

УДК 636.2.034:612.63.04

А. И. ГАНДЖА<sup>1</sup>, И. П. ШЕЙКО<sup>1</sup>, Л. Л. ЛЕТКЕВИЧ<sup>1</sup>, Т. И. КУЗЬМИНА<sup>2</sup>

## ОПТИМИЗАЦИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ СОЗРЕВАНИЯ И ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ООЦИТОВ КОРОВ ВНЕ ОРГАНИЗМА

<sup>1</sup> Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству,  
Жодино, Республика Беларусь, e-mail: belniig@tut.by

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения  
сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург–Пушкин, Россия, e-mail: spbvniigen@mail.ru

(Поступила в редакцию 02.10.2012)

Несмотря на значительный прогресс в совершенствовании систем культивирования, число получаемых *in vitro* жизнеспособных эмбрионов крупного рогатого скота отличается высокой вариабельностью и в среднем достигает одной трети от культивируемых ооцитов [1]. Успех культивирования зависит от многих факторов, включающих в себя качество культуральных сред, соблюдение температурных режимов, возраст и генотип животного – донора ооцитов и т. д. [2–4]. Окончательный результат будет зависеть от соблюдения вне организма условий, детерминирующих созревание ооцитов млекопитающих *in vivo*, их компетентность к оплодотворению.

Начальный этап многоступенчатой технологии получения эмбрионов *in vitro* – культивирование ооцитов, выделенных из яичников животных-доноров. 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 потенций к оплодотворению и дальнейшему формированию эмбрионов.

Еще в середине XX века было замечено, что у млекопитающих извлеченные из фолликулов ооциты спонтанно возобновляют мейоз в простых синтетических средах и проходят все завершающие стадии мейоза вплоть до метафазы II [5]. Однако после оплодотворения таких ооцитов формирования зигот не наблюдали. Приобретение компетентности женской гаметы к дальнейшему развитию – комплексный процесс ядерного и цитоплазматического созревания [6]. С целью моделирования систем дозревания, адекватно отражающих условия созревания ооцитов *in vivo*, в их состав вводятся различные биологически активные вещества, в том числе гормоны, факторы роста, энергетические субстанции, способствующие завершению ядерно-цитоплазматического созревания и формированию из них при последующем оплодотворении биологически полноценных эмбрионов. Продолжительность культивирования ооцитов коров вне организма до стадии метафаза II составляет в среднем 20–24 ч [7]. Эффективность питательных сред и компонентов к ним оценивается по выходу зрелых яйцеклеток и биологически полноценных доимплантационных зародышей.

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ показателей оплодотворяемости, уровня дробления и развития доимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота, полученных из ооцитов, созревших в различных системах культивирования.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проводили в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» и лаборатории биологии развития ГНУ ВНИИГРЖ в 2010–2012 гг. Яичники отбирали после убоя животных на УП «Минский мясокомбинат». Доставку осуществляли в бытовом термосе в среде Дюльбекко, Хенкса, ТС-199 или физиологическом растворе при температуре 27–33 °С. Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) получали методом рассечения фолликулов в среде Хенкса с добавлением 1% фетальной сыворотки (*Sigma*), 1 ед/мл гепарина и 5 мкг/мл гентамицина. Для

культивирования отбирали ОКК без видимых признаков дегенерации, с плотным многослойным кумулюсом, гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоне пеллюцида. Созревание ооцитов проводили в среде ТС-199 под слоем минерального масла в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. В качестве дополнительных компонентов использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) – 10 мг/мл, эстральную сыворотку коров (ЭС) – 15 или 20%, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) – 5 мкг/мл или 10 нг/мл рекомбинатного бычьего соматотропина (СТГ, *Monsanto*) + клетки гранулезы (КГ), которые получали путем аспирации жидкости из фолликулов диаметром 3–5 мм с обширной васкуляризацией и высоким тургором. Суспензию центрифугировали при 250 g 10 мин. После удаления супернатанта клетки дважды отмывали путем ресуспендирования в среде ТС-199, содержащей 3% ФБС (Sigma). Конечную концентрацию клеток подсчитывали в гемоцитометре, долю живых клеток определяли с помощью трипанового синего (0,1%-ный раствор) (*Serva*, Германия). Для культивирования использовали суспензию клеток в концентрации  $(1,1\text{--}1,6)\times 10^6$  в 1 мл среды, при этом доля живых клеток составляла не менее 50–60%. Оплодотворение ооцитов проводили через 24 ч. Капацитацию замороженно-оттаянной спермы быка осуществляли методом флотации в среде Тироде, Тироде М (модифицированная) или ТС-199 с 50 мкг/мл гепарина в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора. Созревшие ооциты оплодотворяли в среде Тироде различных модификаций с добавлением БСА – 6 мг/мл, пирувата натрия (*pNa*) – 3 мкг/мл, гипотатурина (ГПТ)-1,5 мг/мл и эпинифрина (ЭПФ) – 0,5 мг/мл. Совместное культивирование ооцитов и сперматозоидов осуществляли в течение 18 ч. После оплодотворения зиготы помещали в среду для культивирования ранних эмбрионов на основе ТС-199. Эффективность использования сред и компонентов к ним определяли по количеству дробящихся клеток и выходу доимплантационных эмбрионов.

**Результаты и их обсуждение.** Технология получения ранних зародышей вне организма предусматривает доставку исходного материала (яичников животных-доноров) в различных средах. Мы проанализировали результаты экспериментов по получению эмбрионов *in vitro* из ооцитов яичников коров, доставленных в следующих средах: физиологический раствор, среда Хенкса, Дюльбекко, ТС-199. Данные эффективности применения их для транспортировки яичников представлены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние среды, используемой для транспортировки яичников, на получение эмбрионов вне организма

Среда транспортировки яичников	Оплодотворено ооцитов, <i>n</i>	Уровень дробления, <i>n</i> (%)	Выход морул-бластоцист, <i>n</i> (%)
Дюльбекко	572	282 (49,3 <sup>a</sup> )	106 (18,5)
Хенкса	632	316 (50,0 <sup>a</sup> )	125 (19,8)
ТС-199	538	241 (44,8)	101 (18,8)
Физиологический раствор	507	208 (41,0 <sup>b</sup> )	68 (13,4)

<sup>a,b</sup>  $P < 0,01$ .

По уровню дробящихся клеток и выходу морул-бластоцист среды Хенкса, Дюльбекко, ТС-199 не имели достоверных различий – 49,3; 50,0; 44,8% и 18,5; 19,8; 18,8% соответственно. Однако уровень дробления при доставке яичников коров в среде Дюльбекко и Хенкса достоверно отличался от такового при применении физиологического раствора ( $P < 0,01$ ).

В настоящее время для созревания ооцитов коров широко применяется среда ТС-199, которая содержит более 60 компонентов, способствующих полноценному ядерному и цитоплазматическому созреванию ооцитов. Однако для завершения мейотического созревания ооцитов необходимо присутствие дополнительных источников белка, гормонов, энергетических субстратов и факторов роста, поэтому мы обогащали среду такими добавками, как БСА, ЭС, ФСГ. В ходе экспериментов установлена тенденция повышения выхода эмбрионов крупного рогатого скота вне организма при добавлении одного из компонентов: 10 мг/мл БСА (выход морул-бластоцист составил 25,0%), или 15% ЭС (выход морул-бластоцист составил 21,8%), или 5 мкг/мл ФСГ (выход морул-бластоцист составил 23,6%). В табл. 2 представлены данные, полученные при совместном введении в среду для культивирования ооцитов БСА, ЭС и ФСГ в различных комбинациях.

Следует отметить повышение доли раздробившихся клеток при использовании среды следующего состава: ТС-199 + БСА + ЭС + ФСГ. Уровень дробления был выше по сравнению с другими средами на 3,1–3,2%, а выход биологически полноценных эмбрионов – на 4,9–5,5%. По сравнению с контролем данные показатели составили 60,1% против 28,7% (по уровню дробления,  $P < 0,01$ ) и по выходу морул-бластоцист – 23,8% против 5,0%.

Т а б л и ц а 2. Эффективность использования комплекса гормональных и энергетических добавок в ТС-199

Среда созревания	Оплодотворено ооцитов, <i>n</i>	Уровень дробления, <i>n</i> (%)	Выход морул-бластоцист, <i>n</i> (%)
ТС-199 + БСА + ЭС	230	131 (56,9 <sup>a</sup> )	42 (18,3)
ТС-199 + БСА + ФСГ	270	154 (57,0 <sup>a</sup> )	51 (18,9)
ТС-199 + БСА + ФСГ + ЭС	193	116 (60,1 <sup>a</sup> )	46 (23,8)
Контроль (ТС-199)	80	23 (28,7 <sup>b</sup> )	4 (5,0)

<sup>a,b</sup>  $P < 0,01$ .

Факторы роста играют важную роль в формировании зрелой яйцеклетки. Соматотропин – гипофизарный гормон, контролирующий в организме животных процессы роста и питания. Биологический эффект соматотропина носит метаболический и соматогенный характер. Эксперименты, проведенные на животных с «выключенными» (*knockout*) генами соматотропина и к рецепторам соматотропина, указывают на снижение фертильности животных. Zhou et al., Tripp et al. обследовали большое количество овариальных фолликулов (ультрасонография) у коров, обработанных соматотропином. С высокой степенью достоверности ( $P < 0,01$ ) было показано, что число фолликулов у обработанных соматотропином коров было на 50% больше, чем у необработанных [8, 9]. Результаты исследований по выявлению эффектов соматотропина на репродукцию животных *in vivo* явились триггером для попытки их использования при моделировании систем дозревания ооцитов коров *in vitro* [10–12]. В наших экспериментах мы исследовали эффект рекомбинантного бычьего соматотропина на получение эмбрионов крупного рогатого скота из ооцитов, созревших в системах культивирования следующего состава: 1 – ТС-199 + 20% эстральной сыворотки; 2 – ТС-199 + 20% эстральной сыворотки + 10 нг/мл соматотропина; 3 – ТС-199 + 20% эстральной сыворотки +  $1 \times 10^6$  клеток гранулезы; 4 – ТС-199 + 20% эстральной сыворотки + 10 нг/мл соматотропина +  $1 \times 10^6$  клеток гранулезы (табл. 3). В результате экспериментов не обнаружено достоверных различий в уровне дробления во всех исследуемых группах. При дальнейшем культивировании полученных эмбрионов выявлен положительный эффект рекомбинантного бычьего соматотропина на развитие ранних зародышей.

Т а б л и ц а 3. Влияние рекомбинантного бычьего соматотропина на развитие доимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*

Среда созревания	Оплодотворено ооцитов, <i>n</i>	Уровень дробления, <i>n</i> (%)	Выход морул-бластоцист, <i>n</i> (%)
ТС-199 + 20% ЭС	87	47 (54,0)	24 (27,6 <sup>a</sup> )
ТС-199 + 20% ЭС + 10 нг/мл СТГ	95	60 (63,2)	33 (34,7)
ТС-199 + 20% ЭС + $1 \cdot 10^6$ КГ	91	53 (58,2)	26 (28,6 <sup>a</sup> )
ТС-199 + 20% ЭС + 10 нг/мл СТГ + $1 \cdot 10^6$ КГ	83	59 (71,1)	36 (43,4 <sup>b</sup> )

<sup>a,b</sup>  $P < 0,05$ .

Эффект соматотропина был наиболее выражен в группе, где ооциты культивировали совместно с клетками гранулезы. В этом случае стадий поздних морул и бластоцисты достигли 43,4% эмбрионов против 27,6 и 28,6% ( $P < 0,05$ ). Выявленный эффект можно интерпретировать с учетом известных фактов об увеличении продукции клетками гранулезы эстрадиола (гормона, ответственного за формирование ряда факторов, обуславливающих завершение мейоза, а также фактора формирования мужского пронуклеуса), за счет роста числа нормально функциониру-

ющих клеток. Рост популяции клеток гранулезы, по-видимому, обеспечивается в результате воздействия гормона роста, в нашем случае рекомбинантного соматотропина.

Важнейшим этапом в технологии получения эмбрионов из ооцитов, созревших *in vitro*, является подготовка к оплодотворению мужских гамет. Капацитация – событие или серия событий, предшествующих акросомной реакции. Что касается механизма капацитации, то, по всей вероятности, он связан с разрывом сцепленных молекул на поверхности мембраны сперматозоида, что является триггером акросомной реакции. А разрыву сцепленных молекул, скорее всего, способствует освобождение сперматозоидов от декапацитирующего фактора, локализованного в семенной плазме. Данный процесс смоделирован путем отмывания сперматозоидов от семенной плазмы питательными средами.

Вне организма капацитацию сперматозоидов проводят искусственно в различных синтетических средах. В наших исследованиях мы использовали в качестве сред для капацитации ТС-199, Тироде и Тироде М. Эффективность их применения определяли по уровню дробления и выходу эмбрионов на стадии морула – бластоциста (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Эффективность применения различных сред для капацитации сперматозоидов

Среда капацитации	Оплодотворено ооцитов, <i>n</i>	Уровень дробления, <i>n</i> (%)	Выход морул-бластоцист, <i>n</i> (%)
ТС-199	195	80 (41,0 <sup>a</sup> )	2 (8,2 <sup>a</sup> )
Тироде	195	109 (55,9 <sup>b</sup> )	9 (17,4)
Тироде М	195	105 (53,8 <sup>b</sup> )	12 (24,6 <sup>b</sup> )

<sup>a,b</sup>  $P < 0,05$ .

Лучшие результаты получены при оплодотворении сперматозоидами, инкубированными в среде Тироде М для капацитации. Так, уровень дробления составил 53,8% ( $P < 0,05$ ), а выход эмбрионов – 24,6%. Несмотря на то что при использовании среды Тироде уровень дробления был выше на 2,1% по сравнению со средой Тироде М, выход морул-бластоцист снизился на 7,2%. Низкие показатели уровня дробления (41,0%) и выход эмбрионов на доимплантационных стадиях (8,2%) отмечены при капацитации сперматозоидов в среде ТС-199.

Оплодотворение ооцитов коров вне организма проводили в средах ТС-199, Тироде, Тироде М, Игла. К среде для оплодотворения в качестве энергетических компонентов мы добавляли БСА, *pNa*, ЭПФ и ГПТ с целью стимуляции подвижности сперматозоидов и улучшения их пенетрационной способности, а также проверки их влияния на дальнейшее развитие эмбрионов крупного рогатого скота вне организма (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Эффективность использования энергетических добавок в средах для оплодотворения

Среда оплодотворения	Оплодотворено ооцитов, <i>n</i>	Уровень дробления, <i>n</i> (%)	Выход морул-бластоцист, <i>n</i> (%)
ТС-199 + БСА + <i>pNa</i> + ЭПФ + ГПТ	143	23 (16,1 <sup>a</sup> )	4 (2,8 <sup>d</sup> )
Тироде + БСА + <i>pNa</i> + ЭПФ + ГПТ	156	85 (54,5 <sup>b</sup> )	30 (19,2)
ТиродеМ + БСА + <i>pNa</i> + ЭПФ + ГПТ	190	117 (61,6 <sup>b</sup> )	49 (25,8 <sup>c</sup> )
Игла + БСА + <i>pNa</i> + ЭПФ + ГПТ	170	24 (14,1 <sup>c</sup> )	4 (2,4 <sup>f</sup> )

<sup>a,b</sup>; <sup>b,c</sup>  $P < 0,001$ ; <sup>d,e</sup>; <sup>e,f</sup>  $P < 0,05$ .

При использовании всего комплекса энергетических добавок к среде для оплодотворения уровень дробления был выше в среде Тироде и Тироде М и составил 54,5 и 61,6%, что на 38,4; 45,5 и 40,4; 47,5% больше ( $P < 0,001$ ) по сравнению с применением сред ТС-199 и Игла. Выход морул-бластоцист составил 19,2; 25,8; 2,8 и 2,4% соответственно. Использование гипотаурина совместно с эпинефрином в среде Тироде и Тироде М увеличило выход дробящихся зародышей по сравнению со средами ТС-199 и Игла на 16,4; 23,0% и 16,8; 23,4%.

## Выводы

1. Выявлено повышение уровней дробления и выхода эмбрионов на стадиях поздних морул и бластоцист при созревании донорских ооцитов коров в среде ТС-199 с добавлением бычьего сывороточного альбумина, фолликулостимулирующего гормона и эстральной сыворотки крови на 31,4 и 18,8% соответственно.

2. Введение 10 нг/мл соматотропина совместно с клетками гранулезы в систему дозревания донорских ооцитов коров увеличивает выход преимплантационных эмбрионов на 14,8–15,8%.

3. Использование растворов высокой ионной силы Тироде и Тироде М способствует капацитации сперматозоидов быка вне организма, а введение энергетических компонентов: пирувата натрия, эпинифрина, гипотаурина, бычьего сывороточного альбумина повышает их оплодотворяющую способность до 61,6% и позволяет получать 25,8% доимплантационных эмбрионов.

## Литература

1. *Sirard, M.-A.* François Richard, Patrick Blondin and Claude Robert. Contribution of the oocyte to embryo quality / M.-A. Sirard // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 65. – I. 1. – P. 126–136.
2. *Mehlman, L. M.* Stop and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation / L. M. Mehlman // *Reproduction*. – 2005. – Vol. 130. – P. 797–799.
3. *Кузьмина, Т. И.* Инновационные эмбриотехнологии в репродукции животных: от фундаментальных исследований к практике / Т. И. Кузьмина, Х. Торнер, Х. Альм / *Достижения науки и техники АПК*. – 2010. – № 4. – С. 66–68.
4. Экстракорпоральное оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота: метод. рекомендации / Л. В. Голубец [и др.]. – Гродно: ГГАУ, 2010. – 48 с.
5. *Кузьмина, Т. И.* Использование маркеров цитоплазматического созревания донорских ооцитов сельскохозяйственных животных в клеточных технологиях репродукции / Т. И. Кузьмина, Х. Торнер, Х. Альм // *Современные методы генетики и селекции в животноводстве: материалы междунар. науч. конф.* / ВНИИГРЖ. – СПб., 2007. – С. 281–286.
6. Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* / Т. И. Кузьмина [и др.]. – Санкт-Петербург – Пушкин, 2009. – 44 с.
7. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron Mouse) / Y. Zhou [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – Vol. 94. – P. 13215–13220.
8. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocytes retrieval and *in vitro* development / M. W. Tripp [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53. – P. 1581–1590.
9. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation / F. Izadyar [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 1998. – Vol. 49. – P. 444–453.
10. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte-complexes / S. Kollé [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2003. – Vol. 68. – P. 1584–1589.
11. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence *in vitro* / T. I. Kuzmina [et al.] // *J. Reprod. Develop.* – 2007. – Vol. 53 (2). – P. 309–316.

*A. I. GANDZHA, I. P. SHEYKO, L. L. LETKEVICH, T. I. KUZMINA*

## OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIA FOR IN VITRO FERTILIZATION AND MATURATION OF COWS' OOCYTES

### Summary

The models of *in vitro* maturation of cows' oocytes allowing to obtain up to 43% of embryos at final stages of pre-implanting development are presented in the article. The results of sperm capacitation are analysed, optimal media formulation for fertilization is identified that increases significantly the efficiency of the experiments on *in vitro* oocytes fertilization.