

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Биотехнологический центр по репродукции
сельскохозяйственных животных

**ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЕ
ОПЛОДОТВОРЕНИЕ ООЦИТОВ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**
(Методические рекомендации)

Гродно 2010

УДК: 636.2:612.64.089.67

ББК 46.0

Э 41

Авторы: Л.В. Голубец, А.С. Дешко, М.П. Старовойтова,
Е.К. Стецкевич, А.Е. Отрошенко, А.И. Бергель.

Рецензент: профессор, доктор медицинских наук М.Г. Величко.

Экстракорпоральное оплодотворение ооцитов
Э 41 крупного рогатого скота : методические рекомендации /
Л.В. Голубец и др. – Гродно : ГГАУ, 2010 – 48 с.

В рекомендациях представлены основные вопросы оплодотворения ооцитов крупного рогатого скота в системе *in vitro*.

Рекомендации предназначены для специалистов центров, пунктов трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, а также могут быть использованы в учебном процессе студентами сельскохозяйственных вузов и колледжей.

УДК: 636.2:612.64.089.67

ББК 46.0

Рекомендовано к изданию методической комиссией по зооветеринарным дисциплинам Учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет» (протокол № 5 от 20 января 2010 года).

Утверждены и рекомендованы к изданию на заседании секции НТС комитета по сельскому хозяйству и продовольствию Гродненского облисполкома (протокол № 1 от 25 февраля 2010 года).

© Коллектив авторов, 2010

© УО «ГГАУ», 2010

ОГЛАВЛЕНИЕ

Значение биотехнологии в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота.....	4
Культуральные среды.....	6
Отбор доноров ооцитов.....	9
Получение ооцит-кумулюсных комплексов.....	10
Поиск и оценка качества ооцитов.....	14
Созревание ооцит-кумулюсных комплексов.....	17
Подготовка спермы к оплодотворению. Оплодотворение.....	19
Культивирование ранних зародышей	28
Перечень необходимого оборудования инструментов и реактивов.....	30
Подготовка бокса и посуды.....	31
ПРИЛОЖЕНИЯ	32

ЗНАЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В ВОСПРОИЗВОДСТВЕ И СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Биотехнология открывает широкие возможности в разведении, селекции и воспроизведении крупного рогатого скота в плане повышения эффективности племенной работы и воспроизводства. Так, разработка методов искусственного осеменения и криоконсервации спермы существенно увеличила интенсивность отбора быков и точность их оценки, что в свою очередь ускорило темпы селекции в 2-3 раза.

В то же время генетический вклад матерей быков оставался значительно ниже отцов-быков, что объясняется низкой интенсивностью селекции и ненадежной оценкой их племенной ценности из-за недостаточного количества потомков. В какой-то мере снять эту проблему и призвана трансплантация эмбрионов.

За последние годы в технологии трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота произошел значительный прогресс, благодаря чему этот метод занял прочные позиции в селекционных программах в странах с развитым молочным скотоводством, где до 60-70% производителей на станциях искусственного осеменения получены этим методом, который наряду с искусственным осеменением рассматривается в качестве основы современной биотехнологии ускоренного и генетического совершенствования крупного рогатого скота.

Теоретически обосновано, что если от каждой коровы донора получать в год хотя бы 5 телят, то генетический эффект улучшения больших популяций высокопродуктивного молочного скота может достигать 47%. Увеличение выхода молодняка от одной коровы позволяет повысить точность определения племенной ценности матерей быков и на этой основе повысить интенсивности отбора среди матерей — матерей отцов и матерей матерей.

Так, если при традиционных методах селекции для получения следующего материнского поколения отбирается 9 коров из 10, т.е. 90%, то при использовании трансплантации эмбрионов этот показатель можно снизить до 10% (при условии получения 10 телят от коровы в год). При таком отборе интенсивность селекции среди матерей возрастает в 9 раз с 0,195 до 1,775. Таким образом, интенсивное использование высокопродуктивных коров в качестве доноров позволяет ускорить получение не только племенных быков, но и создавать в короткие сроки высокопродуктивные семейства.

Другим не менее важным фактором, обеспечивающим селекционный прогресс при трансплантации, является сокращение интервала между поколениями, особенно это проявляется при использовании телочек в 2-х месячном возрасте и молодых животных. При этом эффект селекции увеличивается на 20-25% по сравнению с использованием старых коров.

В условиях интенсивного промышленного производства ввод первотелок в основное стадо составляет 25-30% или иными словами 25-30% коров по разным производственным причинам выбывают из стада. Среди таких животных значительный процент составляют животные с высокой племенной ценностью и нормально функционирующей половой системой. В таких обстоятельствах технология трансплантации эмбрионов может принести значительную пользу. Если таких коров использовать в качестве постоянных доноров 4-5 раз в год, то от каждой из них можно получить до 10-12 телят и таким образом за небольшой промежуток времени (2-3 года) создать высокоценное семейство. Расчеты показывают, что при использовании доноров в количестве 80 голов и получении 4-5 полноценных эмбрионов от каждой коровы с их приживляемостью 50% и отходом молодняка 10% можно за 1 год получить 360 бычков и 360 телочек.

Таким образом, за короткий период времени хозяйство может создать селекционное стадо, а элеватор пополнится соответствующим количеством ремонтных бычков.

Использование гомо- и гетерозиготных близнецов позволяет с одной стороны увеличить выход приплода на одну голову (до 130-150%), что крайне важно для наращивания производства мясной продукции, а с другой – приносит неоценимую пользу при решении вопроса повышения точности оценки родительских пар по качеству потомства.

Такие животные имеют неоспоримое преимущество перед своими сверстниками при изучении вопросов физиологии, биохимии, генетики, наследственности, иммуногенетики, иммунологии и воспроизводства.

Важнейшей проблемой, которую можно решить только с использованием биотехнологических методов, является получение потомства заданного пола.

Все более широкое распространение в практике животноводства получает наряду с трансплантацией и принципиально новый метод повышения интенсивности использования огромного запаса яйцеклеток - это биотехнология *in vitro*, основанная на способности ооцитов, извлеченных из фолликулов, инициировать в

соответствующих условиях мейоз и созреть до стадии оплодотворения (метафаза 2) вне организма.

Если раньше внедрение в практику ведения животноводства данного метода осложнялось тем, что яичники можно было получить только после убоя животного, то в настоящее время созданы инструменты и оборудование, которые позволяют извлекать ооциты прижизненно без какого-либо вреда для здоровья животного.

С разработкой данного метода снимается проблема гормональной обработки животных. Аспирацию ооцитов можно проводить в любой фазе полового цикла, а также в первой половине стельности 1-2 раза в неделю, у проблемных животных, которые в течение продолжительного времени не осеменяются и не дают эмбрионов при использовании трансплантации эмбрионов, но которые раньше имели приплод.

Кроме того, биотехнология *in vitro* представляет хорошую модель для изучения оогенеза, процессов оплодотворения и раннего эмбрионального развития зародышей, что является важным фундаментом познания закономерностей развития живого организма.

Результаты таких исследований будут иметь в последствии большое значение не только для получения племенного молодняка, но и для создания животных с трансформированной ДНК (трансгенных животных), продуцентов биологически активных соединений для нашей фармакологической промышленности с целью производства безопасных, экологически чистых лекарственных препаратов.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Ключевым моментом всех этапов технологии *in vitro* (рисунок 1), который определяет ее успех, является адекватный подбор питательных сред и условий культивирования, адекватных естественной среде для предимплантационного развития.

Культуральная среда для системы *in vitro* должна быть максимально приближена по всем параметрам к естественным жидкостям, в которые ооциты и эмбрионы животного находятся *in vivo*. Практика показала, что многие среды, различающиеся по составу, вполне успешно могут имитировать естественную среду. Однако существует несколько основных характеристик, которым они обязательно должны соответствовать.

Уровень pH.

Обычно уровень pH среды должен равняться 7.2-7.4, что соответствует pH крови. Экспериментально было показано, что такая кислотность оптимальная для оплодотворения и предимплантационного развития эмбрионов. В качестве буферной системы обычно используется бикарбонатный буфер в присутствии 5% CO₂ в атмосфере. Выбор на этот буфер пал в связи с тем, что он соответствует буферной системе крови, а парциальное давление CO₂ в легких составляет 40 мм РТ. ст., что соответствует 5%. Для индикации pH используется феноловый красный, меняющий окраску с фиолетовой (через красную оранжевую) на желтую при закислении среды – изменении pH с 8,0 до 6,5. При pH 7,4 среда с таким индикатором приобретает характерный красно-оранжевый цвет.

Осмолярность.

Важной характеристикой среды является ее осмолярность, определяемая концентрацией и константами диссоциации ее компонентов. Обычно осмолярность равняется 285 м Осм/кг воды и соответствует таковой крови. Ооциты и эмбрионы млекопитающих обычно культивируются в открытых системах с максимально достигаемой влажностью (80-98% в зависимости от модели инкубатора), что предотвращает сильные колебания осмолярности в процессе культивирования.

Качество воды.

Основой любой культуральной среды является вода, качество которой во многом определяет успех культивирования. Для питательных сред используется вода, полученная после двойной дистилляции, ультрафильтрации либо дионизации. При этом необходимо соблюдение полной стерильности в процессе ее приготовления и хранения. Эндотоксины, выделенные бактериями, оставшимися в среде после ее ультрафильтрации, могут оказать токсическое взаимодействие на эмбрионы. То же может произойти и при попадании бактерий в среду в процессе ее хранения.

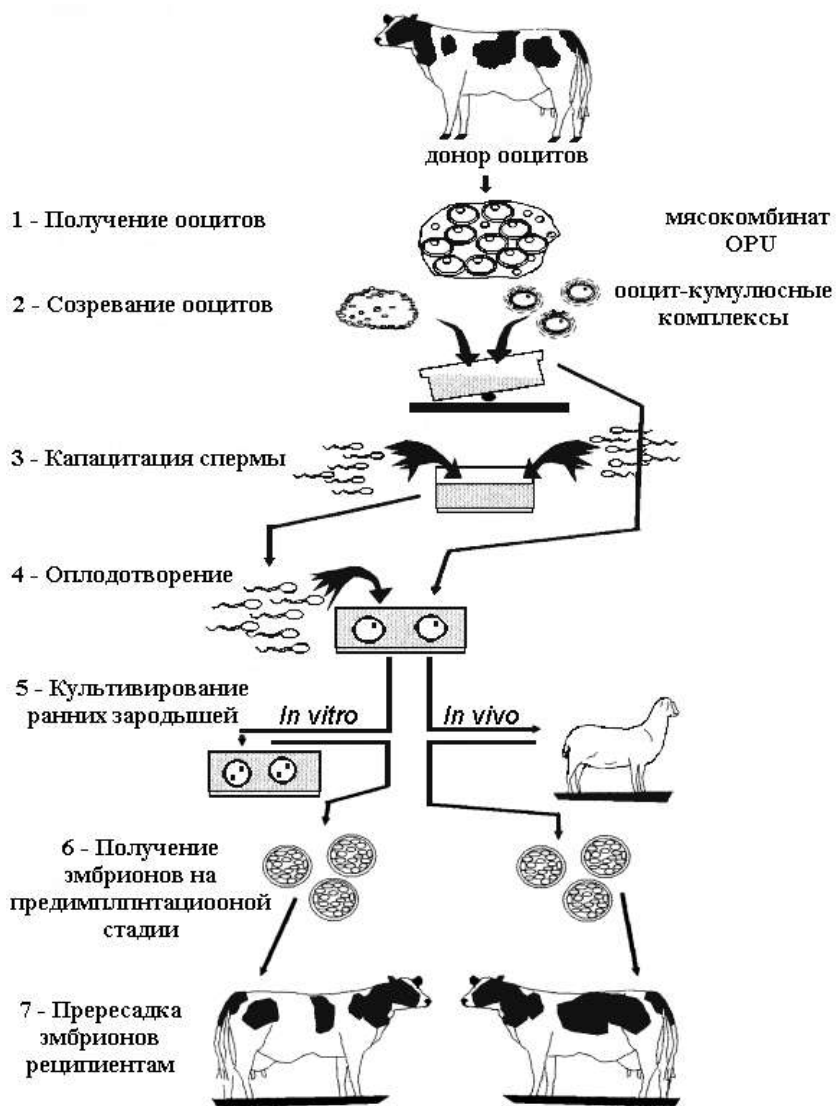


Рисунок 1 – Этапы технологии *in vitro*

Ионный состав.

Ионный состав культуральных сред может сильно варьировать. Первые среды для культивирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих представляли собой модификацию раствора Кребса и содержал ионы, необходимые для поддержания жизни клеток – Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , PO_4^{3-} , и Cl^- , растворенные в бикарбонатном буфере (HCO_3).

Источник белка.

В качестве источника белка в основном используется бычий сывороточный альбумин, эстральная сыворотка или же сыворотка плодов коровы.

Энергетический субстрат.

Энергетическим субстратом для ооцитов и эмбрионов млекопитающих в культуральной среде обычно содержит пируват натрия, лактат натрия и глюкоза, при этом усвоение глюкозы начинается только после нескольких делений эмбриона. До этого основным источником энергии является пируват. Добавление аминокислот во многие культуральные среды объясняется их присутствием в жидкости яйцеводов. Однако при введении в среду аминокислот следует иметь ввиду, что не все они стабильны в условиях культивирования. При температуре 37°C многие из них разрушаются, образуя аммоний, который при накоплении в среде обладает токсическим эффектом.

ОТБОР ДОНОРОВ ООЦИТОВ

Донор - это животное высокой племенной ценности. Поэтому в первую очередь при его отборе учитывается молочная продуктивность, которая за ряд лактаций должна быть на 50-60% выше стандарта породы а в нашем случае не ниже 9000 кг молока за лактацию с содержанием жира не ниже чем 3,8% и белка не ниже 3,5%. Число учитываемых признаков может быть расширено и дополнительно включать такие показатели как пригодность к машинному доению, форма вымени, скорость молокоотдачи, крепость конституции, экстерьер и т.д. Племенная ценность донора наряду с оценкой собственного генотипа должна подтверждаться соответствующими показателями родителей и ближайших родственников.

ПОЛУЧЕНИЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Ооцит-кумулусные комплексы можно получать по двум направлениям.

Первое – получение ооцитов из яичников коров, убитых на мясокомбинате (для испытания и контроля питательных сред, отработки методик).

После убоя животного, яичники овариоэктамируются с помощью ножниц, помещаются в один из растворов: физраствор, раствор Хенкса или же буфер Дюльбекко и при температуре 32-36⁰С доставляются в лабораторию (приложение 1, А). По нашим данным наилучшее время доставки - до 3 часов. При этом выход Мо-В1 составлял 19-27,3% от числа ооцитов поставленных на созревание. Увеличение длительности кратковременного хранения до 6,0 часов сокращает данный показатель на 9,8-13,2%, до 9 часов на 15,8-17,9%. Кратковременное хранение яичников свыше 9 часов при данной температуре исключает возможность получения эмбрионов на предимплантационной стадии развития.

Поэтому при доставке яичников в лаборатории через шесть часов и более желательно использовать раствор с температурой 20-25⁰С. При это выход морул и бластоциста сохраняется на уровне 21-26,8% (3,1-6,0 часов) и 18,2 и 22,2% при длительности хранения 9-12 часов.

В лаборатории яичники освобождаются от соединительной ткани и дважды промываются в свежем растворе, после чего начинается процедура выделения ооцитов. Она может проходить по следующим направлениям: надрез стенки фолликула, рассечение ткани яичников и аспирация (рисунки 2-4).

В наших опытах более эффективным по выходу жизнеспособных клеток оказался надрез стенок фолликулов - 53,4% против 46,3 и 49,2% при рассечении ткани яичников и аспирации. Однако из-за большей простоты и более высокого общего выхода ооцитов (на 31-31,8%) более приемлемым является рассечение ткани яичников.

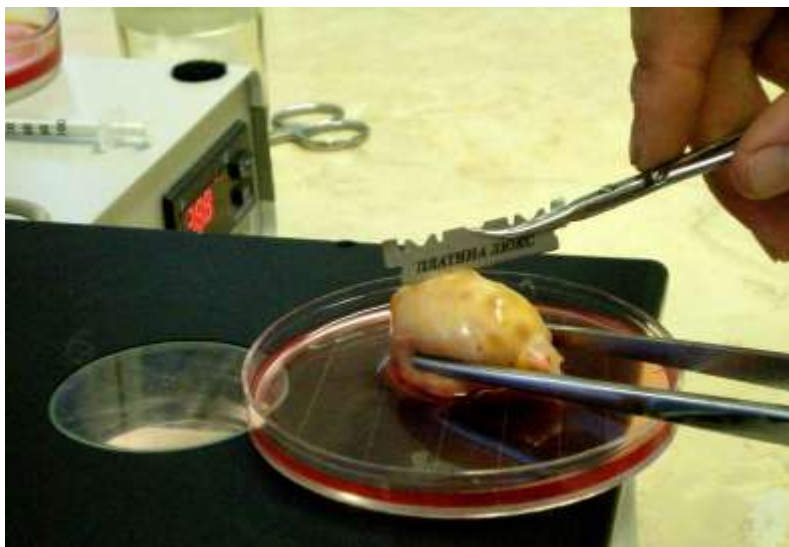


Рисунок 2 – Надрез стенки фолликулов



Рисунок 3 – Рассечение ткани яичников



Рисунок 4 – Аспирация



Рисунок 5 – Трансцервикальная аспирация (ОРУ) с использованием ультразвукового зонда



Рисунок 6 – Оборудование для трансцервикальной аспирации ооцитов



Рисунок 7 – Ультразвуковой зонд и игла для пункции фолликулов

Вторым направлением, более совершенным и прогрессивным, является трансцервикальная аспирация ооцитов (ТАО), или по международной классификации «Ovum pick up (OPU)». Сущность данного метода заключается в том, что яйцеклетки получают с помощью ультразвукового зонда (рисунок 5-7). Преимущество данного метода заключается в том, что извлечение можно проводить до двух раз в неделю независимо от стадии полового цикла. Процедуру можно проводить у телок и у коров до первой половины стельности. По некоторым данным на одну операцию можно получить до 8 ооцитов, из которых число пригодных для культивирования составляет около 60%. После оплодотворения и культивирования ранних зародышей на одну операцию получают 1,72 зародыша.

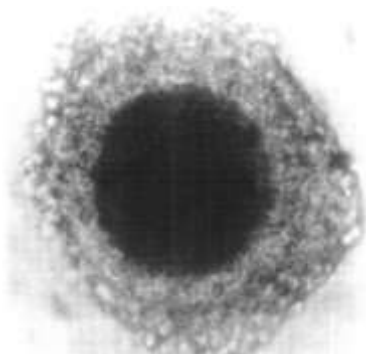
ПОИСК И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ООЦИТОВ

Для ускорения процесса и облегчения поиска, раствор, в котором происходило выделение ооцитов, пропускается через фильтр Reuch с диаметром 50 мк. После этого полученная жидкость просматривается под микроскопом (Olympus) при увеличении 15-20 крат. Найденные ооциты помещаются в среду для отмывания, содержащую буфер HEPES и позволяющую манипулировать с ооцитами на открытом воздухе без риска изменения pH. Затем клетки отмываются в культуральной среде. После чего проводится оценка их качества (рисунок 8-9, таблица 1).

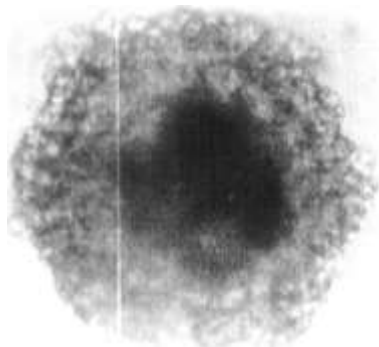
После оценки качества ооциты помещаются либо в 4-х луночную чашку, либо в чашку Петри 400 мм. Также допускается культивирование в небольших (по 5-10 мкл) каплях под минеральным маслом, предварительно калиброванного с культуральной средой в присутствии 5% CO₂. Преимущество культивирования под маслом: препятствие попадания в культуральную среду микроорганизмов, микрочастиц пыли, возможность культивирования в небольших каплях среды, что важно при оплодотворении спермой с небольшой концентрацией активных сперматозоидов, а также замедление испарения воды и выход CO₂ из среды вне инкубатора. Недостатком является то, что при длительном нахождении вне инкубатора к исходному равновесию влажности и концентрации CO₂, займет гораздо больше времени, чем в отсутствии масла.



Рисунок 8 – Поиск и оценка качества ооцитов



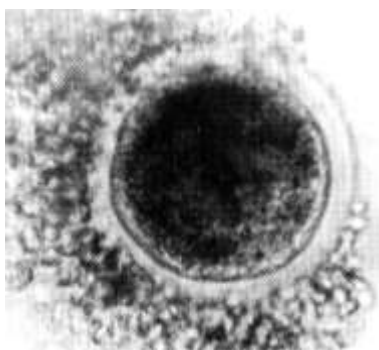
A



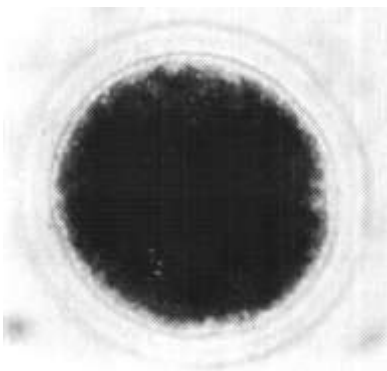
B



C



D



E

Рисунок 9 – Градация ооцитов по качеству

- A** - Ооцит отличного качества
- B, C** - Ооциты хорошего качества
- D** - Ооцит удовлетворительного качества
- E** - Ооцит непригодный для культивирования

Таблица 1 - Классификация ооцит-кумулюсных комплексов

№ п/п	Морфологические признаки	Оценка
1	Многослойный компактный кумулюс (не менее 3-х слоев) плотно прилегающий к зоне пеллюцида, ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет прозрачную оболочку, которая равномерная по толщине, апполискирует, не имеет никаких нарушений, округлая по форме	5
2	Многослойный компактный или разрыхленный кумулюс, плотно прилегающий к зоне пеллюцида, ооплазма имеет участки гранулярной конденсации, прозрачная оболочка округлая, апполискирующая, не имеет дефектов, равномерная по толщине	4
3	Частично отслоившийся кумулюс, ооплазма имеет участки гранулярной конденсации, прозрачная оболочка равномерная по толщине, округлая по форме	3
4	Ооцит без кумулюса, ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет зону пеллюцида, прозрачная оболочка округлая, равномерная по толщине	2

Продолжительность дозревания ооцит-кумулюсных комплексов составляет 24 часа. Все манипуляции с клетками проводят или с помощью оттянутых стерильных пастеровских пипеток или же с использованием стандартных заводских пипеток Unopette. Оценка качества и зрелости ооцита по его морфологическому состоянию как правило субъективна и часто не отвечает истинному состоянию ооцита, очень часто встречается асинхронность в созревании ядра ооцита, ооплазмы и клеток кумулюса. Однако, другие методы оценки могут привести к повреждению ооцита и его гибели.

СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Среды, используемые для созревания ооцитов могут быть самыми разными Ham's F-10, MEM, SOF, Игла и ряд других: однако все они должны отвечать одному требованию: обеспечить качественное созревание ооцитов до стадии оплодотворения (МП). В настоящее время наиболее широко используемой комплексной средой созревания является ТСМ-199 с солями Игла, L – глутамином и 25 мМ Нерес (таблица 2). Непосредственно перед постановкой на культивирование она обогащается 10-20% эстральной сыворотки крупного рогатого скота, или сывороткой плодов коровы в том же объеме, бычьим сывороточным альбумином в концентрации 60 мг/мл, ФСГ-1-10 и эстрадиолом 1-5 мкг/мл. Дозревание ооцитов проходит в

условиях инкубатора при концентрации CO₂ - 5%, температуре 37-39⁰С и максимальной влажности 95-98% в течение 24 часов в чашках Петри Ø 40 мм, культуральных 5-ти луночных планшетах или же в каплях среды от 5 до 50 мкл под минеральным маслом.

Таблица 2 – Состав питательной среды TCM-199

Компоненты	г/л	Компоненты	г/л
Calcium Chloride	0,2	Choline Chloride	0,0005
Ferric Nitrate · 9H ₂ O	0,00072	Folic Acid	0,00001
Magnesium Sulfate	0,09767	Menadione (sodium bisulfite)	0,000016
Potassium Chloride	0,4	myo-Inositol	0,00005
Sodium Acetate	0,05	Niacinamide	0,000025
Sodium Chloride	6,0	Nicotinic Acid	0,000025
Sodium Phosphate Monobasic	0,122	p-Aminobenzoic Acid	0,00005
Alanine	0,025	D-Pantothenic Acid	0,00001
Arginine · HCl	0,07	Pyridoxal · HCl	0,000025
Aspartic Acid	0,03	Pyridoxine · HCl	0,000025
Cysteine · HCl · H ₂ O	0,00011	Retinol Acetate	0,00014
Cystine · 2HCl	0,026	Riboflavin	0,00001
Glutamic Acid	0,0668	Tocopherol Phosphate · 2Na	0,00001
Glutamine	0,1	Thiamine HCl	0,00001
Glycine	0,05	Adenine Hemisulfate	0,01
Histidine · HCl · H ₂ O	0,02188	Adenine 5'-Triphosphate · 2Na	0,001
Hydroxy-L-Proline	0,01	Adenosine 5'-Monophosphate · Na	0,0002385
Isoleucine	0,02	Cholesterol	0,0002
Leucine	0,06	2-Deoxy-ribose	0,0005
Lysine · HCl	0,07	Glucose	1,0
Methionine	0,015	Glutathione	0,00005
Phenylalanine	0,025	Guanine · HCl	0,0003
Proline	0,04	HEPES	5,958
Serine	0,025	Hypoxanthine	0,0003
Threonine	0,03	Phenol Red · Na	0,0213
Tryptophan	0,01	Polyoxyethylenesorbitan Monooleate	0,02
Tyrosine · 2Na · 2H ₂ O	0,05766	Ribose	0,0005
Valine	0,025	Thymine	0,0003
Ascorbic Acid Na	0,00005666	Uracil	0,0003
Biotin	0,00001	Xanthine · Na	0,000344
Ergocalciferol	0,0001		

ПОДГОТОВКА СПЕРМЫ К ОПЛОДОТВОРЕНИЮ. ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Оплодотворение представляет собой слияние двух гамет, влекущее за собой слияние их гаплоидных наборов хромосом и развитие нового организма. В процессе оплодотворения различают три фазы: 1) дистантное взаимодействие и сближение гамет; 2) контактное взаимодействие и активизация яйцеклетки; 3) вхождение сперматозоида в яйцо и последующее слияние — сингамия.

Первая фаза — дистантное взаимодействие — обеспечивается хемотаксисом — совокупностью специфических факторов, повышающих вероятность столкновения половых клеток.

Вторая фаза оплодотворения — контактное взаимодействие, во время которого сперматозоиды вращают яйцеклетку. Многочисленные спермии приближаются к яйцеклетке и вступают в контакт с ее оболочкой. Яйцеклетка начинает совершать вращательные движения вокруг своей оси со скоростью 4 вращения в минуту. Эти движения обусловлены влиянием биения жгутиков сперматозоидов и продолжаются около 12 ч.

Третья фаза - в ооплазму проникают головка и промежуточная часть хвостового отдела. После вхождения сперматозоида в яйцеклетку на периферии ооплазмы происходит уплотнение ее (зонная реакция) и образуется оболочка оплодотворения.

Кортикальная реакция — слияние плазмолеммы яйцеклетки с мембранами кортикальных гранул, в результате чего содержимое из гранул выходит в перивителиновое пространство и воздействует на молекулы гликопротеидов блестящей зоны (рисунок 12). Вследствие этой зонной реакции молекулы зоны пеллюцида модифицируются и утрачивают способность быть рецепторами спермиев. Образуется оболочка оплодотворения толщиной 50 нм, препятствующая полиспермии — проникновению других спермиев.

После сближения женского и мужского пронуклеусов, которое продолжается у млекопитающих около 12 ч, образуется зигота — одноклеточный зародыш (рисунок 11). Уже на стадии зиготы выявляются презумптивные зоны (лат. *presumptio* — вероятность, предположение) как источники развития соответствующих участков бластулы, из которых в дальнейшем формируются зародышевые листки. Зрелый ооцит к моменту оплодотворения представляет собой одну из наиболее больших клеток организма диаметром 110-120 мкм, окруженную блестящей оболочкой (*zona pellucida*), несколькими слоями

клеток кумулюса. К этому времени в ооците, как правило, уже завершилось первое мейотическое деление мейоза, в результате которого отделилось первое полярное тельце, а второе деление находится на стадии метафазы. Хромосомы располагаются в ряд, образуя метафазную пластинку, непосредственно под полярным тельцем. На этой стадии происходит блок мейоза, который снимается лишь при проникновении сперматозоида.

Зрелый сперматозоид имеет уплощенную грушевидную головку длиной около 6 мкм и шириной в экваториальном сегменте около 4 мкм состоящую главным образом из ядра и акросомы, которая содержит литические ферменты и расположена в виде шапочки над верхней половиной головки (рисунок 10). Хвост сперматозоида имеет длину около 50 мкм и начинается от головки в районе шейки, где расположены центриоль и комплекс митохондрий. В структуре сперматозоида все имеет только одну цель – доставить генетический материал, содержащийся в головке спермия в ооцит. Способность сперматозоида к оплодотворению *in vivo* или же *in vitro* появляется лишь после капацитации, под которой понимается весь комплекс биохимических и ультраструктурных изменений, которые претерпевает сперматозоид, проходя через женский половой тракт до встречи с ооцитом. Эти изменения затрагивают в основном мембрану головки сперматозоида. Капацитация *in vitro* проходит во время обработки и инкубирования спермы до оплодотворения, однако она невозможна при отсутствии в средах для отмывки и культивирования альбумина. Для нормального оплодотворения *in vitro* необходим не менее 50 тыс. сперматозоидов на ооцит, однако количество спермиев непосредственно атакующих ооцит насчитывается не более 2-3 тыс.

Прежде чем попасть в ооцит, сперматозоид должен преодолеть несколько барьеров (рисунок 12). Первым из них является кумулюс, представляющий собой матрикс, состоящий из полигиалуроновой кислоты, с редко расположенными клетками. Пройти этот барьер может только капацитированный сперматозоид с интактной акросомой. По мере продвижения внутрь кумулюса поведение сперматозоида меняется, резко увеличивается скорость, двухмерные движения становятся трехмерным – наступает фаза гиперактивности *in vitro*. Преодолеть первый барьер сперматозоидам помогает фермент **гиалуронидаза**, выделяющаяся при разрушении акросом гибнущих сперматозоидов. После прохождения кумулюса сперматозоид достигает зоны пеллюцида, где происходит его связывание с рецептором. Связывание сперматозоида возможно только при

интактной акросоме и нормальной морфологии головки, поскольку рецепторы к зоне пеллюцида находятся на головке.

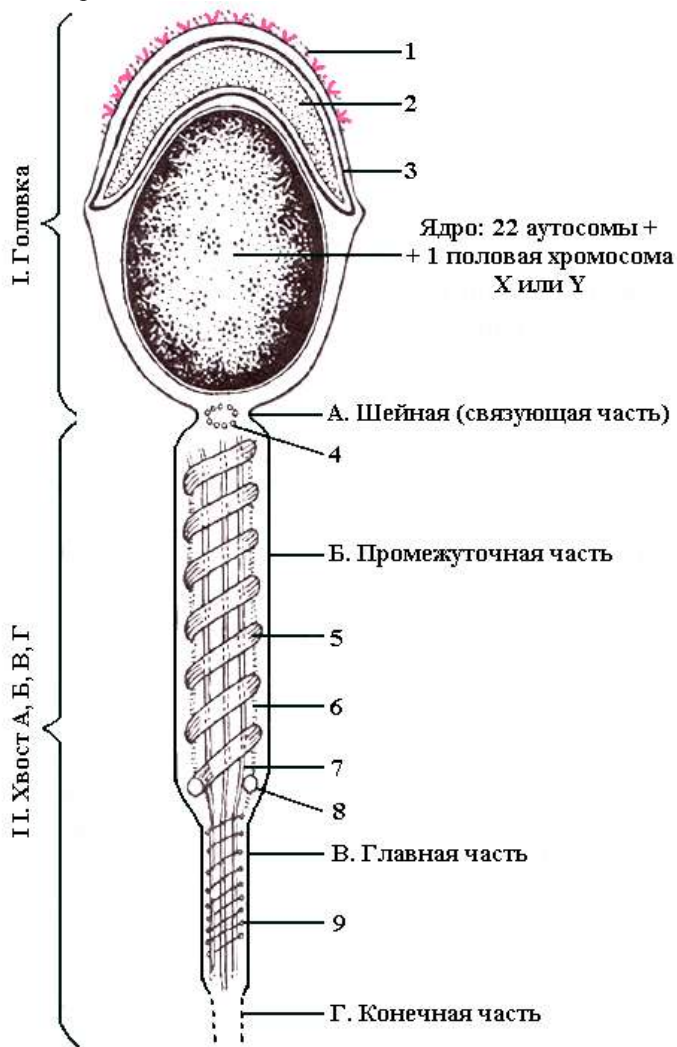


Рисунок 10 - Строение сперматозоида

I — головка; II — хвост; 1 — рецептор гликозилтрансфераза; 2 — акросомальная гранула; 3 — «чехлик»; 4 — проксимальная центриоль;

5 — митохондрия; 6 — слой упругих фибрилл; 7 — аксонема; 8 — дистальная центриоль; 9 — циркулярные фибриллы.

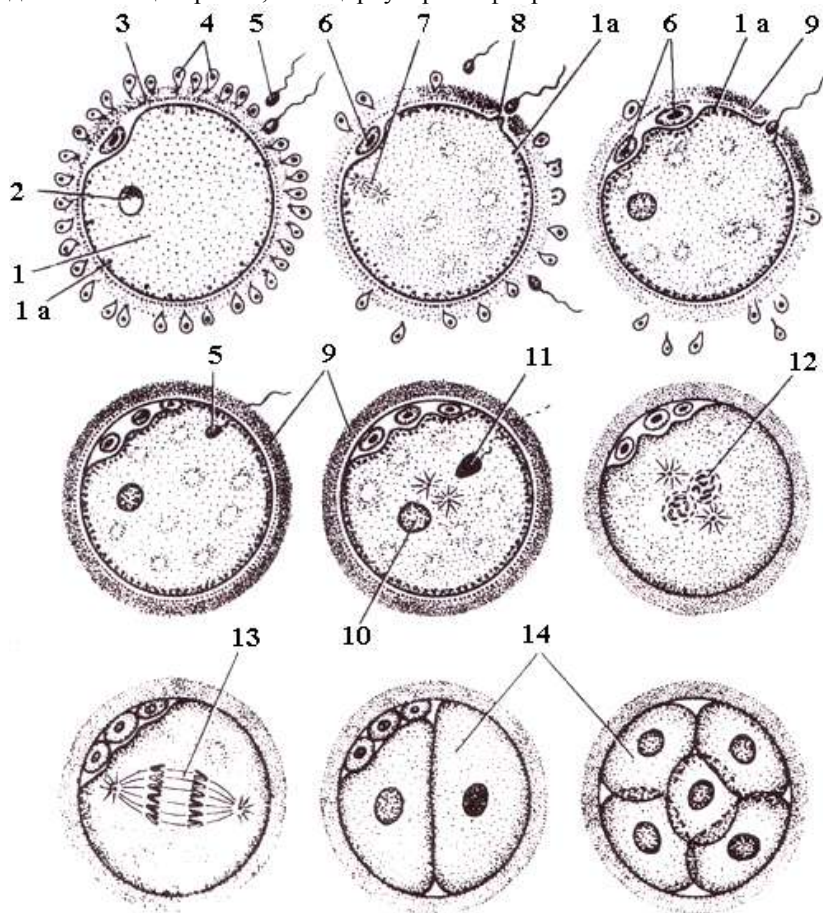


Рисунок 11 - Фазы оплодотворения и начало дробления

1 — ооплазма; 1a — кортикальные гранулы; 2 — ядро; 3 — блестящая зона; 4 — фолликулярный эпителий; 5 — спермин; 6 — редукционные тельца; 7 — митотическое деление ооцита; 8 — бугорок оплодотворения; 9 — оболочка оплодотворения; 10 — женский

пронуклеус; 11 — мужской пронуклеус; 12 — синкарион; 13 — первое митотическое деление зиготы; 14 — бластомеры.

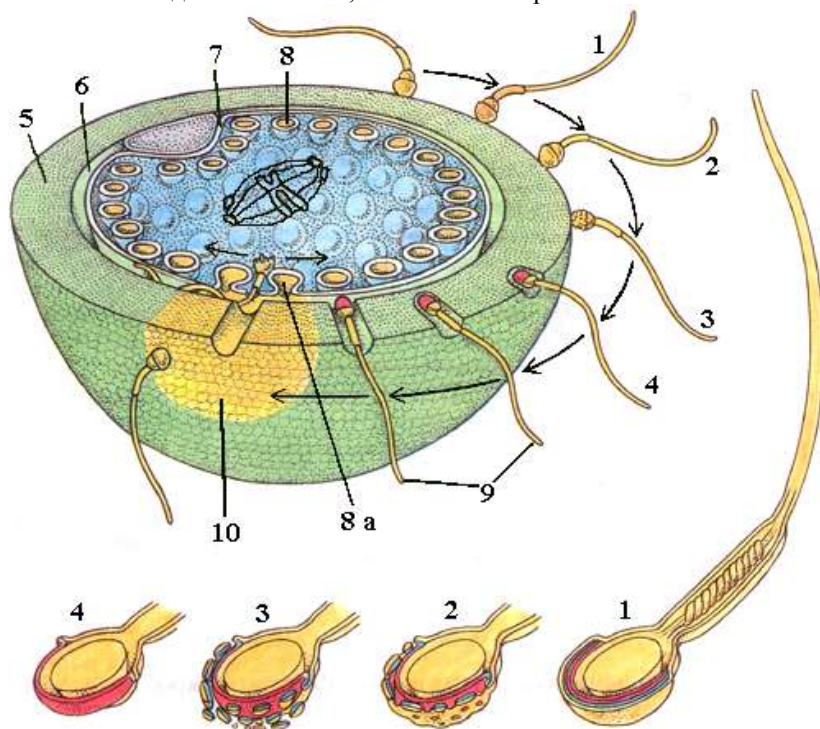
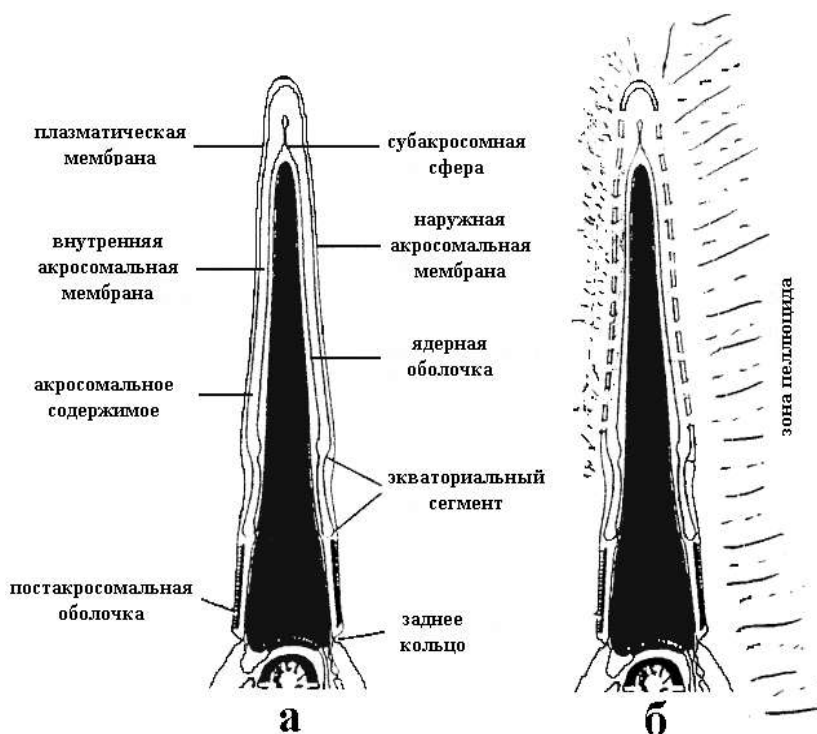


Рисунок 12 - Оплодотворение

1, 2, 3, 4 — стадии акросомной реакции; 5 — zona pellucida (блестящая зона); 6 — перивителлиновое пространство; 7 — плазматическая мембрана; 8 — кортикальная гранула; 8a — кортикальная реакция; 9 — вхождение спермия в яйцеклетку; 10 — зонная реакция.

Затем происходит акросомная реакция (рисунок 13) – мембрана акросомы и цитоплазматическая мембрана ооцита сливаются, содержимое акросомы (главным образом фермент акросомы, способный к локальному растворению гликопротеинов из клеток которых состоит зона **пеллюцида**) выбрасывается вместе с вязывания с зоной пеллюцида и сперматозоид интенсивно продвигаясь сквозь оболочку ооцита, все еще находится в состоянии гиперактивности.



а – интактная сперма
 б – сперма в процессе слияния плазмы и наружной акросомальной мембраны

Рисунок 13 – Схематичное изображение акросомной реакции

Попадая в перевелитиновое пространство, сперматозоид прикрепляется к рецепторам на мембране ооцита комплиментарными рецепторами. Связывание сперматозоида с рецепторами мгновенно вызывает т.н. кортикальную реакцию – массовый экзоцитоз гранул, что приводит к необратимым изменениям зоны пеллюцида, делающих его непроходимой для других спермиев. Далее начинается слияние мембран, сперматозоид как бы заглатывается ооцитом (процесс напоминает фагоцитоз). Далее ядерная мембрана сперматозоида разрушается. Ооцит активизируется, мейоз возобновляется, выделяется второе полярное тельце. (фактор активизации выделяется сперматозоидом). Формируется женский пронуклеус. Вокруг хроматина сперматозоида формируется мужской пронуклеус. Начиная движение друг к другу они встречаются в центре ооцита. Через несколько часов мембраны пронуклеусов разрушаются и генетический материал обоих клеток сливается (сингамия). На этом процесс оплодотворения завершается – возникает зигота.

Подготовка спермы к оплодотворению может проходить по двум направлениям: с использованием метода «swim-up» и с использованием Перколла.

При использовании метода swim-up одна пайета спермы аккуратно наслаивается на дно центрифужной пробирки Эпиндорф с 1 мл среды (рисунок 14) для капацитации и ставится на 60 мин в CO₂-инкубатор. За это время активная фракция спермы всплывает в верхнюю часть. Через час надосадочная жидкость отсасывается и помещается в другую пробирку и центрифугируется (рисунок 15) в течении 10 мин при 3000 об/мин, после чего надосадочная жидкость удаляется, а осадок разбавляется средой для капацитации с гепарином в концентрации 5 мкг/мл и центрифугируется в том же режиме. Далее супернатант удаляется, а осадок разбавлялся дважды и дважды центрифугировался со средой для оплодотворения (1 мл). Пока сперма центрифугируется в последний раз. Ооциты отмываются в среде для оплодотворения и помещаются в лунку с этой же средой после чего к ним добавляется сперма в концентрации 1 млн./мл (рисунок 16). Совместное инкубирование продолжается в течение 18-20 часов, после чего ооциты отмываются от среды для оплодотворения и помещаются в среду для культивирования ранних зародышей на монослой кумулюсных клеток, где зародыши созревают до предимплантационной стадии.



Рисунок 14 – Наслоение спермы



Рисунок 15 – Отмывание спермы путем центрифугирования



Рисунок 16 – Оплодотворение яйцеклеток

Важным шагом вперед в методике обработки спермы стало внедрение метода центрифугирования в градиенте Перколлы. Перколл представляет собой суспензию силиконовых гранул диаметром 15-30 нм покрытых слоем поливинилпиролитона (PVP), поскольку в чистом виде они токсичны для клеток. Особенностью Перколлы является его очень низкая осмолярность – 25 м осм/л, поэтому при разведении в среде до различных концентраций, соответствующих различным плотностям (от 1.01. до 1.13 г/л) осмолярность растворов остается постоянной.

Растворы (40 и 90%) готовятся из 100% раствора, представляющего собой смесь 9 частей Перколлы, 1 части 10-кратно концентрированной среды для отмывки.

Прерывистый градиент плотности достигается путем помещения 1,5 мл 40% Перколлы на 1,5 мл 90% в конической пробирке: сверху аккуратно наслаивается сперма (одна доза). Вся эта трехслойная колонка центрифугируется при 3000 об/мин в течении 10 мин. После центрифугирования в осадок попадает только функционально нормальные сперматозоиды: неподвижные и аномальные сперматозоиды, а также лейкоциты и другие клетки спермы задерживаются на границе 40 и 90% -х фракций. Осадок отбирается и

два раза отмывается в среде как и в случае применения методики swim-ур.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ

Культивирование ранних зародышей - это развитие оплодотворенной яйцеклетки (зиготы) до стадии морулы или бластоцисты (приложение 2,3). Культивирование предусматривает использование различных культуральных систем и проводится по нескольким направлениям: в условиях *in vitro* это происходит в синтетических питательных средах с или без использования монослойных культур различных видов соматических клеток (яйцеводов, гранулезы, трофобластов и др.) Однако такая система требует определенных подходов, навыков и времени при подготовке монослойных культур, что создает определенные сложности. Кроме этого такие среды характеризуются значительной вариабельностью своей биологической активности из-за непостоянства состава. В связи с этим, в последнее время пристальное внимание со стороны специалистов уделяется использованию синтетических питательных сред с четко определенным составом (так называемые «defined medium») без использования каких либо натуральных добавок и этих же сред, но с использованием различных вариантов сыворотки крови крупного рогатого скота, сыворотки плодов коровы и BSA (бычий сывороточный альбумин) (так называемые «semi defined medium»). Несмотря на несколько более низкую эффективность такие среды, и в частности SOF (синтетическая среда яйцеводов), получили достаточно широкое применение, особенно при широкомасштабном получении эмбрионов на коммерческой основе.

В сложившейся ситуации нами предлагается следующий вариант культивирования ранних зародышей: после оплодотворения зиготы три-четыре раза отмываются от спермы в среде для культивирования и пересаживаются в ту же среду в которой они созревали. К этому времени в ней начинает расти монослой из клеток кумулюса, оставшегося в среде после пептирования ооцитов при переносе их в среду для оплодотворения. В этих условиях зародыши культивируются в течении 7-9 дней, до предимплантационных стадий.

Динамика развития эмбрионов отражена в таблице 3.

Время культивирования, ч	Всего	Неоплодотворенных яйцеклеток	Эмбрионы											Вл выш. из зоны
			2-кл.	3-кл.	4-кл.	6-кл.	8-кл.	16-кл.	Мо I	Мо II	Вл I	Вл II	Вл эксп.	
96	72	42	3	1	11	2	9	4	-	-	-	-	-	-
120	72	38	4	1	7	-	5	1	7	8	1	-	-	-
168	72	37	4	-	1	-	2	-	5	16	7	-	-	-
192	72	37	-	-	4	-	-	-	3	8	15	3	2	-
264	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	3	8

Таблица 3 - Динамика развития эмбрионов крупного рогатого скота вне организма

Как видно из данных таблицы 2, через 96 часов после оплодотворения в культуральной среде присутствуют 2-х, 4-х, 8-ми, и 16-ти клеточные зародыши. Ранние и поздние морулы, а также ранние бластоцисты появляются через 120 часов. Через 192 часа в среде обнаруживаются поздние и экспандированные бластоцисты, а через 264 часа – вышедшие из зоны пеллюцида. Наличие в питательной среде на каждый конкретный момент времени эмбрионов на разных стадиях развития свидетельствует о не одномоментности оплодотворения яйцеклеток.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ ИНСТРУМЕНТОВ И РЕАКТИВОВ (приложение 4)

1. Стереоскопический микроскоп.
2. Инвертированный микроскоп.
3. CO₂ – инкубатор.
4. Микроцентрифуга.
5. Аналитические весы.
6. Сушильный шкаф.
7. Термостат.
8. Холодильник-морозильник.
9. Лабораторные столы.
10. Предметные и покровные стекла.
11. Химическая посуда (стаканы, колбы, цилиндры разного объема.
12. Микродозаторы на 1-10 мкл и 10-100 мкл.
13. Пробирки «Эпиндорф» объемом 1,5-2,0 мл.
14. Чашки «Петри» стеклянные и пластмассовые диаметром 90 и 40 мм.
15. Чашки культуральные 5-ти луночные.
16. Фильтры и фильтровальные мембраны.
17. Хирургические инструменты (ножницы, скальпели, зажимы, и др.).
18. Сосуды Дьюара (50 л, 20 л и 5 л).
19. Замораживатель эмбрионов.
20. Шприцы одноразовые (1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл и 20 мл).
21. Спиртовки.
22. Вата хирургическая.
23. Маркеры.
24. Спирт.

ПОДГОТОВКА БОКСА И ПОСУДЫ

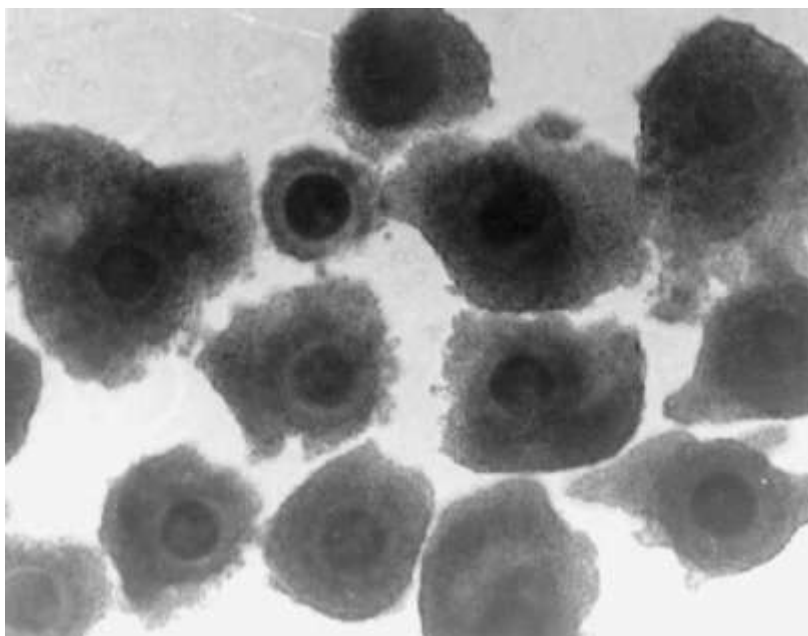
Накануне проведения работ в боксе проводится влажная уборка. За 2-2,5 часа до работы с яичниками столы, микроскопы и другое оборудование протирается 70% этиловым спиртом. Само помещение стерилизуется кварцеванием в течении 25-30 мин.

Стеклянная посуда перед использованием моется в проточной воде с моющими средствами. Пластмассовая посуда сушится при температуре 55-60⁰С в сушильном шкафу, затем запаивается в полиэтиленовую пленку и ставится под бактерицидную лампу на 30-40 минут. Стеклянная посуда и хирургический инструмент после того, как он высохнет заворачивается в фольгу или же в пергаментную бумагу и стерилизуется в сушильном шкафу при температуре 160-180⁰С в течении 30-40 мин. Рабочие среды готовятся заблаговременно накануне проведения работ с клетками. Среда для созревания должна перед использованием минимум 1 час находиться в СО₂ инкубаторе. Среда для капацитации и оплодотворения минимум за 5 часов должны быть поставлены в СО₂ инкубатор.

Приложение 1

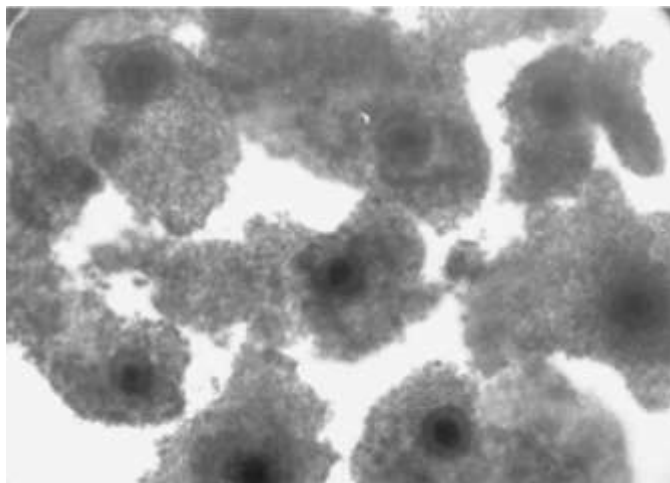


А. Яичники перед извлечением ооцит-кумулюсных комплексов

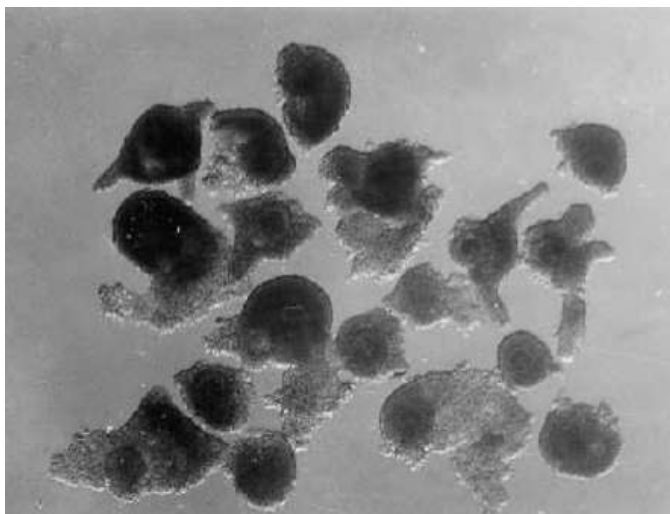


В. Ооциты до созревания

Продолжение приложения 1



С. Ооциты после созревания



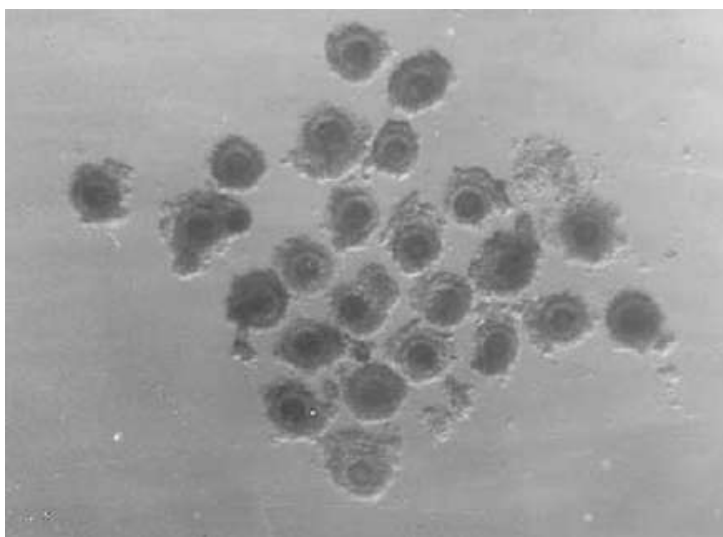
Д. - Ооциты пригодные для культивирования in vitro

Д 1. Ооциты с многослойным плотно прилегающим кумулюсом

Продолжение приложения 1

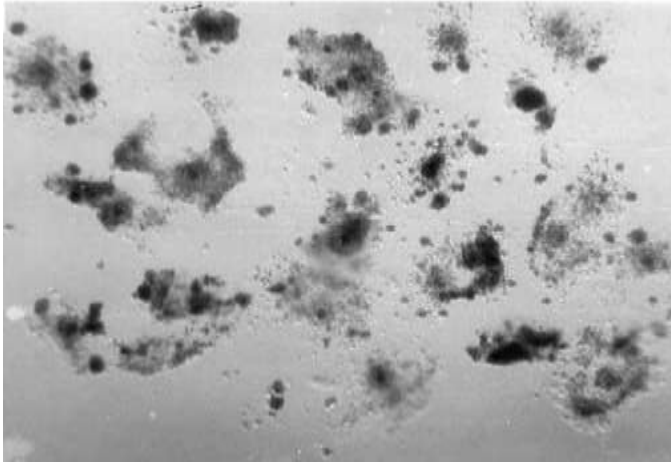


Д 2. Ооциты с 2-3-мя слоями кумулюса



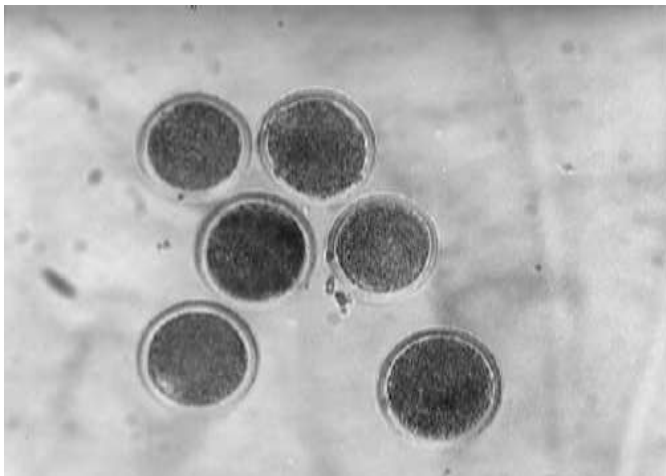
Д 3. Ооциты с 3-4-мя слоями кумулюса

Продолжение приложения 1



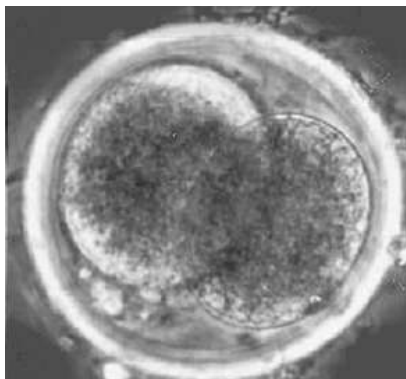
Е. - Ооциты непригодные для культивирования *in vitro*

Е1. Ооциты с экспандированными и рассеянными клетками кумулюса, сформировавшимися в темные группы

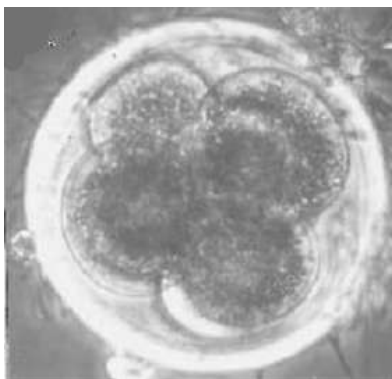


Е2. Ооциты без кумулюса

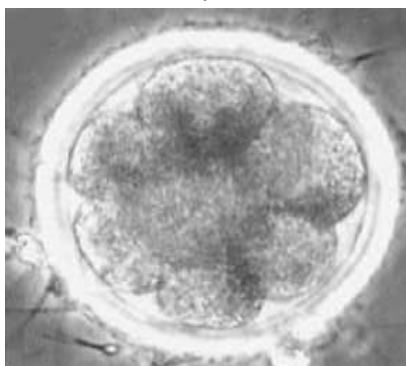
Приложение 2



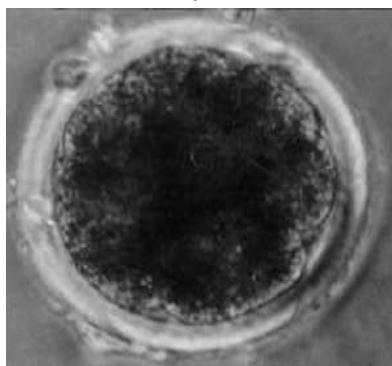
2.1



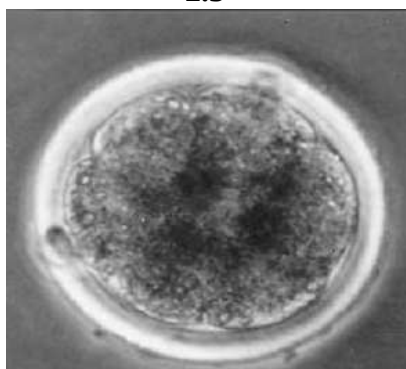
2.2



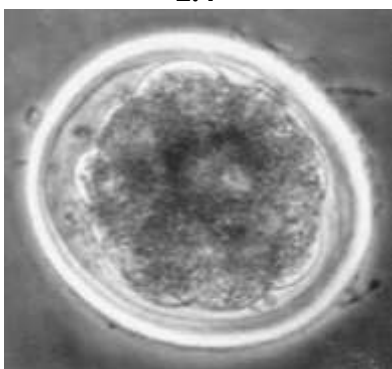
2.3



2.4

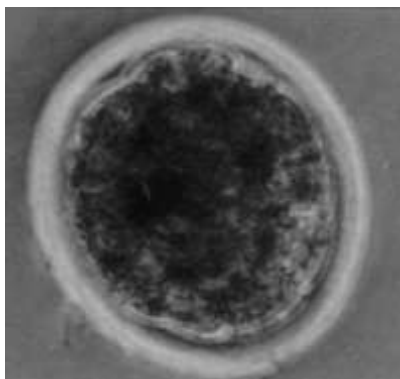


2.5



2.6

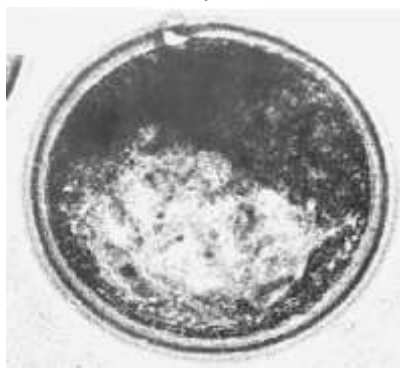
Продолжение приложения 2



2.7



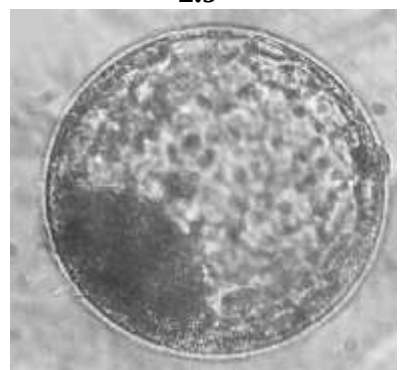
2.8



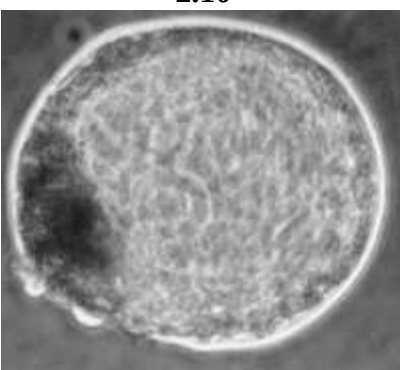
2.9



2.10

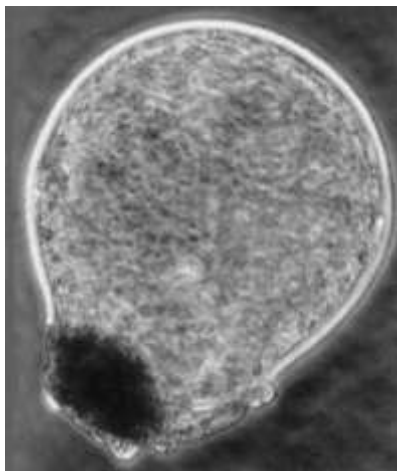


2.11

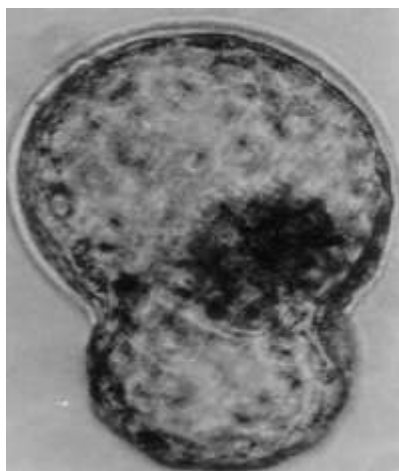


2.12

Продолжение приложения 2



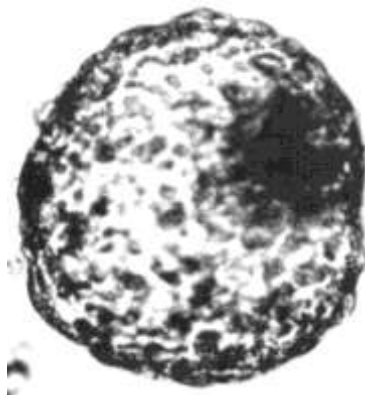
2.13



2.14



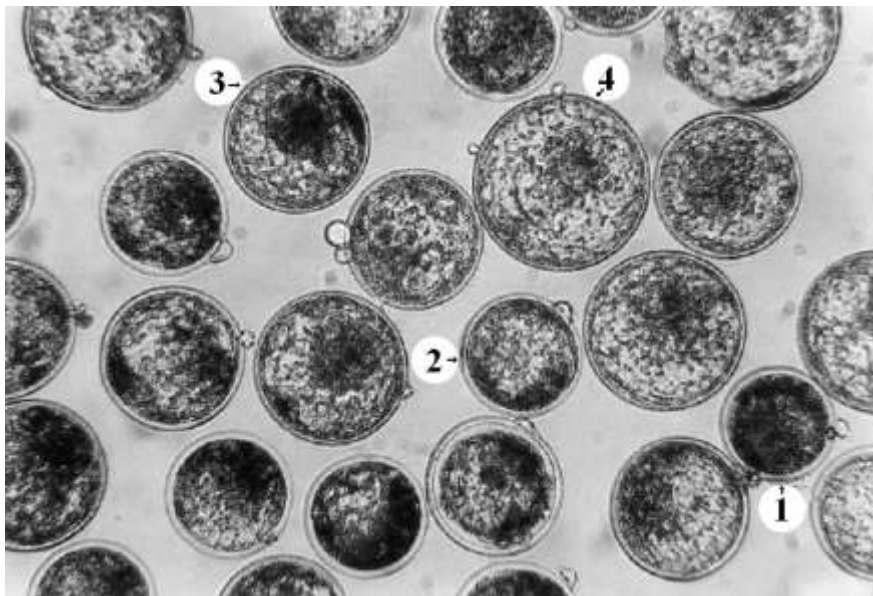
2.15



2.16

Стадии развития эмбрионов в культуре *in vitro*

2.1 – 2 клеточный; **2.2** – 4 клеточный; **2.3** – 8 клеточный; **2.4** – 16 клеточный; **2.5** - 16-32 клеточный; **2.6** - ранняя морула; **2.7** – поздняя морула; **2.8** - переход морулы в раннюю бластоцисту; **2.9** - ранняя бластоциста; **2.10** – поздняя бластоциста; **2.11** - экспандированная бластоциста; **2.12–2.16** -процесс выхода бластоциста из зоны пеллюцида.



**Культивирование ранних зародышей: от морулы до
бластоцисты**

(Одновременно, в одной чашке присутствуют эмбрионы на
разных стадиях развития)

1 – морула; **2** – бластоциста ранняя; **3** – бластоциста поздняя; **4** –
бластоциста экспандированная

Приложение 4



4.1



4.2

Продолжение приложения 4



4.3



4.4

Продолжение приложения 4



4.5



4.6

Продолжение приложения 4



4.7



4.8

Продолжение приложения 4



4.9



4.10

Продолжение приложения 4



4.11



4.12

Продолжение приложения 4



4.13

Оборудование и реактивы

4.1 – CO₂-инкубатор; **4.2** - стереомикроскопы; **4.3** – замораживатель эмбрионов; **4.4** – миницентрифуга; **4.5** – аналитические весы; **4.6** - криохранилище для эмбрионов; **4.7** - термостат; **4.8** – стерилизатор суховоздушный; **4.9** – бидистиллятор; **4.10** - термоконтейнер для хранения и транспортировки эмбрионов; **4.11–4.13** - посуда, реактивы.

Научное издание

Голубец Леонид Викторович
Дешко Александр Станиславович
Старовойтова Марина Петровна
Стецкевич Елена Казимировна
Отрощенко Александр Евгеньевич
Бергель Алла Ивановна

ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЕ ООЦИТОВ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(Методические рекомендации)

Компьютерная верстка: А.С. Дешко

Подписано в печать 11.03.2010г.
Формат 60х84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать Riso. Усл.печ.л. 2,79. Уч.-изд.л. 2,60.
Тираж 100 экз. Заказ № 2190.

Учреждение образования
«Гродненский государственный аграрный университет»
Л.И. № 02330/0548516 от 16.06.2009.
230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28.

Отпечатано на технике издательско-полиграфического отдела
Учреждения образования «Гродненский государственный
аграрный университет»
230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28.

