток гранулезы при исходном добавлении третьей части ФЖ к культуральной среде

В то же время без применения фолликулярной жидкости клетки сначала размножаются, но затем быстро стареют, и в них наблюдаются в основном крупные неделяющиеся клетки (рисунок 2).

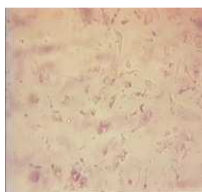


Рисунок 2 – Культура клеток гранулезы без добавления ФЖ к культуральной среде после 13 дней культивирования

Особенно интересно, что фолликулярная жидкость оказалась эффективной не только при ее исходном добавлении в культуральную среду. Добавление одной трети фолликулярной жидкости обеспечивало ярко выраженный омолаживающий эффект (рисунок 3).

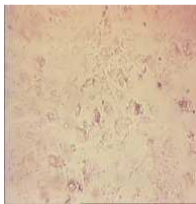


Рисунок 3 – Культура клеток гранулезы после 13 дней культивирования без добавления ФЖ и последующих 8 дней после смены культуральной среды с добавлением третьей части ФЖ

На рисунке 3 показана культура клеток гранулезы после 13 дней культивирования без добавления фолликулярной жидкости и последующих 8 дней после смены культуральной среды с добавлением третьей части фолликулярной жидкости. После добавления фолликулярной жидкости число клеток увеличилось (сравнить с рисунком 2).

На компьютерных видеозаписях было обнаружено много митотических делений, причем 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 увеличивалось количество густых монослойных участков, состоящих в основном из мелких клеток, хотя были также отдельные крупные постаревшие клетки, что обеспечивает получение долговременной монослойной культуры клеток гранулезы из фолликулов яичника крупного рогатого скота.

В дальнейших исследованиях мы установили влияние ФЖ, полученной из фолликулов разного диаметра (3-6 мм – антральных и ≥ 1 см – преовуляторных) на выход преимплантационных эмбрионов, полученных в различных питательных средах *in vitro* (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние ФЖ на выход ранних зародышей

Опыт	Размеры фолликулов для получения ФЖ, мм	Среда	Количество ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
Опыт I	3-6	ТС-199	30	16-53,3	4-13,3
Опыт II	≥ 10	ТС-199	16	6-37,5	2-12,5
Контроль I	–	ТС-199	30	15-50,0	2-6,7
Опыт III	3-6	KSOM	23	11-47,8	2-8,7
Опыт IV	≥ 10	KSOM	16	7-43,7	–
Контроль II	–	KSOM	30	13-43,3	–

В первой серии опытов ооциты культивировали в среде ТС-199, которая представляет собой сбалансированную питательную среду для культивирования клеток, состоящая из витаминов, аминокислот, солей и других факторов роста, с добавлением 10%-ной фолликулярной жидкости, полученной из фолликулов \varnothing 3-6 мм (Опыт I) и $\varnothing \geq 10$ мм (Опыт II), от общего объема среды. Во второй серии опытов использовали среду KSOM (синтетическая среда, аналогичная по составу жидкости яйцевода), фолликулярную жидкость добавляли из тех же фолликулов.

Установлено, что добавление 10%-ной фолликулярной жидкости в среду ТС-199 способствовало получению 53,3 % дробящихся зародышей, что превысило контрольные показатели на 3,3 %. Выход преим-

плантационных эмбрионов в данной опытной группе превысил контрольные показатели на 50 % и составил 13,3 %. При добавлении к среде ТС-199 фолликулярной жидкости, полученной из фолликулов $\varnothing \geq 10$ мм уровень дробления снизился на 12,5 %, но при этом было получено 12,5 % ранних эмбрионов, пригодных к пересадке коровам-реципиентам, что выше, чем в контроле на 5,8 %.

При использовании среды KSOM уровень дробления ооцитов снижается по сравнению с использованием среды ТС-199 на 6,7 %, а преимплантационных эмбрионов вовсе не было получено. При добавлении фолликулярной жидкости, полученной из антральных фолликулов к среде KSOM, происходит повышение уровня дробления на 4,5 %, эмбрионы на преимплантационных стадиях развития были получены только в III опыте, и составил 8,7 %, что можно сопоставить с омолаживающим эффектом фолликулярной жидкости, установленном при изучении пролиферации клеток гранулезы.

Заключение. 1. Использование 10%-ной фолликулярной жидкости от общего объема в качестве добавки к питательной среде, по сравнению с базовой средой (без использования фолликулярной жидкости), обеспечивает интенсивную пролиферацию клеток гранулезы и возможность их продолжительного культивирования (до 40 дней) без признаков клеточного старения.

2. Для культивирования ооцитов целесообразно использовать среду ТС-199 как более сбалансированную по своему составу по сравнению со средой KSOM, при этом уровень дробления ооцитов и выход преимплантационных эмбрионов повышается на 6,7 %.

3. Для получения фолликулярной жидкости рекомендуется использовать фолликулы диаметром 3-6 мм, то есть антральные фолликулы, содержащие все необходимые гормональные и биохимические компоненты, а также факторы роста, влияющие на созревание ооцитов, необходимы для активации капацитативных свойств и акросомной реакции сперматозоидов, то есть наиболее полно отражающие потребности зародышей в процессе их созревания и оплодотворения *in vitro*. При этом выход жизнеспособных эмбрионов на преимплантационных стадиях развития повышается на 6,6-8,7 % в зависимости от состава питательной среды для культивирования зародышей.

Литература

1. Treatment of human spermatozoa with follicular fluid can influence lipid content and motility during *in vitro* capacitation / S. Hamamah [et al] // *Fertil. Steril.* – 1996. – Vol. 65, № 3. – P. 265-271.
2. Использование фолликулярной жидкости человека на этапе культивирования гамет и эмбрионов в программе ЭКО / В. И. Грищенко [и др.] // *Проблемы репродукции.* – 1999. – № 6. – С. 43-46.
3. Элдер, К. IVF. Лабораторные процедуры / К. Элдер, С. Эйвери, К. Миллз // *Wourn-*

hallam group. – 1990. – С. 23.

4. Effect of follicular fluid supplementation on the in vitro development of human pre-embryos / R. Hemmings [et al] // Fertil. Steril. – 1994. – Vol. 62, № 5. – P. 1018-1021.

Поступила 14.03.2013 г.

УДК 636.2.034:636.082.12

И.Н. КОРОНЕЦ, Н.В. КЛИМЕЦ, М.А. ДАШКЕВИЧ,
Ж.И. ШЕМЕТОВЕЦ, М.В. ПОЛЯНСКАЯ

АДАПТАЦИОННЫЕ СПОСОБНОСТИ ИМПОРТНОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

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

Введение. Селекционно-племенная работа по преобразованию черно-пестрого скота в молочном направлении продуктивности в нашей стране проводится с 1980 года путем использования лучших быков-производителей голштинской породы мировой селекции. В основу выведения высокопродуктивного типа скота было положено поглотительное скрещивание, так как этот метод дает возможность решать поставленную задачу в более короткие сроки. В качестве улучшающей породы использовался лучший мировой фонд – голштинская порода [1].

Голштинская порода американской и канадской селекции является самой высокопродуктивной породой в мире. Она отличается специализированным молочным типом, большой живой массой коров (700-750 кг), достаточной высокорослостью (142-147 см), а у быков-производителей, соответственно, 1200 кг и 160-165 см. Голштинская порода скороспела и отселекционирована на пригодность к эксплуатации в условиях современной промышленной технологии производства и имеет высокие адаптационные качества[2, 3].

Большое влияние данная порода оказала на генетический потенциал черно-пестрой породы Беларуси. Работа по совершенствованию породы проводится по методу поглотительного скрещивания. В настоящее время на племпредприятиях используются в основном высококровные и чистопородные по голштинской породе производители.

Адаптация – процесс достижения устойчивого уровня активности функциональных систем, органов и тканей, а также механизмов управления, который обеспечивает возможность длительной жизнеспособ-