

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ВЫХОД ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА IN VITRO

А.И. Ганджа, Л.Л. Леткевич, В.П. Симоненко
РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»

Установлена зависимость оплодотворения ооцитов и выхода дробящихся зародышей от времени совместного культивирования ооцитов со спермиями, от объема и вида используемой среды и плотности размещения ооцитов на мм².

ооциты, зародыши, спермии, дробление, оплодотворение, питательная среда

Культивирование и оплодотворение ооцитов коров означает, что последовательность очень сложных физиологических процессов, протекающих *in vivo* в динамически изменяющейся среде, должны проходить *in vitro* в относительно простых и статических условиях. В искусственных условиях этот процесс протекает по следующей схеме: извлечение ооцитов, их культивирование, капацитация сперматозоидов, оплодотворение ооцитов, культивирование эмбрионов [1, 4-6].

Известно, что для успешного оплодотворения ооцитов, сперматозоиды млекопитающих проходят процесс созревания или капацитации. В естественных условиях это происходит в половых путях самок и заключается в изменении характера плавательной активности и преобразовании строения клеточных мембран на головке спермиев. Эти преобразования состоят в удалении поверхностной оболочки спермиев, а также в обеспечении исходно неподвижных половых клеток необходимыми веществами для придания им плавательной активности. Окончательной стадией преобразования спермиев (фаза капацитации) при постановке опытов *in vitro* можно считать приобретение ими оплодотворяющей способности [2-3, 7].

В связи с вышесказанным целью наших исследований явилось изучение влияния условий культивирования на выход ранних эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*.

Методика исследований. Исследования были проведены в лаборатории генетики с.-х. животных РУП «Институт животноводства НАН Беларуси».

Яичники коров доставляли с Минского мясокомбината в лабораторию генетики с.-х. животных в растворе Хенкса. Выделение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичника лезвием безопасной бритвы в среде с добавлением 1% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 ед/мл гентамицина и 1 ед/мл гепарина. Дозревание ооцит-кумуляусных комплексов проходило в инкубаторе с 5% CO₂ в атмосфере при максимальной влажности и температуре 38°C в среде TC-199 (Sigma) с добавлением 25мМ/л буфера Hepes, 10 ед/мл гентамицина и 15% сыворотки плодов коровы. Капацитацию спермы проводили по методу swim up. Оплодотворе-

ние яйцеклеток осуществляли в каплях среды для оплодотворения под слоем минерального масла, после чего зиготы помещались для дальнейшего развития в среду ТС-199 с 15% эмбриональной сыворотки.

Для изучения эффективности пенетрации ооцитов в зависимости от времени совместной инкубации мы использовали различные временные рамки совместной инкубации ооцитов со спермой: 3 ч.; 3,1-6 ч.; 6,1-9 ч.; 9,1-12 ч.; 12,1-15 ч.; 15,1-18 ч.; 18,1-20 ч.; 20,1-24 ч.

Изучение уровня оплодотворяемости яйцеклеток в культуре *in vitro* в зависимости от объема среды проводили в чашках с разным объемом питательной среды: 3; 0,5 и 0,3 мл.

Для изучения эффективности оплодотворения ооцитов в зависимости от количества клеток на единицу площади мы использовали чашки с разной площадью и проанализировали плотность посадки, которая составила: 0,05; 0,04; 0,1; 0,2; 0,3 ооцита на мм².

Оплодотворение ооцитов проводили в следующих средах: ТС-199, Тироде, Тироде модифицированная, Игла.

Все манипуляции с ооцитами, оценку активности сперматозоидов, стадий развития и качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота осуществляли под микроскопом МБС – 10 при увеличении в 60 крат.

Результаты исследований. Для успешного оплодотворения и дальнейшего развития ранних зародышей важное значение имеет время совместного инкубирования ооцитов со сперматозоидами.

Оплодотворяемость ооцитов находится в прямой зависимости от продолжительности их совместного культивирования со спермиями (табл. 1). Так, при трехчасовом культивировании спермиев с ооцитами получено 14,9% дробящихся зародышей, из них 19,2% морул-бластоцист, что составило 2,8% от общего количества использованных в опыте ооцитов.

1. Выход жизнеспособных эмбрионов в зависимости от продолжительности оплодотворения

Продолжительность совместной инкубации спермы с ооцитами, ч.	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления		Выход Мо-ВІ	
		n	%	n	%
3,0	174	26	14,9	5	19,2
3,1-6,0	187	32	17,1	6	18,7
6,1-9,0	180	50	27,8	11	22,0
9,1-12,0	191	62	32,5	20	32,2
12,1-15,0	160	64	40,0**	19	29,7
15,1-18,0	171	81	47,4***	26	32,1
18,1-20,0	204	117	57,4***	43	36,8
20,1-24,0	157	86	54,8***	25	29,1

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Увеличение времени совместного инкубирования клеток до 6 и 9 часов повысило оплодотворяемость ооцитов на 2,2 и 12,9%, выход морул - бластоцист по отношению к количеству оплодотворенных клеток остался на прежнем уровне – 18,7; 22,0%, что составило 3,2 и 6,1% от всех ооцитов

данных опытных групп. Дальнейшее возрастание продолжительности пребывания спермиев и яйцеклеток в одной чашке до 12 и 15 часов позволило получить 32,5 и 40% ($P<0,01$) дробящихся зародышей, из них 32,2 и 29,7% эмбрионов на преимплантационных стадиях, что соответствует 10,5 и 11,8% от общего количества поставленных на культивирование клеток. При 18-ти часовом инкубировании оплодотворилось 47,4% ($P<0,001$) яйцеклеток, из них получено 32,1% Мо-ВІ – 15,2% от всех клеток в группе. Наиболее оптимальным является время 18,1-20,0 часов. В данном случае получено 57,4% ($P<0,001$) дробящихся зародышей, из них 37,6% Мо-ВІ, что составило 21% от всех ооцитов в группе.

Дальнейшее увеличение времени совместного культивирования до 24 часов снизило на 2,6% количество оплодотворенных ооцитов и на 8,5% Мо-ВІ. Выход ранних зародышей на преимплантационных стадиях по отношению к общему количеству поставленных в опыте ооцит-кумулусных комплексов снизился на 5,1%.

Таким образом, продолжительность совместного культивирования сперматозоидов с яйцеклетками в синтетических питательных средах должна составлять 18-20 часов, что позволяет получать 57,4% дробящихся клеток и 36,8% зародышей на стадии морула-бластоциста.

На следующем этапе исследований нами изучалось влияние объема среды на оплодотворяемость ооцитов. Наилучший уровень дробления оказался в группе ооцитов культивировавшихся в 0,5 мл. среды (табл. 2).

Он составил 61,7%, что на 7,2 и 13,7% превышает аналогичный показатель в группах ооцитов с объемом среды для культивирования 3,0 мл. и 0,3 мл соответственно.

Что касается выхода жизнеспособных зародышей, то результаты выглядят следующим образом.

2. Влияние объема среды на пенетрацию ооцитов

Объем среды, мл	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления		Выход Мо-ВІ	
		n	%	n	%
3,0	132	72	54,5	13	18,1
0,5	68	42	61,7	7	16,6
0,3	104	54	48,0	8	14,8

Так, самый высокий выход морул-бластоцист (18,1%) наблюдался в группе ооцитов культивировавшихся в 3,0 мл. среды, что на 1,5 и 3,3% выше по отношению к другим группам. В группе ооцитов, помещенных в 0,3 мл питательной среды, наблюдался низкий выход морул-бластоцист при относительно высоком уровне дробления (48%). По видимому, малые объемы питательной среды не обеспечивают в достаточной степени интенсивность метаболизма дробящихся эмбрионов.

Таким образом, для проведения работ по получению ранних эмбрионов вне организма необходимо использовать синтетическую среду в объеме не менее 0,5 мл, что позволяет получать 54,5-61,7% дробящихся зародышей.

В процессе исследований нами также изучалось влияние количества клеток помещенных на единицу площади (табл. 3). Наилучшие результаты получены в группах с плотностью посадки 0,04 и 0,05 ооц/мм².

3. Зависимость оплодотворяемости ооцитов от количества клеток на единицу площади

Плотность посадки, ооц/мм ²	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления		Выход Мо-ВІ	
		n	%	n	%
0,04	84	45	53,6	10	22,2
0,05	48	25	52,1	6	24,0
0,1	24	11	45,8	2	18,2
0,2	71	36	50,1	7	9,4
0,3	53	26	49,1	5	19,2

Так, уровень дробления в них составляет 53,6 и 52,1% соответственно. Аналогичные показатели получены и по выходу жизнеспособных эмбрионов. Так выход полноценных зародышей в группе с плотностью посадки 0,05 ооц/мм² составил 24,0%, что на 1,8% больше по отношению к группе с 0,04 ооц/мм², на 4,8% по отношению к группе с 0,3 ооц/мм², а также на 5,8 и 14,6% к группам с 0,1 и 0,2 ооц/мм² соответственно. Плотность размещения на 1 мм² от 0,1 до 0,3 ооцитов оказала негативное влияние на процессы пролиферации ооцит-кумулюсных комплексов, несмотря на то, что оплодотворяемость клеток находилась на уровне 45,8-50,1%. Выход морул-бластоцист составил 8,3-9,8% от общего количества ооцитов, поставленных на культивирование в группах.

Таким образом, оптимальной плотностью является размещение 0,04-0,05 клеток на 1 мм², что позволяет получать 52,1-53,6% дробящихся зародышей с выходом 11,9-12,5% морул-бластоцист от поставленных на инкубацию ооцит-кумулюсных комплексов.

В процессе оплодотворения вне организма огромное значение придается составу и качеству питательной среды, в которой происходит совместное инкубирование ооцитов и сперматозоидов.

Для исследований нами было использовано 4 среды: ТС-199, Тироде, Тироде модифицированная и среда Игла (табл. 4). Наилучший результат показали среды Тироде и Тироде модифицированная. Так уровень дробления в них составлял 26,7% и 24,6%, соответственно, против ТС-199 – 12,8% и среды Игла – 15,4%, а выход жизнеспособных эмбрионов 21,1% и 25,5%, соответственно, против ТС-199 – 8,0%, и среды Игла – 6,7%.

4. Оплодотворение ооцитов в различных средах

Среды	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления		Выход Мо-ВІ	
		n	%	n	%
ТС – 199	195	25	12,8	2	8,0
Тироде	195	52	26,7	11	21,1
Тироде модифицированная	195	48	24,6	12	25,5
Игла	195	30	15,4	2	6,7

Таким образом, использование синтетических питательных сред Тироде и Тироде-М способствует оплодотворению 24,6-26,7% яйцеклеток с выходом 21,1-25,5% жизнеспособных эмбрионов.

Выводы:

1. Продолжительность совместного культивирования спермиев с яйцеклетками в синтетических питательных средах должна составлять 18-20 часов, что позволяет получать 57,4% дробящихся клеток и 21% зародышей на стадии морула-бластоциста.

2. Объем синтетических питательных сред в культуре *in vitro* должен быть не менее 0,5 мл, это способствует дроблению 54,5-61,7% клеток, поставленных на культивирование.

3. Оптимальной плотностью является размещение 0,04-0,05 клеток на 1 мм², что позволяет получать 52,1-53,6% дробящихся зародышей с выходом 11,9-12,5% морул-бластоцист от поставленных на инкубацию ооцит-кумулясных комплексов.

4. Использование синтетических питательных сред Тироде и Тироде-М способствует оплодотворению 24,6-26,7% яйцеклеток с выходом 21,1-25,5% жизнеспособных эмбрионов от количества дробящихся клеток.

Библиографический список

1. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Оплодотворение: Биология. Изд-во. «Мир», 1993. – С. 146-147.
2. Кесян А. З. Разработка условий для обеспечения развития и кроконсервации эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro*: Автореф. дис... канд. биол. наук: /М., 1993. – С. 13-15.
3. Оплодотворение ооцитов млекопитающих вне организма / Клинский Ю. Д., Истомина Л. А., Шихов И. Я. И. и др. Сельское хозяйство за рубежом. – 1984: №3. – С. 49 – 53.
4. Маленко Г. П. Получение ранних зародышей крупного рогатого скота при созревании и оплодотворении ооцитов вне организма // Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных: Тез. докл. междунар. конф. – Боровск, – 1980. С. 127 – 128.
5. Bedford J. M. Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa //Journal Agricultural Reproduction.– 1968.– Vol. 18. – P. 125.
6. Chian R., Park C., Sirard M. Cumulus cells act as sperm trap during *in vitro* fertilization of bovine oocytes //Theryogenology. – 1996. – P. 258.
7. The influence of sperm-oocyte incubation time and breed of bull on *in vitro* embryo development in cattle. Sumatri C., Ooe M., Saha S., Boedino A. //Theryogenology. – 1996. – vol. 45. - № 1. – P. 269.

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ВИХІД ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ *IN VITRO*

*А.І. Ганджа, Л.Л.Леткевич, В.П.Симоненко
РУП «Інститут тваринництва НАН Білорусі»*

Визначена залежність запліднення ооцитів і виходу зародків у стані дроблення від часу спільного культивування ооцитів зі сперміями, від об'єму і виду середовища та

компактності розміщення ооцитів на 1 мм².

CULTIVATION CONDITIONS IMPACT ON THE CATTLE EMBRYOS IN-VITRO YIELD

A.I.Gandja, L.L.Letkevitch, V.P.Simonenko

The institute of animal science. NAS. Byelorussia

Oocyte fertilization and splitting embryos output were subject to the spell of mutual oocyte cultivation with semen's, the capacity and type of the agent ant density of oocytes on mm².

УДК 636.32/.38:591.3:57.089.38

**ВПЛИВ ФІДЕРНИХ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВОДІВ НА
ДОЗРІВАННЯ ЕМБРІОНІВ ОВЕЦЬ ДО
ТРАНСФЕРАБЕЛЬНИХ СТАДІЙ**

**І.І. Гевкан, О.В. Штапенко, А.В. Мадіч, Ю.І. Сливчук, І.І. Розгоні,
С.В. Федорова**

Інститут біології тварин УААН

Проведено дослідження з удосконалення технологій запліднення in vitro ооцитів овець використовуючи фідерні клітини яйцепроводів корів з метою подолання блоку дроблення ембріонів овець, підвищення інтенсивності дроблення бластомерів та розвитку ембріонів до трансферабельних стадій. Досліджували вплив кріоконсервації ОКК методом вітрифікації на дозрівання і запліднення in vitro.

**вівці, фідерні клітини, ооцити, ембріони, капацитація сперми,
запліднення**

Відновлення поголів'я овець є перспективним і економічно вигідним завданням, яке можливе за умов реалізації комплексу організаційно-господарських заходів направлених на збільшення виробництва м'яса, що можливо завдяки впровадженню у практику передових наукових технологій.

Створення нових генотипів м'ясо-вовнової породи овець, які відповідали б вимогам інтенсивного виробництва високоякісної баранини, можливе із використанням методів репродуктивної біотехнології, до яких відносяться *in vitro* запліднення дозрілих ооцитів, створення банку сперми м'ясних порід овець, кріоконсервованих ооцитів та ембріонів і хірургічна трансплантація ембріонів овець, отриманих *in vitro*. Подальший розвиток методів репродуктивної біотехнології спрямований на розробку технологій запліднення дозрілих, лапароскопічно одержаних, ооцитів фракціонованою спермою, їх кріоконсервацію і трансплантацію, що може суттєво підвищити темпи розвитку цієї галузі тваринництва завдяки наведеному одержанню баранів-плідників м'ясо-вовнового типу.

Видова специфічність ооцитів овець сприяє результативному створенню клітинних ядерно-цитоплазматичних гібридів, їх розвитку у синтетичних середовищах, приживленню в організмі реципієнта та народженню життєздатних тварин, по розвитку яких можна судити про доцільність тих