

УДК 636.2:612.64.089.67

## ИСКУССТВЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Голубец Л.В.- д. с.-х. наук, гл. науч. сотр. отраслевой биотехнологической лаб. по репродукции с.-х. животных  
УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, гормональная стимуляция, эмбрионы, ооциты, фолликулы, аспирация ооцитов, дробление эмбрионов, in vitro, яйцники, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), воспроизводство животных, трансплантация эмбрионов. **Key words:** cattle, hormonal stimulation, embryos, oocytes, follicles, oocyte aspiration, embryo fragmentation, in vitro, ovaries, in vitro fertilization (IVF), animal reproduction, embryo transplantation.



### РЕФЕРАТ

В работе представлены результаты исследований по изучению влияния экзогенной регуляции фолликулогенеза на эффективность получения эмбрионов в культуре in vitro. Исследования проводились в рамках государственной программы научных исследований «Научные технологии и техника на 2016-2020 годы» (подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии-2020»). Исследования проводили на базе отраслевой биотехнологической лаборатории по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет». Установлено, что количество аспирированных фолликулов на одну аспирацию увеличивалось у стимулированных животных по сравнению контрольной группой на 19,2-39,7%. Количество пригодных для постановки на созревании ооцитов повышалось только у групп, которые обрабатывались препаратом ФСГ-супер в дозе 12,5 и 50 Арм. ед. на 4,1 и 3,4 п.п., соответственно. Также оказался ниже у контрольной группы и уровень дробления на 2,2-6,6%. По выходу эмбрионов, при расчете от числа оплодотворенных ооцитов, несколько лучше оказалась контрольная группа – на 2,3-2,6 п.п. или 25,5% против 20,9%, 23,2% и 23,2% при использовании 12,5, 25 и 50 Арм. ед., соответственно. При стимуляции доноров гормональным препаратом Плюснет, по количеству аспирированных фолликулов, разница в пользу опытных групп составила 4,6-68,7%, по выходу пригодных клеток показатели несколько выравнивались и преимущество опытных групп составило только 1,4-7,8 п.п. По количеству дробящихся зародышей контрольная группа превзошла опытные на 1-7-10,0 п.п. Выход эмбрионов в контрольной группе составил 21,7% против 24,4% в первой группе, 22,9% во второй и 18,0% в третьей. Удаление фолликулов свыше 6 мм снижало количество аспирированных фолликулов на 33,7%, повышало выход пригодных клеток на 4,7 п.п. и выход эмбрионов от количества оплодотворенных ооцитов на 3,1 п.п. Удаление доминантного фолликула увеличивало количество аспирированных фолликулов на 40,9% выход жизнеспособных ооцитов на 5,2 п.п., уровень дробления на 7,8 п.п. и выход эмбрионов на 5,0 п.п.

Полученные данные имеют практическую значимость для разработки технологии получения эмбрионов in vitro, использование которой будет способствовать ускорению селекционного процесса и повышению эффективности селекционно-племенной работы в скотоводстве в целом.

## ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени основным и единственным биотехническим методом выведения и совершенствования крупного рогатого скота являлось искусственное осеменение с использованием семени высококлассных быков-производителей. Однако являясь одноплодным животным, корова может принести в течение года, за редким исключением, не более одного теленка. И это несмотря на то, что в фолликулах находящихся на разных стадиях развития содержатся десятки тысяч потенциальных яйцеклеток. За последние несколько десятков лет, достижения в области биологии размножения животных позволили разработать новые нетрадиционные биотехнологические методы их размножения, одним из которых является технология получения эмбрионов в культуре *in vitro* [1, 2, 5]. Разработка системы оплодотворения и обеспечения ранних стадий развития эмбрионов млекопитающих вне организма матери имеет огромное значение в решении ряда научных задач и практических вопросов, направленных на повышение эффективности разведения животных. Создание новых и генетическое совершенствование существующих пород, ускоренное размножения высокопродуктивных особей, борьба с бесплодием, сохранение генетических ресурсов, в том числе редких и исчезающих видов, производство экологически чистых фармацевтических препаратов – это лишь небольшой список проблем, к решению которых имеет самое прямое отношение и технология *in vitro* [5]. За последние три десятка лет эмбриотрансфер стал неотъемлемой частью селекционных программ во всех странах с развитым молочным скотоводством и представляет собой хорошо развитую международную индустрию, в которой ежегодно продаются и покупаются десятки тысяч эмбрионов. Роль и значение трансплантации эмбрионов стала еще более весомой с развитием и широким внедрением в практику племенной работы геномной селекции. На эффективность технологии получения эмбрионов путем

экстракорпорального оплодотворения ооцитов влияет множество как биологических, так и технологических факторов, к одним из которых относится вопрос стимуляции яйчников перед извлечением ооцитов. Вопрос является достаточно дискуссионным и требующим тщательного, всестороннего изучения и анализа [3, 4, 6, 7, 8]. В своих исследованиях мы затронули только одну из сторон данной проблемы – это определение влияния экзогенной стимуляции фолликулогенеза в период предшествующий аспирации на эмбриопродуктивность доноров.

Цель работы: изучить эффективность искусственной регуляции фолликулогенеза на эффективность трансвагинальной аспирации ооцитов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в рамках государственной программы научных исследований «Научные технологии и техника на 2016-2020 годы» (подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии-2020»). Исследования проводили на базе отраслевой биотехнологической лаборатории по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет».

Ооциты получали путем трансвагинальной пункции фолликулов использовали с использованием ультразвуковой системы AlokaSSD 500, включающей в себя ультразвуковой сканер Aloka Prosound 2, ультразвуковой излучатель с частотой 7.5 MHz, вакуумную помпу Craft Suction Unit, держатель ультразвукового излучателя и иглы длиной 55 см и диаметром 18G. В качестве промывной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 50 мкг/мл гентамицина и 0,5% эстральной сыворотки.

Локализацию ооцит-кумулюсных комплексов проводили с помощью фильтровальной системы EmSafe. Поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под лабораторной бинокулярным микроскопом Olympus SZ51 при 16- и 90-

кратным увеличении. Пригодные для созревания ооцит-кумулюсные комплексы помещали в культуральную среду созревания и помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор «Memmert» при температуре 38,7°C с максимальной влажностью 96-98% и уровнем углекислого газа 5%.

Подготовку спермы проводили с использованием градиента плотности Перколл, концентрация которой при оплодотворении составляла 1x10<sup>-6</sup> /мл. Совместная инкубация продолжалась в течение 18-20 часов при температуре 38,7°C, максимальной влажности и в присутствии 5% CO<sub>2</sub> в атмосфере. После завершения инкубации предположительные зиготы отмывались от спермы в среде для культивирования ранних зародышей и помещались в CO<sub>2</sub> инкубатор на 7-9 дней, до получения эмбрионов на предимплантационных стадиях развития. Питательные среды для созревания, капацитации и оплодотворения были приготовлены по нашим методикам на основе реактивов фирмы Sigma. Для стимуляции яичников перед аспирацией использовали фолликулостимулирующие гормональные препараты ФСГ-супер и Плюсет в дозах 12,5 Арм. ед., 25 Арм. ед., 50 Арм. ед. и 250 М.Е., 500 М.Е., 1000 М.Е. или 25, 50 и 100% от стандартной дозы для вызывания суперовуляции, соответственно. Фолликулы удаляли путем аспирации.

Материалы исследований обработаны статистически по стандартным методикам (по П. Ф. Рокицкому (1973) и Н. А. Плохинскому (1969)) на персональном компьютере с использованием пакета программ Microsoft Office Excel.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Как правило, при вызывании множественной овуляции стандартной дозой фолликулостимулирующего гормонального препарата является: при использовании ФСГ-супер 50 Арм. ед. а при использовании Плюсет – 1000 М.Е. Инъекция препарата осуществляется в течение 4 дней через каждые 12 ч. Такой режим обработки стимулирует множественный рост фолликулов и их овуляцию. В случае

стимуляции доноров для последующей аспирации ооцитов нам необходимо подобрать такую дозу гормона, что бы с одной стороны инициировать к росту как можно большее количество фолликулов, а с другой не нарушить течение оогенеза, последующую способность ооцитов к развитию и оплодотворению, а также формированию эмбрионов до предимплантационных стадий в культуре *in vitro*.

В таблице 1 представлены результаты стимуляции доноров, перед аспирацией, гормональными препаратами ФСГ-супер и Плюсет.

Как показывает их анализ данных таблицы 1, количество аспирированных фолликулов на одну аспирацию увеличивалось у стимулированных животных по сравнению контрольной группой на 19,2-39,7%, в то время как выход пригодных для постановки на созревание ооцитов от числа полученных такой закономерностью не отличался. Увеличение данного показателя отмечено только у групп, которые обрабатывались ФСГ-супер в дозе 12,5 и 50 Арм. ед. на 4,1 и 3,4 п.п., соответственно. Уровень дробления также оказался ниже у контрольной группы на 2,2-6,6%. Что касается выхода эмбрионов, то если по абсолютным показателям более высокие значения получены у опытных групп - на 0,2-0,4 эмбриона, то в перерасчете на выход зародышей от числа оплодотворенных ооцитов несколько впереди оказалась контрольная группа – на 2,3-2,6 п.п., или 25,5% против 20,9, 23,2% и 23,2% при использовании 12,5, 25 и 50 Арм. ед., соответственно.

При использовании в качестве стимулирующего агента фолликулостимулирующего гормонального препарата Плюсет, как и в случае с ФСГ-супер, по количеству аспирированных фолликулов разница в пользу опытных групп составила 4,6-68,7%, по выходу пригодных клеток показатели несколько выравнивались и преимущество опытных групп составило только 1,4-7,8 п.п. По количеству дробящихся зародышей контрольная группа превзошла опытные на 1-7-10,0 п.п. Если по выходу эмбрионов в абсолютных зна-

**Таблица 1**  
**Влияние стимуляции доноров, перед аспирацией, гормональными препаратами ФСГ-супер и Плюсег на выход эмбрионов\***

| Группы животных                 | Количество аспираций | Аспирировано фолликулов | Получено ОКК |           | Оплодотворено ОКК | Количество дробящихся зародышей | Выход эмбрионов |          |          |          | всего    |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------|-----------|-------------------|---------------------------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|
|                                 |                      |                         | всего        | пригодных |                   |                                 | день цикла      |          |          |          |          |
|                                 |                      |                         |              |           |                   |                                 | 7               | 8        | 9        | 10       |          |
| Стимуляция препаратом ФСГ-супер |                      |                         |              |           |                   |                                 |                 |          |          |          |          |
| Контрольная                     | 14                   | 7,8±0,87                | 6,1±0,78     | 4,8±0,74  | 4,7±0,77          | 3,1±0,58                        | 0,3±0,12        | 0,5±0,13 | 0,3±0,13 | 0,1±0,07 | 1,2±0,21 |
| 1-я опытная 12,5 Арм. ед.       | 10                   | 9,3±0,45                | 8,1±0,46     | 6,7±0,51  | 6,7±0,51          | 4,7±0,32                        | 0,4±0,16        | 0,7±0,21 | 0,2±0,13 | 0,1±0,10 | 1,4±0,16 |
| 2-я опытная 25 Арм. ед.         | 12                   | 10,9±1,32               | 8,9±1,28     | 6,9±1,00  | 6,9±1,00          | 5,0±0,89                        | 0,1±0,08        | 1,0±0,29 | 0,3±0,14 | 0,2±0,11 | 1,6±0,40 |
| 3-я опытная 50 Арм. ед.         | 10                   | 10,1±0,73               | 8,4±0,65     | 6,9±0,61  | 6,9±0,61          | 4,7±0,53                        | 0,1±0,10        | 0,5±0,21 | 0,6±0,16 | 0,4±0,21 | 1,6±0,29 |
| Стимуляция препаратом Плюсег    |                      |                         |              |           |                   |                                 |                 |          |          |          |          |
| Контрольная                     | 12                   | 6,4±0,34                | 5,1±0,22     | 4,1±0,30  | 2,3±0,53          | 1,7±0,42                        | 0,2±0,11        | 0,2±0,11 | 0,1±0,08 | -        | 0,5±0,15 |
| 1-я опытная 250 М.Е.            | 14                   | 6,7±0,53                | 5,1±0,39     | 4,5±0,41  | 4,5±0,41          | 3,1±0,31                        | 0,2±0,11        | 0,8±0,25 | 0,1±0,09 | -        | 1,1±0,19 |
| 2-я опытная 500 М.Е.            | 14                   | 8,9±0,44                | 7,3±0,47     | 6,1±0,38  | 6,1±0,38          | 3,9±0,48                        | 0,3±0,13        | 0,7±0,19 | 0,4±0,13 | -        | 1,4±0,20 |
| 3-я опытная 1000 М.Е.           | 12                   | 10,8±1,81               | 8,8±1,65     | 7,2±1,53  | 7,2±1,53          | 5,2±1,19                        | 0,2±0,13        | 0,6±0,19 | 0,5±0,19 | -        | 1,3±0,35 |

\*Все показатели приведены из расчета на одну аспирацию

**Таблица 2**  
**Влияние удаления доминантного фолликула, а также фолликулов диаметром свыше 6 мм на выход эмбрионов\***

| Группа животных                         | Количество аспираций | Аспирировано фолликулов | Получено ОКК |           | Оплодотворено ОКК | Количество дробящихся зародышей | Выход эмбрионов |          |          |           |          |
|-----------------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------|-----------|-------------------|---------------------------------|-----------------|----------|----------|-----------|----------|
|                                         |                      |                         | всего        | пригодных |                   |                                 | день цикла      |          |          |           |          |
|                                         |                      |                         |              |           |                   |                                 | 7               | 8        | 9        | 10        |          |
|                                         |                      |                         |              |           |                   |                                 |                 |          |          |           |          |
| Удаление фолликулов диаметром свыше 6мм |                      |                         |              |           |                   |                                 |                 |          |          |           |          |
| Контрольная                             | 28                   | 11,9±1,47               | 10,1±1,27    | 7,5±1,06  | 7,4±1,05          | 4,3±0,75                        | 0,4±0,12        | 0,6±0,16 | 0,3±0,13 | 0,1±0,05  | 1,4±0,24 |
| Опытная                                 | 28                   | 8,9±0,86                | 7,6±0,79     | 6,0±0,69  | 5,9±0,70          | 3,5±0,54                        | 0,3±0,13        | 0,6±0,16 | 0,4±0,15 | 0,04±0,06 | 1,3±0,29 |
| Удаление доминантных фолликулов (ДФ)    |                      |                         |              |           |                   |                                 |                 |          |          |           |          |
| Контрольная                             | 14                   | 6,1±0,42                | 4,8±0,31     | 3,9±0,34  | 3,9±0,34          | 2,6±0,17                        | 0,3±0,12        | 0,4±0,13 | 0,0±0,00 | 0,1±0,07  | 0,8±0,11 |
| Опытная                                 | 12                   | 8,6±0,69                | 5,9±0,77     | 5,1±0,79  | 5,1±0,79          | 3,8±0,62                        | 0,5±0,19        | 0,6±0,18 | 0,1±0,09 | 0,1±0,08  | 1,3±0,27 |

Все показатели приведены из расчета на одну аспирацию

чениях более высокие результаты получены у стимулированных животных, то в перерасчете на количество оплодотворенных ооцитов выход эмбрионов в контрольной группе составил 21,7% против 24,4% в первой группе, 22,6 % во второй и 16,6% в третьей опытной группе. Как видно по мере увеличения дозы гормонального препарата при обработке опытных групп выход эмбрионов снижался.

В таблице 2 представлены результаты исследований по оценке влияния удаления доминантного фолликула, а также фолликулов диаметром свыше 6 мм. Как показывает анализ представленных данных, удаление фолликулов свыше 6 мм снижало количество аспирированных фолликулов на 33,7%, повышало выход пригодных клеток на 4,7 п.п. и выход эмбрионов от количества оплодотворенных ооцитов развившихся до стадии бластоцисты на 3,1 п.п. Удаление доминантного фолликула увеличивало количество аспирированных фолликулов на 40,9%, выход жизнеспособных ооцитов на 5,2 п.п., уровень дробления на 7,8 п.п. и выход эмбрионов на 5,0 п.п.

#### **ВЫВОДЫ**

Таким образом, по результатам исследований установлено что, стимуляция яичников гонадотропными гормональными препаратами ФСГ-супер и Плюсет увеличивала количество аспирированных фолликулов на 19,2-39,7% и 4,6-68,7%, выход пригодных для культивирования ооцитов на 4,1 и 3,4 п.п., 1,4-7,8 п.п., уровень дробления на 2,2-6,6% и 1,7-10,0 п.п., соответственно. Выход эмбрионов от числа оплодотворенных ооцитов при использовании препарата ФСГ-супер увеличивался у контрольной группы на 2,3-2,6 п.п. При использовании препарата Плюсет, по мере увеличения дозы, выход эмбрионов снижался с 24,4% (250 М.Е.) до 16,6% (1000 М.Е.).

Удаление фолликулов свыше 6 мм снижало количество аспирированных фолликулов на 33,7% увеличивало выход жизнеспособных ооцитов на 4,7 п.п., а выход эмбрионов от числа оплодотворенных ооцитов, на 3,1 п.п. Удаление доми-

нантного фолликула увеличивало количество аспирированных фолликулов на 40,9% выход жизнеспособных ооцитов на 5,2 п.п., уровень дробления на 7,8 п.п. и выход эмбрионов на 5,0 п.п.

Полученные данные имеют практическую значимость для разработки технологии получения эмбрионов in vitro, использование которой будет способствовать ускорению селекционного процесса и повышению эффективности селекционной племенной работы в скотоводстве в целом.

**L.V. Golubets - Doctor of Agricultural Sciences Sciences, Ch. scientific. sotr. branch biotechnology lab. on reproduction with farm animals. EI "Grodno State Agrarian University", Grodno, Republic of Belarus «Grodno State Agrarian University»**

#### **ABSTRACT**

The paper presents the results of studies on the effect of exogenous regulation of folliculogenesis on the efficiency of obtaining embryos in culture in vitro. The research was carried out within the framework of the state program of scientific research "Science-intensive technologies and equipment for 2016-2020" (subprogram 1 "Innovative biotechnology-2020"). The research was carried out on the basis of the branch biotechnological laboratory for the reproduction of farm animals of the EE "Grodno State Agrarian University". It was found that the number of aspirated follicles per aspiration increased in stimulated animals compared to the control group by 19.2-39.7%. The number of oocytes suitable for staging for maturation increased only in the groups treated with FSH-super at a dose of 12.5 and 50 Arm units by 4.1 and 3.4 p.p., respectively. The crushing rate was also lower in the control group by 2.2-6.6%. In terms of embryo yield, calculated on the basis of the number of fertilized oocytes, the control group was slightly better - by 2.3-2.6 p.p. or 25.5% vs. 20.9%, 23.2% and 23.2% when using 12.5, 25 and 50 arm units, respectively. When donors were stimulated with the hormonal preparation Pluset, by the number of aspirated follicles, the difference in favor of the experimental groups was 4.6-68.7%, by the yield of suitable cells

the indices were somewhat equalized and the advantage of the experimental groups was only 1.4-7.8 p.p. The control group exceeded the experimental groups by 1-7-10.0 p.p. in the number of crushed embryos. Embryo yield in the control group was 21.7% versus 24.4% in group 1, 22.9% in group 2, and 18.0% in group 3. Removal of follicles greater than 6 mm reduced the number of aspirated follicles by 33.7%, increased the yield of usable cells by 4.7 p.p. and the embryo yield from the number of fertilized oocytes by 3.1 p.p. Removal of the dominant follicle increased the number of aspirated follicles by 40.9% the yield of viable oocytes by 5.2 p.p., the crushing rate by 7.8 p.p. and the embryo yield by 5.0 p.p.

The data obtained are of practical significance for the development of the technology of obtaining embryos in vitro, the use of which will accelerate the breeding process and improve the efficiency of selection and breeding work in cattle breeding in general.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Boni, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis / R. Boni // *Animal Reproduction Science*. – 2012. - Vol. 9. – P. 362-369.
2. Bousquet, D. In vitro production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach / D. Bousquet, H. Twagiramungu, N. Morin, C. Brisson, G.C. Carbonneau, J. Durocher // *Theriogenology*. – 1999. - Vol. 51. – P. 59–70.
3. Chaubal, S.A., Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system / S.A. Chaubal [et al.] // *Theriogenology*. – 2007.- Vol. 67 (4). - P. 719–728.
4. De Roover, R. Effects of ovum pick-up frequency and fsh stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production / R. De Roover [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2008. - Vol. 43 (2). P. 239-245.
5. Gordon, I, Production of embryos in vitro and its impact on livestock production / I. Gordon, K.H. Lu // *Theriogenology*. – 1990. – Vol. 33. – P. 77–87.
6. Hageman, L.J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles / L.J. Hageman // *Theriogenology*. – 1999. – Vol. 51. – P. 449-459.
7. Presicce, G.A. Hormonal stimulation and oocyte maturational competence in prepubertal Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) / G.A. Presicce [et al.] // *Theriogenology*. – 2020. - Vol. 57 (7). -P. 1877–1884.
8. Smith, L.C. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle / L.C. Smith, M. Olivera-Angel, N.P. Groome, B. Bhatia, C.A. Price // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1996. – Vol. 106. – P.193-199. DOI: 10.1530/jrf.0.1060193.