

Получение от скота эмбрионов *in vitro*

Александр ДЕШКО, кандидат сельскохозяйственных наук

Гродненский ГАУ

Леонид ГОЛУБЕЦ, доктор сельскохозяйственных наук, профессор

НПЦ НАН Беларуси по животноводству

Владимир СЕМЕНОВ, доктор биологических наук, профессор

Чувашский ГАУ

Создание новых и совершенствование существующих пород, сохранение их селекционного фонда, ускоренное размножение высокопродуктивных животных, обладающих большой племенной ценностью, производство экологически чистых фармацевтических препаратов, повышение эффективности международного сотрудничества в сфере обмена и торговли генетическими ресурсами — это лишь небольшой список задач, к решению которых самое непосредственное отношение имеет трансплантация эмбрионов, полученных *in vivo* и *in vitro* (Galli C., Duchi R., Crotti G., 2003; Camargo L.S.A., Viana J.H.M., Sa W.F. et al., 2006; Boni R., 2012).

За последние десятилетия технология трансплантации эмбрионов стала неотъемлемой частью селекционных программ во всех странах с развитым животноводством и сегодня представляет собой крупную международную индустрию. Ежегодно в мире продают и покупают десятки тысяч эмбрионов (Christensen L.G., 1991; Kruij T., 1994; Gengler N., Druet T.,

2001). Роль и значение их трансплантации стали еще более весомыми с появлением технологий, позволяющих получать потомство заданного пола, а также с широким внедрением в практику племенной работы геномной селекции. Применение этой методики не только дает возможность проводить племенную оценку будущего животного уже на эмбриональной стадии

развития, что существенно снижает затраты, но и позволяет в разы сократить сроки и увеличить шансы выявления и отбора «VIP-потомков» от родителей, характеризующихся выдающейся племенной ценностью (Fisher P., 2012; Wilson R.D., Weigel K.A., Fricke P.M., 2005; Humblot P., 2011).

Следует отметить, что если производство эмбрионов *in vivo* в последние годы стабилизировалось, то количество эмбрионов, полученных и пересаженных посредством культуры *in vitro*, продолжает расти в среднем на 12% год. В 2016 г. впервые в истории количество эмбрионов, произведенных *in vitro*, превысило число эмбрионов, полученных *in vivo* (Bousquet D., 1999), что указывает на переход производителей эмбрионов от традиционной технологии МОЕТ (Multiple Ovulation Embryo Transfer Technology) к IVP (*in vitro* production). Это в немалой степени связано с повышением эффективности процедур IVP, хотя в целом сегодня она не превышает 30–35% от числа поставленных на созревание и оплодотворенных ооцитов. Приведенный факт говорит о том, что, будучи длительным, высокотехнологичным и достаточно сложным комплексным процессом, получение эмбрионов *in vitro* требует понимания метаболических потребностей гамет и эмбрионов, поэтому все исследования, направленные на улучшение общей производительности на всех этапах (получение ооцитов, их созревание и оплодотворение, развитие эмбрионов, их криоконсервация и пересадка), — актуальны и своевременны.



Цель нашей работы — изучить эффективность получения эмбрионов от коров-доноров голштинской породы. Ооциты извлекали путем трансвагинальной пункции фолликулов с использованием ультразвуковой системы, включающей в себя ультразвуковой сканер с излучателем 7,5 МГц, вакуумную помпу и иглы диаметром 18G. В качестве промывной жидкости применяли фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 50 мкг/мл гентамицина и 1 ЕД/мл гепарина. Локализацию ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) проводили с помощью мини-фильтра. Для поиска ооцитов и оценки их качества использовали бинокулярный микроскоп при 16- и 90-кратном увеличении соответственно. Пригодные для созревания ОКК помещали в мультигазовый инкубатор в культуральной среде. Температура в инкубаторе составляла 38,7 °С, максимальная влажность — 96–98%, уровень углекислоты и кислорода в воздухе — 5, азота — 90%. Сперму готовили с помощью градиента плотности Перколл. Совместная инкубация ооци-

тов со спермой продолжалась в течение 18–20 часов при температуре 38,7 °С и максимальной влажности. Эмбрионы инкубировали до достижения предимплантационных стадий развития.

Математическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики с учетом критерия достоверности по Стьюденту с использованием компьютерных программ.

Один из основных факторов, определяющих эффективность всего процесса производства эмбрионов в культуре *in vitro*, — количество и качество полученных ОКК. Анализ данных, представленных в **таблице 1**, показывает, что по результатам 58 аспираций было извлечено 595 ооцитов, или 10,3 ооцита на одного донора. При этом доля ооцитов, пригодных для дальнейшего созревания, составила 84,9%, в том числе ооцитов отличного и хорошего качества — 48,4%, удовлетворительного качества и условно пригодных — 36,5%. Кроме этого, получено 15,1% непригодных клеток. Было проведено 12 аспираций (20,7%) с низким

выходом ОКК (до 3 клеток), по 13 аспираций (22,4%) со средним и выше среднего (4–7 и 8–12 клеток) соответственно и 12–20 аспираций (34,5%) с высоким выходом клеток.

Влияет ли количество ооцитов, полученных в процессе пункции фолликулов, на последующий выход эмбрионов? Данные, приведенные в **таблице 2**, говорят о том, что выход эмбрионов от доноров, для которых характерен средний уровень выхода ооцитов, а также уровень выше среднего (8–12), практически в два раза превышал аналогичный показатель доноров, выход ооцитов от которых был низким и высоким — соответственно 32,8 и 34,3% против 16 и 17,7% при расчете от числа пригодных или оплодотворенных ооцитов; 27,4 и 29,8% против 14,8 и 14,7% при расчете от числа полученных ОКК.

Как показывает анализ данных, представленных в **таблице 3**, из 54 аспираций 10 (18,5) не дали ни одного эмбриона, другие 10 (18,5%) — по одному, 13 (24,1%) — по два, 11 (20,4%) — по три, 10 (18,5%) — более трех ооцитов.

Выход и качество ооцитов, полученных при трансвагинальной аспирации

Таблица 1

Число аспираций	Выход ооцитов		Распределение ОКК по качеству				
			пригодные			непригодные	всего
			отличные и хорошие	удовлетворительные, условно пригодные	всего		
12	низкий (до 3)	всего	14	11	25	2	27
		на донора	1,2	0,9	2,1	0,2	2,3
13	средний (4–7)	всего	28	33	61	12	73
		на донора	2,5	2,8	4,7	0,9	5,6
13	выше среднего (8–12)	всего	56	52	108	14	122
		на донора	4,7	4	8,3	1,1	9,5
20	высокий (свыше 12)	всего	190	121	311	62	373
		на донора	9,5	6,1	15,6	3,1	18,7
58	в целом	всего	288	217	505	90	595
		на донора	5	3,7	8,7	3,1	10,3

Взаимосвязь между количеством полученных ооцитов и выходом эмбрионов

Таблица 2

Число аспираций	Выход ОКК	Получено на донора / аспирацию			Выход эмбрионов, %		
		ОКК			эмбрионов	от полученных ОКК	от пригодных ОКК
		всего	в том числе пригодных				
			n	%			
12	низкий (до 3)	2,3	2,1	92,6	0,3	14,8	16
13	средний (4–7)	5,6	4,7	83,6	1,7	27,4	32,8
13	выше среднего (8–12)	9,5	8,3	87,1	3	29,8	34,3
20	высокий (свыше 12)	18,7	15,6	83,4	3	14,7	17,7

Таблица 3

Распределение аспираций по выходу эмбрионов

Выход эмбрионов на аспирацию	Число аспираций	Доля от общего числа аспираций, %	Получено ОКК					Получено эмбрионов
			всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно пригодных	всего пригодных	непригодных	
0	10	18,5	64	26	28	54	10	—
			4,6	2,4	2,2	3,9	0,7	
1	10	18,5	85	39	32	71	14	10
			8,5	4,3	3,6	7,1	1,4	
2	13	24,1	98	44	33	77	21	26
			10,2	4,7	3,8	8,2	1,9	
3	11	20,4	162	90	45	135	27	33
			14,7	8,2	4,1	12,3	2,5	
Более 3	10	18,5	154	72	66	138	14	56
			15,4	7,2	6,6	13,8	1,4	

Таблица 4

Эффективность трансплантации эмбрионов от доноров, от которых получены бластоцисты разных дней развития

День культивирования	Число голов, n (%)	Получено эмбрионов, шт. (%)	Пересажено эмбрионов	Произведено пересадок	Число стельных реципиентов	Доля стельных реципиентов, %	
						от числа пересаженных эмбрионов	от числа пересадок
6	2 (4,5)	6 (4,8)	6	6	2	33,3	33,3
6,7	2 (4,5)	10 (8)	10	10	5	50	50
6,8	1 (2,3)	6 (4,8)	2	2	2	100	100
6,9	1 (2,3)	6 (4,8)	5	5	3	60	60
7	15 (34,1)	28 (22,4)	28	23	12	41,3	52,2
7,8	14 (31,8)	44 (35,2)	41	41	10	24,4	24,4
7,9	4 (9,1)	18 (14,4)	12	12	7	58,3	58,3
8	4 (9,1)	6 (4,8)	5	5	—	—	—
Итого	44	125	109	104	41	37,6	39,4

Эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro* во многом определяется оплодотворяющей способностью спермы. В ходе наших исследований мы использовали сперму восьми быков-производителей. Подготовка спермы к оплодотворению, как и само оплодотворение, проходила в одинаковых условиях. Наиболее эффективным оказалось оплодотворение ооцитов спермой быка Dawson. Выход эмбрионов от числа оплодотворенных его спермой ОКК составил 41,7%, что на 11,7–33,4 процентных пункта (п.п.) выше по сравнению с аналогичными показателями других быков-производителей. Самый низкий выход эмбрионов отмечен при оплодотворении ОКК спермой быка Varsity — 8,3%. Однако необходимо иметь в виду тот факт, что спермой этих быков были оплодотворены ооциты только одного донора, в то время как спермой других быков оплодотворены ооциты от 6 до 22 доноров, причем выход эмбрионов оказался достаточно высоким — от 20 до 30%. Таким

образом, нельзя говорить о превосходстве быка Dawson.

Практика получения эмбрионов в культуре *in vitro* показывает, что первые бластоцисты могут появиться уже на шестой день после оплодотворения при условии, что день оплодотворения — нулевой. Этот процесс продолжается до девятого, а иногда и до десятого дня культивирования. В ходе наших исследований доля полученных бластоцист шестого дня развития составила 13,6% (17 из 125), седьмого — 57,6 (72 из 125), восьмого — 22,4 (28 из 125), девятого — 6,4% (8 из 125).

Существует мнение, что более высокая скорость развития эмбрионов свидетельствует об их лучшей жизнеспособности. По полученным нами данным, доля стельных животных после пересадки бластоцист шестого и седьмого дня развития (соответственно 64,7 и 43,3%) на 38,3 и 59,7 п.п. превосходила аналогичный результат, полученный после трансплантации бластоцист восьмого дня (5%) при достоверной разнице $P \leq 0,001$.

В таблице 4 представлена эффективность трансплантации эмбрионов от доноров, от которых получены бластоцисты разных дней развития.

Анализ данных показывает, что приживляемость эмбрионов от доноров, от которых получены бластоцисты только шестого дня, составила всего лишь 33,3%. Аналогичный показатель доноров, от которых получены бластоцисты шестого-девятого дней развития, колебался в пределах от 50 до 100% и в среднем достигал 58,8%, что на 25,5 п.п. выше, чем при пересадке эмбрионов от доноров, от которых получены бластоцисты только шестого дня.

Доля стельных животных оказалась значительно выше после трансплантации эмбрионов от доноров, от которых были получены бластоцисты только седьмого дня, и от доноров, от которых получили эмбрионы седьмого и девятого дней развития. Это больше по сравнению с показателями доноров, от которых получены бластоцисты седьмого и восьмого дней, на 27,8 и 33,9 п.п. соответственно. Стельностей после пе-

ресадки эмбрионов от доноров, от которых получены бластоцисты только восьмого дня развития, не установлено. Из вышесказанного вытекает следующее: бластоцисты шестого дня развития, в отличие от эмбрионов седьмого дня, показывают высокую приживляемость в том случае, когда они получены в группе с эмбрионами других возрастов.

Анализ результатов трансплантации эмбрионов *in vitro* в зависимости от дня полового цикла реципиента показал, что наиболее эффективной была пересадка эмбрионов реципиентам на шестой и седьмой день после установленной охоты. Приживляемость при этом составила 41,2 и 45,1%, что на 19,8 и 24 п.п. выше по сравнению с результатами трансплантации эмбрионов реципиентам на восьмой день полового цикла.

Если учитывать возраст бластоцист, лучшая приживляемость зафиксирована при трансплантации шестидневных эмбрионов реципиентам на шестой и седьмой день полового цикла. Доля стельных животных составила 75 и 100% соответственно, что в 3,6 и 5 раз выше по сравнению с показателем при пересадке бластоцист на восьмой день полового цикла. Более низкие, но схожие результаты получены при трансплантации бластоцист седьмого дня развития. Доля стельных реципиентов при пересадке на шестой и седьмой дни полового цикла оказалась на 15 и 25 п.п. выше, чем при трансплантации на восьмой день, но на 35 и 50 п.п. ниже по сравнению с аналогичными показателями, полученными при пересадке эмбрионов шестого дня развития.

Реципиентами для трансплантации эмбрионов были телки разных возрастов, а также коровы. При пересадке эмбрионов животным в возрасте 14 месяцев доля стельных особей достигала 53,1%, что на 13,3–19,8 п.п. выше, чем при пересадке телкам других возрастов и коровам.

Таким образом, по результатам проведенных исследований, средний выход ооцитов на одну аспирацию составил 10,3, доля пригодных для постановки на дозревание ОКК — 84,9%, из которых 48,4% были отличного и хорошего качества. Высокий или выше среднего выход ооцитов получен после 56% аспираций. При этом выход эмбрионов после оплодотворения оказался значительно более высоким в группах животных, для которых характерны уровни выхода ооцитов средний и выше среднего. Разница по отношению к показателям, зафиксированным в других группах, составила 12,1–18,3 п.п. Выход эмбрионов от числа оплодотворенных ооцитов в зависимости от используемого быка колебался в пределах 8,3–41,7% при среднем показателе 25,2%. Наиболее высокой эмбриопродуктивностью обладал бык Dawson (41,7%), а наименьшей — бык Varsity (8,3%).

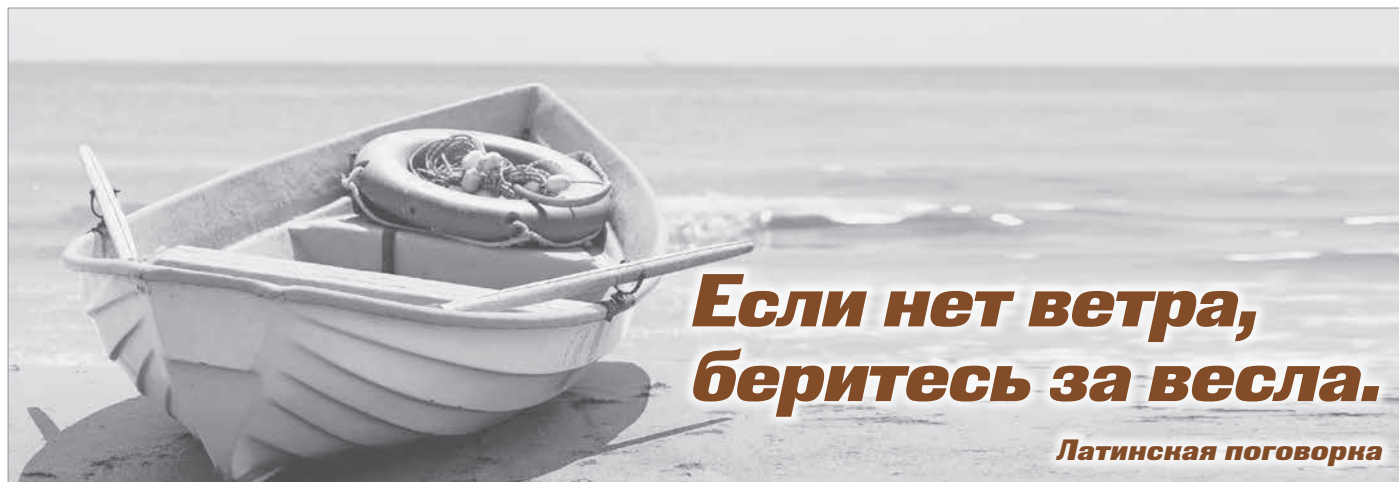
Доля аспираций, по результатам которых не получено ни одного эмбриона, по одному эмбриону и свыше трех эмбрионов, составила 18,5% в каждом случае. Доля аспираций, принесших два или три эмбриона, достигала 24,1 и 20,4% соответственно.

Если в целом доля стельных животных после пересадки эмбрионов шестого дня развития составляла 64,7%, то показатель при пересадке бластоцист

от доноров, от которых получены бластоцисты только шестого дня развития, был меньше на 31,4 п.п. (33,3%). Доля стельных реципиентов после трансплантации эмбрионов шестого дня от доноров, от которых получены бластоцисты и на шестой, и на девятый день, составила в среднем 58,8%. После пересадки бластоцист от доноров, от которых получены бластоцисты только на седьмой день, а также на седьмой и девятый дни, доля стельных животных оказалась выше, чем после пересадки бластоцист, полученных на седьмой и восьмой дни культивирования, на 27,8 и 33,9 п.п. соответственно. При пересадке эмбрионов от доноров, от которых получены бластоцисты только восьмого дня развития, стельностей не установлено.

Наиболее эффективной оказалась трансплантация эмбрионов шестого дня развития на шестой и седьмой дни полового цикла реципиента. Доля стельных животных при этом составила 75 и 100% соответственно. Эмбрионы седьмого дня развития предпочтительнее пересаживать реципиентам на седьмой день полового цикла (приживляемость — 50%). Приживляемость эмбрионов восьмого дня развития оказалась самой низкой при всех вариантах пересадки. Из 20 коров и телок, которым пересаживали бластоцисты восьмого дня развития, стельной стала только одна.

Установлено, что пересадка эмбрионов реципиентам в возрасте 14 месяцев была наиболее эффективной. Доля стельных животных составила 53,1%, что выше по сравнению с показателями телок других возрастов и коров на 15,3–33,1 и 19,8 п.п. соответственно. **ЖР**



**Если нет ветра,
беритесь за весла.**

Латинская поговорка