

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ
ЭМБРИОНОВ КОРОВ *IN VITRO***

Т.И. Кузьмина*, Т.И. Епишко**, О.А. Епишко**

* ГНУ «Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных»

** УО «Полесский государственный университет»

Внедрение клеточных репродуктивных технологий в практику разведения крупного рогатого скота позволяет эффективно решать селекционные задачи, моделируя высокоудойные стада в более короткие сроки по сравнению с традиционными методами разведения, увеличивает число потомков от индивидуальных животных, сокращает генетические интервалы, минимизирует распространение заболеваний, обеспечивает сохранение генофонда, генетического разнообразия, оптимизирует продуктивные качества, конструирует новые генотипы. К клеточным репродуктивным технологиям относятся: искусственное осеменение; использование сексированного (разделенного по полу) семени, гормональная суперовуляция, получение эмбрионов вне организма, трансплантация эмбрионов, криоконсервация гамет и эмбрионов, клонирование и трансгенез. В норме у коровы каждые три недели созревает один ооцит из всех находящихся в яичнике. В антральных фолликулах содержатся от 5 до 20 ооцитов, а в преантральных – десятки тысяч. Биотехнология получения эмбрионов *in vitro* – многоступенчатый процесс, включающий: выделение ооцит-кумулясных комплексов; их морфологическую оценку; селекцию клеток, перспективных для дальнейшего культивирования; экстракорпоральное созревание; оплодотворение; отбор дробящихся зародышей и их культивирование до завершающей стадии доимплантационного развития – бластоцисты. Эффективность технологии, несомненно, зависит от четкого исполнения всех этапов, первым из которых является отбор ооцитов. Источником ооцитов, могут служить яичники после овариоэктомии животных на мясокомбинате, а также ооцит-кумулясные комплексы (ооциты, окруженные питающими их соматическими клетками) можно извлечь путем аспирации овариальных фолликулов живых животных. Использование технологии получения донорских ооцитов путем аспирации овариальных фолликулов из яичников живых животных (*Ovum Pick Up - OPU – technology*), в сочетании с технологией оплодотворения ооцитов *in vitro*, позволяет получать около 50 телят от донора [1]. Для сравнения: при искусственном осеменении обычно получают одного теленка в год; при суперовуляции и оплодотворении *in vitro* – 12 в год, а в случае использования *OPU – technology* – от 52 до 104 в год. При этом на сессию вымывания можно получать до 7 ооцитов, из которых в итоге развиваются до 5 трансферрабельных эмбрионов. Преимущества данного подхода очевидны. Во-первых, представляется возможность проводить селекцию доноров ооцитов, получать потомство от известной матери, а во-вторых, компетенции к дальнейшему дозреванию ооцита и развитию из него после экстракорпорального оплодотворения биологически полноценного эмбриона, как показали многие исследователи, гораздо выше, чем ооцитов, полученных из яичников убитых на мясокомбинате животных [2]. Понятно, что в случае использования яичников от животных, убитых на мясокомбинате невозможно повторное извлечение ооцитов, в то время, как при аспирации гамет из овариальных фолликулов живых животных-доноров извлечение можно производить неоднократно. Донорские ооциты получают, как от особей, предварительно обработанных гормонами, так и от животных, не подвергшихся гормональной обработке. Технология *OPU* значительно повышает качество полученных эмбрионов у разных видов и пород [3, 4, 5, 6, 7]. Presicce и др. показали, что использование сексированного семени у крупного рогатого скота в технологии получения эмбрионов из донорских ооцитов позволяет получать 25,2% бластоцист, в случае использования животных, подвергшихся предварительной гормональной обработке, в то время как из ооцитов необработанных животных развиваются 12,8% бласто-

цист [8]. В итоге авторами показана целесообразность использования гормональной обработки животных доноров до аспирации ооцитов в OPU технологиях. В 2008 году была проведена серия экспериментов по оценке потенций к развитию клонированных эмбрионов, полученных из ооцитов, аспирированных из яичников живых животных (ОРИ технология), в различные сроки. В результате исследователи показали, что аспирация всех фолликулов диаметром менее или 3 мм индуцирует и синхронизирует динамику фолликулярных волн. Ооциты, аспирированные во время второй волны, имели более высокие потенции к развитию из них клонированных эмбрионов [9, 10]. О высокой эффективности предварительного созревания ооцитов *in vivo* на выход биологически полноценных доимплантационных эмбрионов свидетельствуют данные Dieleman G.X. et.al. У эмбрионов, полученных из ооцитов, аспирированных из яичников предварительно обработанных животных доноров, потенции к развитию до стадии бластоцисты оказались достоверно выше, чем у эмбрионов, развившихся из ооцитов животных, убитых на мясокомбинате [9]. Молекулярно-генетические исследования экспрессии генов в ооцитах в зависимости от происхождения (от живых или убитых доноров) выявили различия в экспрессии некоторых генов, вовлеченных в процессы мейотического созревания [11].

На эффективность технологии получения эмбрионов путем экстракорпорального оплодотворения ооцитов из боинского материала или аспирированных у живых животных влияет множество биологических и технологических факторов. В их числе индивидуальные особенности донора, возраст, питание, здоровье, родословная, порода (биологические факторы), скорость пункции, давление, размер иглы, квалификация специалиста (технологические). При четком соблюдении технология OPU не оказывает отрицательного влияния на овариальную функцию и здоровье животного в целом. Донорами ооцитов могут служить, как половозрелые, так и не достигшие половой зрелости животные.

Начальным этапом технологии созревания яйцеклеток *in vitro* является отбор перспективных к завершению мейотического дозревания ооцитов, выделенных из яичников животных-доноров. Популяция ооцитов гетерогенна. Обычно при оценке, как исходной популяции ооцитов, так и яйцеклеток после созревания, ведется отбор нескольких яйцеклеток, по результатам анализа которых оценивают всю популяцию. Понятно, что огромный интерес представляет индивидуальная оценка клетки, предварительно протестированной на жизнеспособность и способной к дальнейшему культивированию. При отборе ооцитов, аспирированных из фолликулов яичников убитых животных-доноров, в соответствии с вышеизложенными морфологическими критериями, эффективность экспериментов по получению из них эмбрионов, как правило, не превышает 30%. В связи с этим, логично предположить, что популяция отобранных по морфологическим признакам ооцитов неоднородна по функциональному статусу. Применение в качестве зонда для прижизненного тестирования ооцитов бриллиантового кристаллического красителя (brillant cresyl blue - BCB) – индикатора активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (G6PDH) обеспечивает возможность использования отобранных клеток для дальнейшего культивирования ооцитов, их оплодотворения и получения эмбрионов. BCB детерминирует интрацеллюлярную активность G6PDH, которая играет важную роль в клеточном росте, являясь ключевым ферментом пентозо-фосфатного цикла. Активность фермента возрастает в растущем ооците, к моменту завершения роста его активность снижается. В наших исследованиях мы использовали BCB (B-5388, Sigma) в концентрации 26 мМ, при 90 минутной экспозиции. На рисунке 1 представлены ооциты BCB(+) (окрашенные) и BCB(-) - (неокрашенные). Результаты по определению активности G6PDH (ммоль / мин / 1 мг белка) в гаметах коров, выраженной в процентах от контроля показали, что в ооцитах, оцененных, как BCB(-) (неокрашенные), активность исследуемого фермента достоверно превышает таковую в окрашенных – BCB(+). Анализируя представленные результаты и данные литературы, следует констатировать, что популяция ооцитов, выделяемых из антральных фолликулов неоднородна по своим потенциям к завершению мейотического дозревания *in vitro*. Идентификация факторов, определяющих приобретение ооцитами компетентности к оплодотворению и развитию эмбрионов продолжает оставаться актуальной проблемой биологии репродукции и клеточных репродуктивных технологий.

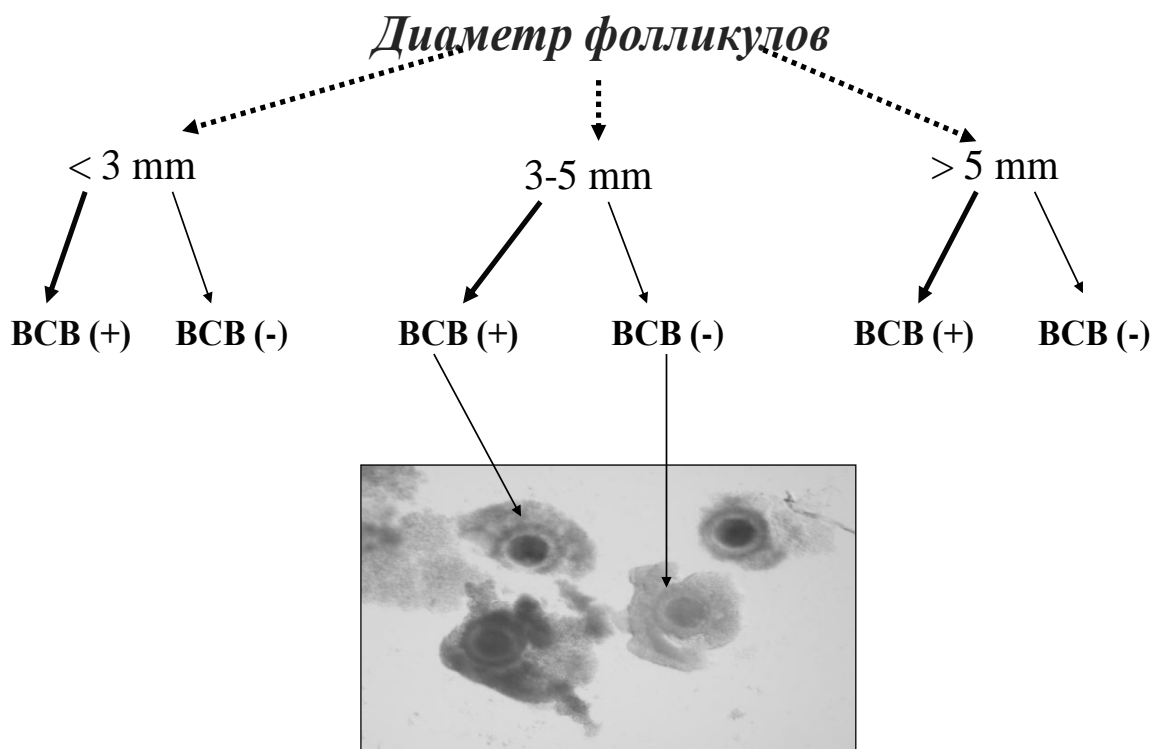


Рисунок – Селекция ооцитов коров на основе BCB-теста

Нами была предпринята попытка охарактеризовать популяцию ооцитов коров, выделенных из фолликулов разного диаметра по морфофункциональному состоянию, с учетом BCB теста. В результате проведенных исследований обнаружено, что наибольшее число BCB(+) ооцитов коров (79,3% и 69,3 %) содержится в фолликулах диаметром 3-5 мм и более 5 мм (таблица).

При оплодотворении предварительно BCB - тестированных ооцитов нами были выявлены достоверные различия по выходу эмбрионов на стадии бластоцисты, развившихся из BCB(+) и из BCB(-) ооцитов. При оплодотворении BCB(+) ооцитов 37,6% зародышей достигли стадии бластоцисты, а из BCB(-) ооцитов развилось лишь 4,5% [12].

Таблица – BCB-диагностика ооцитов коров, выделенных из фолликулов разного диаметра

BCB тест	Диаметр фолликула		
	<3 мм n(%) ооцитов	3-5 мм n(%) ооцитов	>5мм n(%) ооцитов
BCB(+)	73 (57,8%)^a	23 (79,3%)^b	4 (69,23%)^c
BCB(-)	53 (42,2%)	6 (20,7%)	9 (30,77)

a:b, a:c P <0.05; (Критерий Манна-Уитни)

Анализ результатов проведенных исследований позволил нам сформулировать практические предложения в следующей формулировке: с целью повышения эффективности технологии получения зрелых яйцеклеток *in vitro* использовать для оценки исходной популяции ооцитов коров BCB – тест, для культивирования BCB(+) ооцитов применять следующую систему: ТС-199, дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой, 50 нг/мл бычьего пролактина совместно с клетками гранулезы (10^6 клеток/мл).

Дальнейшие успехи в исследовании фундаментальных основ формирования зрелой яйцеклетки в организме млекопитающих будут способствовать интенсификации и внедрению клеточных репродуктивных технологий, в том числе и OPU, в практику животноводства.

Литература

1. Van Wagtendonk-de Leeuw. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status / Van Wagtendonk-de Leeuw // AM. Theriogenology. 2006 Mar 15; 65(5):914-25).
2. Genicot, S. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol / S. Genicot [et al.] // Animal Reproduction Science, vol. 86, no. 1-2, pp. 13–25, 2005.
3. Presicce, G.A. Reproduction in the water buffalo / G.A. Presicce // Reproduction in Domestic Animals, vol. 42, supplement 2, pp. 24–32, 2007.
4. De Roover, R., Humblot, G., Holm, P. and P. Holm Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes / R. De Roover [et al.] // Theriogenology, vol. 63, no. 4, pp. 1149–1166, 2005.
5. Chaubal, S.A., Ferre, L.B. and L. B. Ferre, Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system / S.A. Chaubal [et al.] //Theriogenology, vol. 67, no. 4, pp. 719–728, 2007.
6. Presicce, G.A. Hormonal stimulation and oocyte maturational competence in prepuberal Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) / G.A. Presicce [et al.] // Theriogenology, vol. 57, no. 7, pp. 1877–1884, 2002.
7. De Roover, R. Effects of ovum pick-up frequency and fish stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production / R. De Roover [et al.] // Reproduction in Domestic Animals, vol. 43, no. 2, pp. 239–245, 2008.
8. Giorgio, A. Oocyte Source and Hormonal Stimulation for In Vitro Fertilization Using Sexed spermatozoa in Cattle / A. Giorgio [et al.] // Veterinary Medicine International Volume 2011 (2011), Article ID 145626, 8 pages.
9. Dieleman, G. X. Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos / G. X. Dieleman [et al.] // Mol Reprod Dev. 2008 Dec;75(12):1710-5.
10. Lonergan P. Gene expression profile of bovine cumulus cells derived from oocytes matured either in vivo or in vitro 24th scientific meeting / P. Lonergan // A.E.T.E., Pau, France, 12-13 September, 2008, p.236.
11. Heleil, B., Effect of prolactin on Developmental Competence of Bovine Oocytes Selected by Brilliant Cresyl Blue Staining / B. Heleil [et al.] // Journal of Reproduction and Infertility 1 (1):01-07, 2010.