

УДК 636.2:612.64.089.67

Л. В. ГОЛУБЕЦ, М. П. СТАРОВОЙТОВА

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*
В УСЛОВИЯХ РАЗНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ CO₂ В АТМОСФЕРЕ**

Гродненский государственный аграрный университет

(Поступила в редакцию 28.07.2009)

В настоящее время в Республике Беларусь все более важное значение приобретают интенсивные пути развития молочного скотоводства, базирующиеся на последних достижениях науки в области генетики и биологии животных, которые позволили теоретически обосновать и разработать основные направления развития селекции, воспроизводства и разведения крупного рогатого скота на основе молекулярной биологии.

Результатом этой работы явилось все более широкое внедрение в практику животноводства всех без исключения стран с развитым молочным скотоводством такой прогрессивной технологии ускорения селекционных процессов, повышения их качества, максимального использования потенциала племенных животных, как трансплантация эмбрионов [1]. В настоящее время в странах Западной Европы и США более 60% быков-производителей на станциях искусственного осеменения получены именно этим методом [2].

Однако в связи с рядом объективных причин, в первую очередь в связи с производством экологически чистой продукции, все большее значение приобретает оплодотворение половых клеток (яйцеклеток) крупного рогатого скота вне организма (в культуре *in vitro*), базирующееся на их способности инициировать мейоз при создании соответствующих условий [3]. Использование данной технологии исключает гормональную обработку животных, не нарушает половой цикл донора, не увеличивает продолжительность сервис-периода, сокращает затраты [4]. Оплодотворение созревших яйцеклеток вне организма (*in vitro*) позволяет получать эмбрионы на ранних стадиях развития, а их пересадка реципиентам – возможность получать племенной молодняк для поставки на элевтеры и продажи племпредприятиям как Гродненской области, так и организациям других регионов республики.

Таким образом, перечисленные выше биотехнологические направления интенсификации использования генетического ресурса высокопродуктивного скота, имеющегося в области и республике, дополняя и расширяя друг друга, должны стать неотъемлемым звеном повышения эффективности селекции, расширения возможностей использования репродуктивного и генетического потенциала не только быков-производителей, но и материнского стада, что крайне важно для Гродненской области, располагающей высоким генетическим потенциалом крупного рогатого скота, современными технологиями производства молока, кормления и содержания животных.

В связи с вышеизложенным внедрение в практику эффективных методов ускоренного размножения генетически ценных животных крайне актуально, особенно если учитывать тот факт, что продуктивная жизнь коровы в условиях современных интенсивных технологий не превышает 3–4 лактаций. Использование биотехнологических методов позволит увеличить этот показатель не только по производству молока, но и по получению племенного молодняка на 2–3 порядка.

Как показали предварительные исследования, использование технологии получения эмбрионов *in vitro* позволяет получать до 55–60% дробящихся зародышей, обеспечивает выход до 20%

эмбрионов на предимплантационной стадии (пригодных к пересадке) с их приживляемостью после пересадки реципиенту на уровне 50% [5, 6].

Данные исследования позволят расширить знания о фолликуло- и эмбриогенезе у крупного рогатого скота на ранних стадиях, а также послужат базой для проведения работ по ДНК-технологиям, подтверждения происхождения потомства на уровне ДНК, создания трансгенных животных, продуцентов биологически чистых и экологически безопасных медицинских препаратов, могут способствовать выявлению наследственных заболеваний на уровне эмбриона [7].

Однако, несмотря на определенные успехи в данной области исследований, эффективность получения биологически полноценных эмбрионов в системе *in vitro* остается на сравнительно невысоком уровне. По некоторым данным [8] в лучших лабораториях мира выход качественных зародышей (стадия бластоцисты) не превышает 35–40% от числа поставленных на созревание ооцитов, а в среднем этот показатель колеблется от 10 до 20% и зависит от ряда экзо- и эндогенных факторов, к которым в первую очередь относится создание оптимального газового и влажностного режимов культивирования, а также обеспечение растущих и развивающихся клеток необходимыми гормональными и энергетическими добавками.

Состав газовой фазы, используемый при культивировании клеток *in vitro*, определяется тремя факторами: типом среды, использованием открытых или закрытых емкостей, а также необходимой буферной емкостью. Некоторые параметры культивирования могут варьировать, но должно соблюдаться одно неперемное условие – концентрация бикарбоната и углекислого газа должна находиться в равновесии. Этот буфер был выбран главным образом потому, что он соответствует физиологической буферной системе крови, а парциальное давление CO_2 в легких составляет 40 мм рт. ст., что соответствует 5%.

Цель исследования – изучение влияния различных концентраций углекислого газа в атмосфере на процессы созревания и оплодотворения яйцеклеток крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследования. Опыты проводили в биотехнологическом центре по репродукции сельскохозяйственных животных Гродненского государственного аграрного университета в 2006–2009 гг.

Яичники коров получали и доставляли в лабораторию с мясокомбината в бытовом термосе в среде Хенкса с момента убоя животного. После доставки в лабораторию яичники освобождали от жира и соединительной ткани и 2–3 раза промывали солевым раствором Хенкса. Выделение ооцитов (ооцит-кумулюсных комплексов) проводили путем рассечения ткани яичников стерильным лезвием безопасной бритвы в чашке Петри (\varnothing 90) в перечисленном выше солевом растворе или среде с добавлением 1% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 ед/мл гентамицина и 1 ед/мл гепарина. Затем проводили их поиск и морфологическую оценку качества под бинокулярным микроскопом «Olympus» при 30–40-кратном увеличении и помещали в CO_2 – инкубатор «Mermert» в питательной среде для дозревания клеток при температуре 37,8 °С с максимальной влажностью 98%. После 24-часового дозревания ооциты оставляли на совместное инкубирование со сперматозоидами.

Оплодотворение проводили заморожено-оттаянной спермой. Подготовку к оплодотворению проводили путем флотации. Дозу спермы в среде для капацитации ставили в инкубатор на 1 ч для процесса флотации, после которого наиболее активную часть сперматозоидов, всплывшую в верхние слои среды, отбирали и помещали в другую пробирку, где центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осадок снова разбавляли средой для капацитации только с гепарином в концентрации 0,2 мг/мл и центрифугировали в том же режиме. После данной процедуры сперму дважды отмывали в среде для оплодотворения и в концентрации 1 млн/мл сперматозоидов добавляли к ооцитам, находящимся в этой же среде.

Совместную инкубацию спермы и ооцитов осуществляли в течение 18–20 ч при температуре 37,8 °С в атмосфере с 5%-ной концентрацией CO_2 и максимальной влажностью. После совместного инкубирования ооциты отмывали от сперматозоидов и в среде для созревания на монослое кумулюсных клеток снова помещали в CO_2 -инкубатор на 7–9 дней (до получения пригодных для трансплантации эмбрионов).

При культивировании ооцитов концентрацию углекислого газа с момента оплодотворения до получения пригодных эмбрионов снижали с 5,0 до 3,8%. Схема снижения CO₂ выглядела следующим образом: на 1-й и 2-й день культивирования его содержание в окружающей среде составляло 5%, на 3-й – 4,5%, на 4-й – 4,3%, 5-й – 4,0%, 6-й день и последующие – 3,8%.

Питательные среды для созревания, капацитации и оплодотворения были приготовлены по нашим методикам на основе реактивов фирмы Sigma.

Результаты и их обсуждение. Известно, что концентрация углекислого газа в воздухе, окружающем созревающие ооциты и развивающиеся ранние зародыши, оказывает непосредственное влияние на кислотность среды, в которой находятся половые клетки, а значит жизненно важна для создания оптимальных условий культивирования.

Данные о влиянии концентрации углекислого газа в инкубаторе на эффективность созревания и оплодотворения яйцеклеток крупного рогатого скота, а также развитие ранних зародышей до предимплантационной стадии (табл. 1) показали, что количество клеток, вступивших в дробление, во II и III группах находилось практически на одном уровне: 62,3% при 7%-ной концентрации CO₂ и 67,0% при 5%-ной концентрации CO₂. Несколько ниже (54,7%) был получен результат при наличии в воздухе 3%-ной концентрацией CO₂. Общее количество эмбрионов, достигших стадии развития морула – бластоциста (от количества дробящихся), колебалось от 22,2% при наличии в воздухе 7%-ной концентрации CO₂ до 35,3% при 3%-ной, что свидетельствует о менее благоприятном влиянии повышенных концентраций углекислого газа на благополучное развитие зародышей до более поздних стадий, это подтверждает их дальнейшее культивирование. Так, из 82 дробящихся зародышей при условии 3%-ной концентрации CO₂ до стадии бластоциста развилось только 12 (14,6%), при 7%-ной концентрации CO₂ данный показатель находился на уровне 3,7%, в то время как при 5%-ной концентрации газа уровень трансплантации дробящихся клеток в бластоцисты составил 22,4%, из которых 86,7% зародыши отличного качества.

По мере своего развития клетки монослоя так же, как и сами эмбрионы, выделяют в окружающую среду в качестве продукта своей жизнедеятельности углекислый газ и тем самым повышают его концентрацию в окружающей среде. Влияние снижения концентрации CO₂ в атмосфере по мере роста и развития эмбрионов и клеток кумулюса на уровень эффективности культивирования представлено в табл. 2.

Таблица 1. Влияние концентрации CO₂ в воздухе на эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro*

Вариант опыта (концентрация CO ₂)	Количество		Количество зародышей, n (%)				
	опытов	ооцитов	дробящихся, n (%)	в том числе			
				Мо+Бл	в том числе		
					Бл	из них отличных	
Мо+Бл	Бл	Мо+Бл	Бл				
I группа (3%)	5	150	82 (54,7)	29 (35,3)	12 (14,6)	23 (79,3)	12 (100)
II группа (5%)	5	200	134 (67,0)	42 (31,3)	30 (22,4)	34 (80,9)	26 (86,7)
III группа (7%)	5	130	81 (62,3)	18 (22,2)	3 (3,7)	–	–

Таблица 2. Влияние снижения концентрации CO₂ в воздухе по мере роста и развития зародышей

Вариант опыта	Количество		Количество зародышей, n (%)				
	опытов	ооцитов	дробящихся, n (%)	в том числе			
				Мо+Бл	в том числе		
					Бл	из них отличных	
Мо+Бл	Бл	Мо+Бл	Бл				
Контрольная группа	5	150	95 (63,3)	20 (21,0)	7 (7,4)	14 (70,0)	6 (85,7)
Опытная группа	5	170	98 (57,6)	29 (29,6)	14 (14,3)	21 (72,4)	12 (85,7)

Так, при культивировании ооцитов опытной группы концентрация CO₂ снижалась с момента оплодотворения до окончания опыта с 5,0 до 3,8%, в то время как в контрольной группе содержание углекислого газа в воздухе оставалось постоянным – 5,0%.

Как показывает анализ данных, представленных в табл. 2, уровень дробящихся зародышей был несколько выше в контрольной группе на 5,7%. Выход бластоцист в опытной группе превышал контрольную на 6,9%, что свидетельствует о положительном эффекте снижения концентрации CO₂ в воздухе по мере роста и развития ранних зародышей.

Питательная среда представляет собой раствор определенного состава, к которому добавляются компоненты различного биологического происхождения (добавки плазмы, сыворотки крови, тканевые экстракты и т. д.). Минеральные компоненты в этих растворах подбираются так, чтобы они выполняли буферную функцию, поддерживая постоянный кислотно-щелочной баланс среды в процессе культивирования. Постоянство рН является одним из основных условий культивирования. В связи с чем вопрос взаимодействия углекислого газа с различными по составу средами вызывает определенный интерес. В нашем случае это среда ТС-199 и среда Менезо.

Таблица 3. Влияние концентрации CO₂ на эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro* в зависимости от используемых сред

Питательная среда	Концентрация CO ₂ , %	Количество		Количество зародышей, n (%)					
		опытов	ооцитов	дробящихся, n (%)	в том числе				
					Мо+Бл	в том числе			
						Бл	из них отличных		
Мо+Бл	Бл	Мо+Бл	Бл						
ТС-199	3	5	150	48 (32,0)	4 (8,3)	–	–	–	
	4	5	120	42 (35,0)	6 (14,3)	1 (16,7)	4 (66,7)	1 (100)	
	5	5	95	56 (58,9)	12 (21,4)	5 (41,7)	6 (50,0)	3 (60)	
Менезо	3	5	120	49 (40,8)	5 (10,2)	1 (20,0)	2 (40,0)	–	
	4	5	120	45 (37,5)	8 (17,8)	3 (37,5)	5 (62,5)	2 (66,7)	
	5	5	135	79 (58,5)	17 (21,5)	7 (41,2)	15 (88,2)	5 (71,4)	

Анализ данных табл. 3 показывает, что уровень дробления зародышей колебался от 32 до 58,9% при использовании ТС-199 и от 37,5 до 58,5% в присутствии среды Менезо при концентрации CO₂ от 3 до 5%. При этом наиболее высокие результаты, как и в предыдущих опытах, получены при 5%-ной концентрации CO₂ (58,9 и 58,5% соответственно). Что касается выхода бластоцист, то среда Менезо показала более высокую эффективность по сравнению с ТС-199 по мере снижения концентрации CO₂ в воздухе. Так, если при 5%-ной концентрации CO₂ выход бластоцист практически не различался (41,7 и 41,2%), то при концентрации углекислого газа 4% эта разница увеличилась до 20,8%. К сожалению небольшая выборка эмбрионов не позволяет судить о достоверности полученных результатов, однако тенденция увеличения выхода бластоцист очевидна, причем если при 3%-ной концентрации CO₂ с использованием ТС-199 не получено ни одной бластоцисты, то в случае со средой Менезо получена одна бластоциста из 5 морул (20%).

Выводы

1. Оптимальной концентрацией CO₂ в атмосфере культуральной системы является 5%, так как позволяет получать до 22,4% бластоцист от числа дробящихся зародышей.
2. Снижение концентрации углекислого газа по мере роста и развития клеток повышает выход бластоцист (эмбрионов) по сравнению с контролем на 6,9%.
3. Использование среды Менезо показало более высокую эффективность по сравнению с ТС-199 по мере снижения концентрации CO₂ в окружающем воздухе. При 4%-ной концентрации CO₂ выход бластоцист увеличился на 20,8%, при 3%-ной концентрации, в случае использования среды ТС-199, развитие морул до следующей стадии не произошло.

Литература

1. Эрнст, Л. К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст, Н. И. Сергеев. – М.: Агропромиздат, 1989. – 302 с.
2. Культура животных клеток. Методы / пер. с англ.; под ред. Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 333 с.
3. Кузьмина, Т. И. Перспективы использования донорских яйцеклеток коров в новейших технологиях репродукции / Т. И. Кузьмина // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: материалы междунар. науч. конф. – Дубровицы, 2002. – С. 52–57.
4. Kato, H. Effects of follicular fluid and follicular walls on bovine oocyte maturation / H. Kato // Theriogenology. – 1998. – Vol. 49. – N 1. – P. 313.
5. Dewit, A. Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine Cumulus-Oocyte-complexes / A. Dewit, M. L. Cesar // J. Dairy Sci. – 2001. – Vol. 84. – P. 1800–1804.
6. Larocca, C. Effect of follicular fluid from different sized follicles on in vitro development of bovine embryos produced In Vitro / C. Larocca, J. Calvo, G. Roses // Theriogenology. – 1998. – Vol. 49. – N 1. – P. 289.
7. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology / F. A. Ward [et al.] // Theriogenology. – 2000. – Vol. 54. – N 3. – P. 433–446.
8. Marquant-Leguienne, B. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine / B. Marquant-Leguienne, P. Humblot // Theriogenology. – 1998. – Vol. 49. – N 1. – P. 3–9.

L. V. GOLUBETS, M. P. STAROVOJTOVA

ESTIMATION OF THE EFFICIENCY OF PRODUCING EMBRYOS IN THE SYSTEM *IN VITRO* IN THE CONDITIONS OF DIFFERENT CO₂ CONCENTRATION IN THE ATMOSPHERE

Summary

From the research results it is established that the optimum CO₂ concentration in the atmosphere is 5%, which allows one to get up to 22.4% of blastocysts from a number of splitting up germs. The decrease in the carbonic gas concentration with growing and developing cells enhances the yield of blastocysts (embryos) in comparison with the control by 6.9%. The use of the Menezo medium has shown a higher efficiency in comparison with TC-199 as the CO₂ concentration in the surrounding air is decreased. At the 4% CO₂ concentration the yield of blastocysts is increased by 20.8%, at the 3% concentration, when the medium TC-199 is used, morulas did not develop to the next stage.