

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ В СКОТОВОДСТВЕ

И. П. ШЕЙКО, А. И. ГАНДЖА

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» (Жодино, Беларусь)

belniig@tut.by

Использование при созревании ооцитов бычьей сыворотки в комплексе с эмбриональной или фетальной, гонадотропин-рилизинг-гормона (сурфагона) позволило получить 17,4–17,9 % преимплантационных зародышей при уровне дробления 44,8–45,2 %. Введение в среду для культивирования эпибрассинолида обеспечило выход 14,2–16,2 % зародышей, а воздействие на сперму лазерного излучения и поляризованного света – 14,7–16,7 %.

Ключевые слова: ооцит-кумулюсный комплекс, бычья эмбриональная и фетальная сыворотка, гонадотропин-рилизинг-гормон эпибрассинолид, лазерное излучение, поляризованный свет

PERFECTION OF THE BASIC STAGES OF TECHNOLOGY FOR EXTRACORPORAL FERTILIZATION IN CATTLE BREEDING.

I. P. Sheyko, A. I. Gandzha

Republican Unitary Enterprise «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus on Animal Husbandry» (Zhodino, Belarus)

Belniig@tut.by

Use of bovine serum at oocyte maturation in combination with embryonic or fetal-term, gonadotropin releasing hormone (surfagon) allowed obtaining 17.4–17.9 % of preimplantation embryos at the cleavage level of 44.8–45.2 %. Introduction to the culture medium of epibrassinolide ensured 14.2–16.2 % embryos outcome, and laser light and polarized light effect on sperm – 14.7–16.7 %.

Key words: oocyte-cumulus complex, bovine embryo and fetal serum, gonadotropin-releasing hormone epibrassinolide, laser light, polarized light

УДОСКОНАЛЕННЯ ОСНОВНИХ ЕТАПІВ ТЕХНОЛОГІЇ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ В СКОТАРСТВІ

І. П. Шейко, А. І. Ганджа

Республіканське унітарне підприємство «Науково-практичний центр Національної академії наук Білорусі з тваринництва» (Жодино, Білорусь)

belniig@tut.by

Використання при дозріванні ооцитів бичачої сироватки в комплексі з ембріональною чи фетальною, гонадотропін-рилизинг-гормону (сурфагону) дозволило отримати 17,4–17,9% преимплантаційних зародків при рівні дроблення 44,8–45,2%. Введення в середовище для культивування епібрасиноліду забезпечило вихід 14,2–16,2% зародків, а дія на сперму лазерного опромінювання і поляризованого світла – 14,7–16,7%

Ключові слова: ооцит-кумулюсний комплекс, бичача ембріональна і фетальна сироватка, гонадотропін-рилизинг-гормон епібрасинолід, лазерне опромінювання, поляризоване світло

Вступление. С переходом на интенсивные технологии ведения животноводства возрастают продуктивные нагрузки на животных, снижается воспроизводительная способность коров, что приводит к преждевременному выбытию ценных в генетическом плане животных из основного стада [1]. В то время, как за продуктивную жизнь эти животные приносят 1–2 телят, потенциальный запас ооцитов в яичниках коровы составляет несколько сот тысяч. В течение жизни огромная часть ооцитов подвергается атрезии и в воспроизводстве не участвует. Технология экстракорпорального оплодотворения ооцитов позволяет с большей эффективностью использовать репродуктивный и генетический потенциал высокоценных животных. Несмотря на то, что в последние годы появилось значительное число публикаций, свидетельствующих об новейших успехах технологий репродукции, отдельные этапы этих многоступенчатых технологий требуют дальнейшего совершенствования [2]. До сих пор у нас недостаточны знания о том, каковы составляющие компетенции ооцита, изъятых из антральных фолликулов, хотя ясно, что главным составляющим фактором является фолликулярная среда, в которой развивается ооцит. Несмотря на это мало известно о том, как потребность в питательных веществах ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) влияет на последующее развитие эмбриона. Например, наиболее часто используемая среда для созревания ооцитов составлена много лет назад для культуры соматических клеток, но не яичников. Пока не достаточно исследований, в которых бы доказывалось, что метаболические потребности ОКК напрямую бы связывались с развитием ооцитов. Однако, четко доказано, что восстановление мейоза в ооцитах их антральных фолликул регулируется доступностью энергетических субстратов, причем при незначительном изменении в концентрации субстрата происходит либо торможение мейоза, либо его стимулирование [3].

Моделирование систем дозревания ооцита – одна из важнейших задач в области клеточной репродуктивной технологии. Известно, что созревание фолликулов и ооцитов в яичниках млекопитающих находится под контролем многочисленных факторов, поступающих в них из кровеносной системы или синтезируемых в яичниках [4]. Гормоны гипофиза и гипоталамуса (гонадотропин-рилизинг-гормон, фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны, прогестерон, эстрадиол 17 β) являются главными регуляторами овариальной функции [5].

Известно, что в поддержании роста и питания клеток важную роль играет сыворотка за счет находящихся в ней белков, аминокислот, предшественников нуклеиновых кислот, и витаминов. Кроме того, в естественном половом цикле при созревании ооцитов до стадии оплодотворения решающую роль играют гонадотропин-релизинг гормоны, способствующие выделению гормонов, в том числе фолликулостимулирующего и лютеинизирующего [6, 7].

В последние годы в сельском хозяйстве, как нашей страны, так и за рубежом, широко применяются фитогормоны и их синтетические аналоги в качестве ростовых стимуляторов, которые обладают достаточно большой биологической активностью при низких концентрациях.

Материалы и методы исследований. Исследования выполнены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству».

Яичники получали на Минском, Борисовском мясокомбинатах и убойном цехе ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области после убоя животного путем отсекания 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 термосе. Перед извлечением яйцеклеток яичники дважды промывали солевым раствором с добавлением антибиотиков. Извлечение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичников лезвием безопасной бритвы в чашке Петри, причем в рабочий раствор добавляли 10 ед./мл гентамицина, 1 ед./мл гепарина и 1 % инактивированной фетальной сыворотки. 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.

Затем клетки помещали в среду для созревания ТС-199 с добавлением эстральной сыворотки суперовулировавших коров, фетальной сыворотки крупного рогатого скота, бычьей сыворотки, 25мМ/л буфера Hepes, 10ед./мл гентамицина, сурфагона и эпибрассинолида в различных концентрациях. В своих исследованиях мы использовали сыворотку крови быков в возрасте 18 мес., изготовленную в условиях лаборатории, а также фетальную и эстральную сыворотку коров. Сыворотку добавляли в количестве 5–15 % к среде ТС-199. С целью преодоления блока дробления на стадии 8–16 клеток на третьи сутки культивирования в среду, содержащую бычью сыворотку, вводили 5% эстральной или фетальной сыворотки. Сурфагон добавляли в дозе 0,02 нг/мл к среде для созревания. В качестве контроля служила среда без добавления Гн-РГ. Эпибрассинолид добавляли к культуральной среде в количестве 2×10^{-4} ; 2×10^{-6} ; 2×10^{-7} ; 2×10^{-8} ; 2×10^{-9} моль/л. Контролем служила разработанная нами среда для созревания ооцитов. Созревание ооцитов проводили при температуре 39°C, содержании 5% CO₂ в воздухе, максимальной влажности под минеральным маслом в течение 24 часов. Затем ооциты оплодотворяли замороженно-оттаянной спермой, прошедшей капацитацию, в среде для оплодотворения эмбрионов. Среды были сбалансированы по концентрации водородных ионов (рН 7.2–7.4) и осмолярности (280–285 мОсм/кг). Эмбрионы культивировали под минеральным маслом, предварительно уравновешенным средой для культивирования. На 4-е сутки инкубирования вводили сыворотку в количестве 10 % по отношению к объему среды в качестве дополнительного питания зародышей. Инкубация эмбрионов продолжалась 7–10 дней.

Эффективность оогенеза при получении преимплантационных зародышей вне организма определялась по уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей.

Дополнительным тестом созревания ооцитов служили измерения уровня глутатиона (GSH) и АТФ. Концентрацию GSH в ооцитах определяли модифицированным методом S. Sedlak. К 200 мкл суспензии ооцитов добавляли 5 мкл 20% ТХУ, быстро перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин. К 200 мкл полученного супернатанта добавляли 400 мкл 0,5 мМ Na-фосфатного буфера (рН 8,0). Измерение оптической плотности пробы проводили до и через 5 мин после добавления 50 мкл 10^{-3} М ДТНБ на спектрофотометре Spocol при длине волны 412 нм.

С целью повышения оплодотворяющей способности спермы при ее созревании воздействовали лазерным излучением с частотой 5 и 10 Гц в течение 10 и 20 сек или поляризованным светом в течение 10 сек для повышения жизнеспособности спермы в условиях *in vitro*. С этой целью использовали магнитно-лазерный аппарат «Вектор-03» и лампу поляризованного света «Биоптрон». Оплодотворение созревших ооцитов проводили в условиях CO₂-инкубатора в течение 20 часов.

Результаты исследований. Введение в среду ТС-199 фетальной, эмбриональной и бычьей сывороток позволило получить уровень созревания от 81,9 до 84,1 %, уровень дробления 32,8–44,9 % и выход эмбрионов на преимплантационных стадиях 14,7–17,4 % (табл. 1).

1 Влияние типа сыворотки на оогенез ооцитов крупного рогатого скота

Используемая сыворотка	Количество ооцитов, n	Созрело до метафазы II, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
Бычья сыворотка (БС)10%	61	50–81,9	20–32,8	9–14,7
Фетальная сыворотка (ФС)15%	63	52–82,5	22–34,9	10–15,9
Эстральная сыворотка (ЭС)15%	69	58–84,1	31–44,9	12–17,4
БС+ФС5%	62	51–82,3	22–35,5	10–16,1
БС+ЭС5%	58	48–82,8	26–44,8	10–17,2

Примечание. Последние две строки – фетальная и эстральная сыворотка добавлены на 3-й день культивирования

Исследования показывают, что при применении бычьей сыворотки до метафазы II созрело 81,9 % ооцитов, поставленных на культивирование, при этом уровень дробления составил 32,8 %, а выход морул-бластоцист 14,7 %.

При применении фетальной или эстральной сыворотки через 24 часа созрело до метафазы II 82,1 и 84,1 % ооцитов, что незначительно превысило данный показатель в предыдущей группе – на 0,6 и 2,2 % соответственно. В то же время уровень дробления при применении фетальной сыворотки был выше по сравнению с бычьей на 2,1 %, а при применении эстральной – на 12,1 %. Показатели выхода преимплантационных эмбрионов находились в аналогичной зависимости: использование фетальной сыворотки увеличивало их выход на 1,2 %, а эстральной – 2,7 %. Дополнительное введение в среду культивирования зародышей, содержащую бычью сыворотку, эстральной или фетальной сыворотки на 3-й день культивирования позволяет увеличить уровень дробления на 2,7–12,0 %, а выход морул-бластоцист – 1,4–2,5 % по сравнению с группой, культивировавшейся с применением только бычьей сыворотки.

Таким образом, применение бычьей сыворотки в комплексе с эмбриональной или фетальной сыворотками позволило получить уровень дробления 35,5–44,8 %, а выход эмбрионов на стадии морула-бластоциста составил 16,1–17,2 % при культивировании ооцитов вне организма, что соответствует показателям культивирования в средах с эмбриональной и фетальной сыворотками.

Влияние гонадотропин-релизинг гормона (сурфагона) на эффективность созревания ооцитов при культивировании вне организма показано в таблице 2.

Исследования показали, что применение сурфагона в среде для созревания ооцитов способствовало повышению уровня созревания на 6,6 %, а выход дробящихся зародышей после оплодотворения увеличился на 2,5 % по сравнению с контрольной группой. При этом выход морул-бластоцист увеличился на 3,2 % и составил 17,9 % от числа выделенных ооцитов.

2 Результаты созревания ооцитов при включении в среду релизинг-гормона

Среда	Количество ооцитов, n	Созрело до метафазы II, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
Контроль	75	62–82,7	32–42,7	11-14,7
Опыт (сурфагон)	84	75–89,3	38–45,2	15-17,9

Таким образом, применение гонадотропин-релизинг гормона в средах для созревания ооцитов способствует повышению выхода созревших до стадии метафаза II яйцеклеток. По всей видимости, добавление в культуральную среду выше названного гормона способствует регуляции процессов роста и развития ооцит-кумулясных комплексов и их дружному созреванию до стадии метафаза II.

В своих исследованиях мы изучали влияние эпибрассинолида (синтетического стероидного фитогормона) на созревание ооцит-кумулясных комплексов коров вне организма (табл. 3). В результате исследований установлено, что высокая концентрация эпибрассинолида 2×10^{-4} моль/л позволила получить 42,2 % дробящихся зародышей и лишь 4,4 % зародышей, пригодных для трансплантации, 57,8 % клеток оказались неоплодотворенными. Снижение содержания фитогормона до 2×10^{-6} и 2×10^{-7} моль/л в культуральной среде положительно повлияло на уровень дробления – 48,6 % и 46,4 %, выход морул-бластоцист увеличился на 6,4 и 9,8 % соответственно.

Дальнейшее снижение концентрации гормона до 2×10^{-8} моль/л позволило получить 55,0 % дробящихся клеток и 16,2 % зародышей на стадии морула-бластоциста, что оказалось выше на 1,7 % и 1,2 % по сравнению с контролем соответственно. При содержании эпибрассинолида 2×10^{-9} моль/л наметилось незначительное снижение показателей.

3. Влияние эпибрассинолида на эффективность созревания ооцитов крупного рогатого скота вне организма

Концентрация эпибрассинолида, моль/л	Поставлено на культивирование ооцитов, n	Результаты созревания		
		Неоплодотворенных яйцеклеток, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
2×10^{-4}	45	26-57,8	19-42,2	2-4,4
2×10^{-6}	37	19-51,4	18-48,6	4-10,8
2×10^{-7}	56	30-53,6	26-46,4	8-14,2
2×10^{-8}	80	36-45,0	44-55,0*	13-16,2**
2×10^{-9}	71	34-47,9	37-52,1	11-15,5**
Контроль	60	28-46,7	32-53,3	9-15,0**

Примечание. ** P<0,01; *P<0,05

Таким образом, синтетический фитогормон эпибрассинолид может быть использован в качестве биологически активного фактора при получении ранних зародышей вне организма в концентрациях 2×10^{-7} – 2×10^{-9} моль/л, что позволит получать 46,4–55,0 % дробящихся клеток и 14,2–16,2 % преимплантационных эмбрионов.

Проведена оценка влияния вышеуказанных соединений на уровень внутриклеточного глутатиона при культивировании ооцит-кумулюсных комплексов. Жизнеспособность ооцитов оценивали с помощью 0,1 % трипанового синего. При этом доля живых клеток в среде с сурфагоном была не менее 95 %, а в среде с эпибрассинолидом – 80 %. Как видно из рисунка, при добавлении в культуральную среду сурфагона или эпибрассинолида повышается концентрация GSH в ооцитах, в то время как в клетках, которые культивировали в среде без добавок, уровень GSH составлял 1,5 мкМ/ооцит. Тем не менее, эта концентрация была значительно выше концентрации GSH в нативных ооцитах (0,08 нМ/ооцит). При добавлении в среду культивирования ооцитов 0,02 нг/мл сурфагона, концентрация GSH значительно возросла и достигала 9,6 мкМ на одну клетку и была в 6 раз выше концентрации GSH в ооцитах контрольной пробы (1,5 мкМ/ооцит). При добавлении в среду ТС-199 2×10^{-8} моль/л эпибрассинолида уровень GSH достигал только 2,6 мкМ/ооцит, тем самым в 1,7 раза превышал содержание GSH в ооцитах, которые культивировали в среде без гормональных добавок.

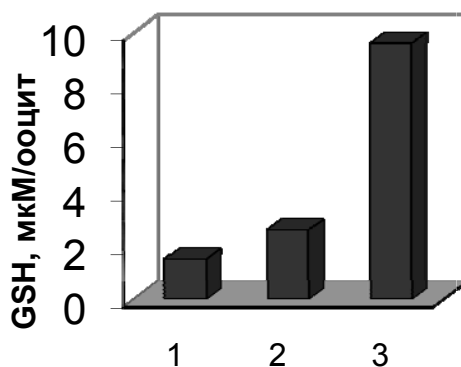


Рис. Содержание GSH в ооцитах, культивированных в среде ТСМ-199 без (1) и в присутствии эпибрассинолида (2, концентрация гормона 2×10^{-8} моль/л) и сурфагона (3, концентрация гормона 0,02 нг/мл и)

Таким образом, добавление в среду культивирования гормональных добавок увеличивает глутатионовый статус ооцитов за счет увеличения концентрации восстановленного глутатиона. При этом эффективность влияния сурфагона на жизнеспособность и уровень внутриклеточного восстановленного глутатиона культивированных вне организма ооцитов

более выражена, в связи с чем, именно этот гормон можно рекомендовать в качестве дополнительной добавки к среде культивирования.

Влияние лазерного излучения на эффективность капацитации замороженно-оттаянной спермы крупного рогатого показана в таблице 4.

4. Влияние лазерного излучения на эффективность капацитации замороженно-оттаянной спермы крупного рогатого скота

Время воздействия лазерного облучения, сек	Частота лазерного воздействия, Гц	Всего оплодотворено клеток, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
10	5	34	15–44,1	5–14,7
20	5	12	–	–
10	10	32	8–25,0	–

Изучено влияние направленного поляризованного света на оплодотворяющую способность спермиев крупного рогатого скота при получении эмбрионов вне организма (табл. 5).

5 Влияние направленного поляризованного света на эффективность капацитации замороженно-оттаянной спермы крупного рогатого скота

Сроки воздействия поляризованным светом	Всего оплодотворено клеток, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
После swim-up процедуры	24	6–25,0	4–16,7
Перед оплодотворением	31	17–54,8	4–12,9

В результате исследований установлено, что воздействие поляризованного света в течение 10 сек видимых изменений таких показателей, как подвижность и уровень агрегации не вызывало. В то же время при обработке спермы после swim-up процедуры выход дробящихся эмбрионов составил 25,0 % от числа поставленных на культивирование (6 из 24), из них 16,7 % развились до ранней морулы. При воздействии поляризованным светом на сперму после её капацитации было получено 17 дробящихся зародышей, что составило 54,8 %. Однако выход зародышей на преимплантационных стадиях в данном опыте был ниже и составил 12,9 % от числа оплодотворенных.

Таким образом, воздействие поляризованного света на сперматозоиды после swim-up процедуры более эффективно по сравнению с воздействием на неё сразу после их созревания.

Выводы. 1. Применение бычьей сыворотки в комплексе с эмбриональной или фетальной сыворотками при культивировании ооцитов вне организма позволило получить 35,5–44,8 % дробящихся клеток и 16,1–17,2% эмбрионов на стадии морула-бластоциста.

2. Добавление 0,02 нг/мл гонадотропин-рилизинг гормона (сурфагона) в среду для созревания ооцитов за счет регуляции процессов роста и развития ооцит-кумулусных комплексов способствует повышению выхода созревших до стадии метафаза II яйцеклеток до 89,3 %. При этом выход дробящихся зародышей после оплодотворения увеличился на 2,5 % по сравнению с контролем и составил 45,2 %.

3. Синтетический фитогормон эпибрассинолид может быть использован в качестве биологически активного фактора при получении ранних зародышей вне организма в концентрациях 2×10^{-7} - 2×10^{-9} моль/л, что позволит получать 46,4–55,0 % дробящихся клеток и 14,2–16,2 % преимплантационных эмбрионов.

4. Использование лазерного излучения и направленного поляризованного света при капацитации спермы в условиях *in vitro* позволяет получать 14,7–16,7 % морул-бластоцист от числа поставленных на культивирование ооцитов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Валюшкин, К. Д. Ученые записки / К. Д. Валюшкин. – Витебск, 2004. – С. 105–107.

2. Кузьмина, Т. И. Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных : материалы 2-й Междунар. конф. (19–20 ноября 2002 г., ВИЖ) / Т. И. Кузьмина. – 2002, Дубровицы. – С. 52–57.

3. Sutton, M. L. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity / M. L. Sutton, R. B. Gilchrist, G. Thompson // *Human Reprod. Update*. – 2003. – Vol. 9. – № 1. – P. 35–48.

4. Лебедева, И. Ю. Участие клеток гранулозы в опосредовании действия пролактина и соматропина на ооцит-кумуляные комплексы коров in vitro / И. Ю. Лебедева, Т. В. Кабардина, Т. И. Кузьмина // *Цитология*. – 2005. – № 10. – С. 882–887.

5. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Дж. Уотсон. – М.: Мир, 1987. – Т. 1. – 231 с.

6. Роль метаболических гормонов в регуляции функции яичников у коров / А. В. Лебедев, И. Ю. Лебедева, Т. И. Кузьмина, И. Шапиев // *Сельскохозяйственная биология*. – 2005. – № 2. – С. 14–20.

7. Сметанина, И. Г. Влияние некоторых экзогенных факторов на созревание ооцитов крупного рогатого скота IN VITRO : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / И. Г. Сметанина. – Боровск, 2001. – 27 с.

REFERENCES

1. Valyushkin, K. D. 2004. *Uchenye zapiski – Scientific Notes*. Vitebsk. 105–107.

2. Kuz'mina, T. I. 2002. *Sovremennye dostizheniya i problemy biotekhnologii s.-kh. zhivotnykh : materialy 2-y Mezhdunar. konf. (19–20 noyabrya 2002 g., VIZh) – Modern achievements and problems of agricultural Biotechnology animals: Proceedings of the 2nd Intern. Conf. (19-20 November 2002 AUIAB*. Dubrovitsy. 52–57.

3. Sutton, M. L., R. B. Gilchrist, and G. Thompson. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reprod. Update*. 9 (1):35–48.

4. Lebedeva, I. Yu., T. V. Kabardina, and T. I. Kuz'mina. 2005. Uchastie kletok granul'ozy v oposredovanii deystviya prolaktina i somatropina na ootsit-kumulyusnye komplekсы korov in vitro – Participation in mediation activities granulocyte cells, prolactin and somatropin on oocyte-kumulus complexes of cows in vitro. *Tsitologiya – Cytology*. 10:882–887.

5. Alberts, B., D. Brey, Dzh. L'yuis, M. Rjeff, K. Roberts, Dzh. Uotson. 1987. *Molekulyarnaya biologiya kletki – Molecular cell biology*. Moskow, Mir, 1, 231.

6. Lebedev, A. V., I. Yu. Lebedeva, T. I. Kuz'mina, and I. Shapiev. 2005. Rol' metabolicheskikh gormonov v regulyatsii funktsii yaichnikov u korov – The role of metabolic hormones in the regulation of ovarian function in cows. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya – Agricultural biology*. 2:14–20.

7. Smetanina, I. G. 2001. Vliyanie nekotorykh ekzogennykh faktorov na sozrevanie ootsitov krupnogo rogatogo skota IN VITRO – Influence of some exogenous factors on the maturation of oocytes in cattle IN VITRO. *Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk*. Borovsk, 27.

