



ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *IN VITRO* ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

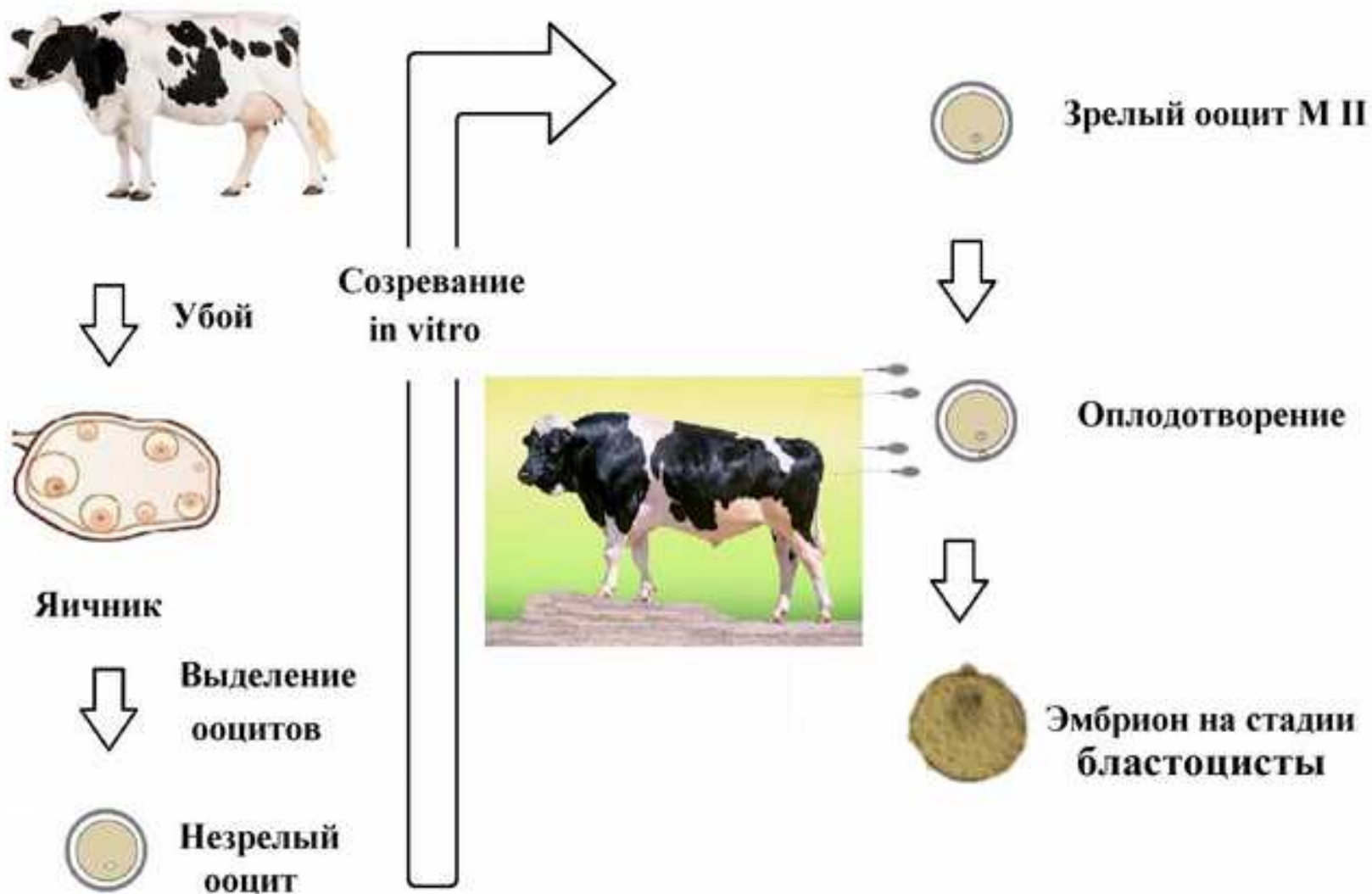
Докладчик – Сметанина Ирина Геннадьевна к.б.н., с.н.с.
группы экспериментальной эмбриологии
ВНИИФБиП – филиал ВИЖ им. Л.К.Эрнста

Быково – 2019

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью нашей работы было создание эффективной системы культивирования эмбрионов КРС путем созревания ооцитов *in vitro* с использованием отечественных гонадотропных препаратов, последующего их оплодотворения и развития вне организма.

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- Яичники КРС доставляли с мясокомбината и транспортировали в лабораторию в течение 2-3 часов при температуре 30°C в фосфатно-солевой среде Дюльбекко (“ПанЭко”, Россия) или в 0.9% р-ре NaCl. Ооцит-кумуляусные комплексы (ОКК) выделяли из антральных фолликулов диаметром 2-6 мм методом рассечения. На культивирование отбирали ОКК 1 и 2 категорий по морфологической классификации de Loos F. et al. (1989). Для созревания ооцитов использовали среду МЕМ-альфа (“Sigma”, США) с добавлением отечественных гонадотропинов - 1 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (ФСГ, “ФСГ-супер”, ООО “Агробιοмед”, ВНИИФБиП с/х животных, Боровск, Россия), 0.3 ед/мл хорионического гонадотропина человека (хГЧ, Московский эндокринный завод, Россия), а также 0.2 мМ пирувата натрия (“Sigma”, США) и 2 мМ глутамин (“Sigma”, США). Ооциты культивировали в 4-х луночных чашках фирмы “Nunc” (Дания) по 25-30 ОКК на лунку в 500 мкл среды при температуре 38.5°C под газовой фазой – 5% CO₂ в воздухе в течение 24 ч.
- Созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде Тироде (Bavister et al., 1983) с 10 мМ буфера HEPES (Т-Н), дополненной 3 г/л свободного от жирных кислот бычьего сывороточного альбумина (БСА, N4919) и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами. Для оплодотворения применяли среду Тироде с 25 мМ бикарбоната натрия (Bavister, 1983), дополненную 10 мкг/мл гепарина (“Sigma”, США) и 6 г/л БСА. В работе использовали замороженную сперму, которую готовили методом “всплывания” (Parrish et al., 1986). Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла 1.5-2x10⁶/мл. Совместную инкубацию яйцеклеток и сперматозоидов осуществляли в течение 22-24 ч при температуре 38.5°C в атмосфере 5%-ного CO₂ в воздухе.

Для оценки способности оплодотворенных ооцитов к дальнейшему развитию *in vitro* их трижды отмывали в среде Т-Н, а затем помещали на культивирование в микрокапли объемом 50мкл в синтетическую жидкость яйцевода (СЖЯ, SOF- synthetic oviductal fluid, Tervit et al.,1972) без глюкозы с добавлением 1 mM глутамина, 0.33 mM пирувата натрия, 3 г/л БСА (N3311,"Sigma", США) и 20%-ной эстральной сыворотки, добавляемой в среду через 42 ч после начала оплодотворения. Эстральную сыворотку получали от коров в первой половине охоты. Культивирование осуществляли в течение 210 ч под газовой фазой 5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂ в увлажненной атмосфере при 38.5°C.

В момент добавления в среду культивирования эстральной сыворотки подсчитывали процент дробящихся эмбрионов, через 144 ч после начала оплодотворения определяли процент морул и ранних бластоцист и в момент завершения культивирования через 210 ч подсчитывали процент бластоцист. Во все среды добавляли пенициллин/стрептомицин в концентрации 100 ед/мкг на 1 мл ("ПанЭко", Россия).

Для оценки качества оплодотворения яйцеклеток готовили тотальные цитологические препараты по методу Anderson (1978) в модификации Malenko (1994).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Исследования показали, что использование отечественных гонадотропинов для созревания ооцитов КРС, а именно, препарата “ФСГ-супер” (Боровск, Россия) в концентрации 1мкг/мл и хорионического гонадотропина (Московский эндокринный завод, Россия) в концентрации 0.3 ед/мл, позволяет получать *in vitro* эмбрионы преимплантационных стадий. По нашим данным эффективность ядерного созревания составила в этой системе в среднем 65% (в лучших опытах – 80-90%). В качестве критерия созревания яйцеклетки до стадии MII (метафаза II) использовали визуально определяемое под лупой первое направительное тельце. Процент нормально оплодотворенных яйцеклеток согласно цитологическим препаратам составил 43.3%. До стадии бластоцисты развивалось 17.8% эмбрионов от общего числа ооцитов и 46.6% от числа дробящихся эмбрионов. Стадии вылупления достигает 9.2% эмбрионов от общего числа ооцитов и 24.1% от числа дробящихся.

Следует отметить, что ооциты, созревающие в предложенной нами культуральной системе, были использованы в нашей лаборатории в работах по клонированию. Разработанная технология позволяет получать 20.3-23.6% клонированных эмбрионов КРС на стадии бластоцисты (Кириенко К.В. и др., 2007). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что разработанная культуральная система с использованием отечественных гонадотропинов, может использоваться для получения ооцитов, зигот и преимплантационных эмбрионов КРС *in vitro* для различных биотехнологических программ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что разработанная культуральная система с использованием отечественных гонадотропинов, может использоваться для получения ооцитов, зигот и преимплантационных эмбрионов КРС in vitro для различных биотехнологических программ.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



Работа выполнена при поддержке ФАНО РФ в соответствии с тематикой ГЗ АААА-А18-118021590132-9 (0600-2018-0015): "Исследование молекулярно-биологических аспектов биоинженерных технологий для совершенствования генетических ресурсов и создания новых селекционных форм сельскохозяйственных животных и птицы"

В подготовке доклада принимали участие ведущий эмбриолог Татарина Л.В., с.н.с. Колоскова Е.М. (к.б.н.).