

## Факторы, влияющие на получение биологически полноценных зародышей крупного рогатого скота *in vitro*

И. Б. Кузнецова, В. Е. Кузнецов, С. И. Ковтун

Институт разведения и генетики животных УААН

Ул. Погребняка, 1, с. Чубинское, Бориспольский р-н, Киевская обл., 256319, Украина

*Обсуждается влияние различных факторов на процессы созревания и оплодотворения ооцитов коров *in vitro*, раннее развитие зародышей до стадии бластоцисты вне организма, цитоморфологические и биохимические особенности зародышей, полученных *in vitro* и *in vivo*.*

Со времени получения Брекетом [1] первого теленка после оплодотворения вне организма в этой области исследований достигнут значительный прогресс. Наряду с этим частота получения бластоцист крупного рогатого скота (КРС) *in vitro* находится на невысоком уровне — вследствие пониженной метаболической активности жизнеспособность таких морул-бластоцист после пересадки реципиентам, а также их выживаемость после замораживания ниже, чем у зародышей, полученных *in vivo*. Это ограничивает возможности использования данной методики в воспроизводстве животных и свидетельствует о необходимости ее дальнейшего совершенствования, включая детальное изучение *in vitro* и *in vivo* различных аспектов ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов, капацитации сперматозоидов, взаимодействия гамет в процессе оплодотворения, развития зародышей.

В условиях *in vitro* извлеченные из фолликулов ооциты различных видов животных, в том числе коров, способны к созреванию до стадии метафазы II без добавления в среду гормонов, однако такие ооциты не способны к формированию полноценного мужского пронуклеуса. Созревание ооцитов в присутствии гонадотропинов и стероидов, а также некоторых факторов роста, например, эпидермального фактора роста (EGF) и инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I) способствует последующе-

му оплодотворению ооцитов *in vitro* (IVF — *in vitro* fertilization) и их развитию до стадии бластоцисты [2].

Культивирование ооцитов вне организма, в отличие от их созревания *in vivo*, может приводить к более быстрому созреванию ядра по сравнению с цитоплазмой, что делает ооциты мало пригодными для оплодотворения в результате недоразвития цитоплазмы яйцеклетки, созревшей до метафазы II, либо перезревания ядерного материала вследствие продолжительного культивирования ооцита (в последнем случае возрастает частота хромосомных нарушений). Большую роль в приобретении ооцитами компетенции к оплодотворению *in vitro* у КРС играют окружающие их фолликулярные клетки, особенно клетки кумулюса [3]. Хотя показано, что добавка большого количества клеток гранулезы ( $25 \cdot 10^6$  кл/мл) в среду созревания может ингибировать возобновление мейоза в ооцитах коров *in vitro* при условии их непосредственного контакта [2], наличие в среде культивирования ооцит-кумуляных комплексов (ОКК) дополнительного количества свежеполученных клеток гранулезы ( $(3-5) \cdot 10^6$  кл/мл) является очень важным для полноценного созревания ооцитов коров [4]. И именно вследствие сокультивирования незрелых ооцитов коров с клетками гранулезы стало возможным получение вне организма достаточно большого (до 40 % от числа осемененных ооцитов) количества бластоцист КРС [5]. Сокультивирование с клетками гранулезы, извлеченными из неатретических

фолликулов, способствует цитоплазматическому созреванию ооцитов, следствием чего является повышение частоты формирования мужского пронуклеуса [6] и увеличение способности к последующему развитию *in vitro* [7]. Положительное влияние клеток гранулезы на созревание ооцитов коров, вероятно, связано с тем, что они способны продуцировать эстрадиол-17 $\beta$  и прогестерон в присутствии инсулина и ФСГ [8]. В случае необходимости созревания ооцитов в малых группах (от 1 до 5), например, после прижизненного трансвагинального извлечения у коров-доноров под контролем ультразвука (OPU — ovum pick-up) совместное культивирование ооцитов с клетками гранулезы значительно улучшает их последующее развитие до морулы-бластоцисты ([9], собствен. исследования). Нами показано, что наличие в среде созревания дополнительного количества клеток гранулезы компенсирует также обусловленную механическими повреждениями потерю ооцитами части клеток кумулюса.

В среды для созревания ооцитов обычно добавляют 10—20 % инактивированной нагреванием фетальной сыворотки телянка (FCS) или эструсной сыворотки крови коров, полученной в период охоты при выраженном рефлексе неподвижности. Значение сыворотки полностью не выяснено, однако известно, что важную роль в поддержании роста и питания клеток играют находящиеся в ней белки, аминокислоты, предшественники нуклеиновых кислот и витамины [10]. Эструсная сыворотка содержит высокие концентрации эстрадиола-17 $\beta$  и ЛГ, поэтому в случае ее применения становится необязательным использование добавок гонадотропинов и/или эстрогенов [11]. В наших исследованиях использование эструсной сыворотки крови коров не увеличивало количества ооцитов, созревших *in vitro* до метафазы II, по сравнению с FCS, но значительно повышало частоту дробления и развития до стадии бластоцисты после IVF.

Различия между ооцитами, способными и неспособными к развитию, проявляются на 4—5-й день после оплодотворения (т. е. на стадии морулы-бластоцисты). Этот долгий период подтверждает гипотезу Сирарда и Блондина [5] о том, что способные к развитию ооциты должны содержать какой-то важный фактор — белковый или в форме стабильной мРНК. За последние 10 лет при широком спектре условий созревания не было достигнуто значительного улучшения в частоте развития ооцитов, поэтому логично предположить, что имеет место скорее специфическая аккумуляция мРНК, чем посттрансляционные изменения. Таким образом, можно заключить, что компетенция ооцитов к развитию приобретает до начала ядерной конденса-

ции, которая отмечается через несколько часов после аспирации из фолликула или пика ЛГ. В настоящее время подтверждения этой гипотезы сводятся к следующему: 1) при использовании ооцитов, полученных аспирацией через 42 ч после введения простагландина, т. е. в пределах пика ЛГ, было получено 67 % развития до стадии бластоцисты после IVF [12]; 2) использование ооцитов из яичников, находившихся в теплом изотоническом растворе в течение 4 ч до извлечения ооцитов, приводило в некоторых опытах до 100 % развития *in vitro* до стадии морулы-бластоцисты [13].

Значительное повышение эффективности оплодотворения *in vitro* было достигнуто при использовании гепарина для капацитации сперматозоидов быка [14]. По-видимому, это связано с тем, что данный метод капацитации сперматозоидов быка является наиболее близким к условиям *in vivo* — установлено, что активным капацитирующим фактором жидкости яйцеводов коров является гепариноподобный гликозаминогликан (ГАГ) [15, 16].

Удаление семенной плазмы, белки которой стабилизируют мембраны сперматозоидов и тем самым ингибируют акросомную реакцию, из эякулята быка до замораживания значительно повышает частоту оплодотворения вне организма, а использование эпидидимальных сперматозоидов быка, которые из-за отсутствия контакта с семенной плазмой легче капацитируются *in vitro*, позволяет получать более стабильные результаты, чем использование эякулированных сперматозоидов ([17], собствен. исследования).

Для поддержания достаточной подвижности сперматозоидов, повышения их способности к пенетрации яйцеклеток и частоты формирования пронуклеусов в среды для оплодотворения добавляют пеницилламин, гипотаурин и эпинефрин (PHE), что существенно уменьшает период от начала осеменения до пенетрации ооцитов. Возможно также, что наличие в среде оплодотворения PHE и эпителиальных клеток яйцеводов коров может оказывать антиоксидантное действие и нивелировать повреждающее влияние атмосферного кислорода на раннее эмбриональное развитие, связанное с формированием свободных радикалов O<sub>2</sub>, ускоряющих процессы пероксидации липидов и активации ферментов, что в свою очередь приводит к повреждению мембран сперматозоидов и потере их подвижности [18]. Добавление в среду оплодотворения ооцитов коров кластеров эпителиальных клеток яйцеводов, проявляющих реснитчатую активность после культивирования вне организма в течение не менее 24 ч, значительно повышало частоту развития зигот до четырехклеточной стадии через 24 ч

после IVF (собствен. исследования), что свидетельствует о повышении жизнеспособности полученных зародышей и их большей потенции к развитию до стадии бластоцисты ([19], собствен. исследования).

Многочисленные эксперименты показали, что культивирование зародышей КРС *in vitro*, как правило, приводит к остановке дробления на 8—16-клеточной стадии развития, на которой у этого вида животных осуществляется переход от материнского к эмбриональному контролю развития (активация генома зародыша) [20]. Для преодоления зародышами блока дробления в культуре необходимо наличие в среде культивирования биологически активных (эмбриотрофных) факторов [21]. Последние включают в себя специфические и неспецифические факторы, такие как факторы роста, цитокинины (вещества, способствующие делению клеток), антиоксиданты и хелатирующие соединения. Они могут секретироваться соматическими клетками или самими доимплантационными зародышами и действовать как пара-аутокринные факторы [22]. Выработка зародышами аутокринных эмбриотрофных факторов объясняет повышение их жизнеспособности при культивировании в группах, так как в яйцевом зародыши фактически развиваются в микрообъеме жидкости. К аутокринным факторам зародышей относятся такие факторы роста, как трансформирующий фактор роста, инсулиноподобный фактор роста II, эпидермальный фактор роста [23].

Для получения бластоцист КРС *in vitro* используют две системы культивирования — сокультивирование с соматическими клетками (или кондиционированная с этими клетками среда) и среды с известным или почти полностью известным составом. Сокультивирование и использование кондиционированных сред обеспечивают поступление в среду факторов роста и/или цитокининов и ослабляет или устраняет действие ингибирующих развитие компонентов, таких как глюкоза или кислород [24]. Наблюдаются значительные различия в частоте развития и характеристиках зародышей, полученных в этих системах.

Одними из первых систем сокультивирования, с использованием которых впервые получены бластоцисты КРС вне организма, были клетки кумулюса или гранулезы и эпителиальные клетки яйцеводов коров [11, 25]. Показано, что вырабатываемые этими клетками вещества, например, тканевый ингибитор металлопротеиназ способствуют развитию зародышей вне организма [26].

Хотя можно успешно замораживать клетки эпителия яйцеводов (при этом они сохраняют свои свойства по поддержанию развития зародышей

КРС вне организма [27]), их использование ограничено, поскольку работа по получению первичной культуры долговременна и трудоемка, а также связана с доступностью боннского материала. Кроме того, полученные культуры отличаются по качеству и по способности поддерживать развитие зародышей. В связи с этим выгодным является использование уже устоявшихся коммерческих клеточных линий, имеющих постоянные характеристики, при котором легко контролируется любая контаминация [26, 20].

В настоящее время наиболее часто используются линии таких клеток, как Vero (клетки почек зеленой марышки) и BRL (клетки печени крысы), способные поддерживать развитие зародышей даже после 10 пассажей и более, что дает возможность стандартизации условий культивирования [28]. Однако в наших исследованиях уже после 5—6-го пассажа клеток Vero и BRL наблюдалось значительное снижение количества полученных бластоцист КРС и частоты их вылупления, что могло быть следствием используемого способа замораживания и/или произведенного до него количества пассажей.

Показано, что клетки BRL продуцируют большое количество факторов роста, среди них инсулиноподобный фактор роста II (IGF-II), трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), фактор ингибирования лейкемии (LIF) и фактор стволовых клеток (SCF), также известный как *c-kit* лиганд [20]; эти же факторы роста обнаружены в половых путях самок, а их добавление в культуральные среды с известным составом значительно повышает способность зародышей к развитию [23, 28]. Это, вероятно, объясняется тем, что во время развития в зародышах млекопитающих экспрессируются зависимые от стадии развития рецепторы для специфических факторов роста и их лигандов [29]. Кроме того, показано, что культивирование зародышей КРС на монослое клеток BRL приводит к повышению их криорезистентности именно вследствие секреции этими клетками противолейкемийного фактора.

Однако известно, что растущие популяции клеток погребляют питательные вещества энергичнее, чем зародыши, их рост приводит к более быстрому закислению сред, особенно в конце периода культивирования, когда плотность их становится очень высокой. Помимо этого, замечено, что клетки BRL и Vero имеют тенденцию к нарастанию на зародыши во время сокультивирования, что ингибирует развитие до стадии бластоцисты. Поэтому предпочтительным является использование особых клеточных линий BRL, клетки которых

прекращают рост при контакте [7], либо клеток Vero с инактивированной пролиферацией, что достигается обработкой митомицином С и приводит к получению монослоя, имеющего известную, неизменную плотность клеток в течение всего периода культивирования [26].

Соматические клетки, используемые для культивирования, могут вырабатывать неизвестные факторы, способствующие росту зародышей, и/или удалять токсичные вещества (такие как ионы аммония — продукты метаболизма аминокислот) из основной среды, что затрудняет уточнение требований для культивирования и развития зародышей и препятствует ясному пониманию их метаболизма и развития независимо от других типов клеток [30]. Использование кондиционированных сред имеет такие преимущества, как устранение дополнительного количества клеток и продуктов их метаболизма, возможность их исследования на наличие эмбриотрофных факторов, замораживания и использования одной партии среды длительное время [31].

Для культивирования зародышей КРС наиболее часто используют среды 199 и Менезо Б2. Это сложные среды с большим количеством компонентов — витаминов, аминокислот, солей, нуклеотидов и т. п., что отражает потребности скорее соматических клеток, чем зародышей.

Показано, что зародыши лучше развиваются в простых средах, чем в сложных. поэтому при использовании систем сокультивирования важно, чтобы эти среды содержали соответствующие добавки, поддерживающие жизнеспособность соматических клеток [22].

Получение нормального потомства после пересадки бластоцист КРС, полученных *in vitro* в простых солевых растворах (например, в среде SOF — синтетической жидкости яйцеводов или CR1 [32]) с добавлением энергетических субстратов и источника белка, свидетельствует о том, что требования для развития зародышей *in vitro* уже практически выяснены. Однако даже так называемая среда с известным химическим составом может включать неучтенные вещества, например, вследствие «загрязнения» буфера HEPES значительным количеством ацетата или из-за наличия в относительно чистом альбумине, лишенном жирных кислот, незначительных количеств различных факторов роста. Разработка качественных с точки зрения последующего фетального и постнатального развития сред с точно известным химическим составом обеспечивает должную повторяемость получения бластоцист КРС вне организма и коммерческое использование этой методики [22].

В состав сред для культивирования ранних

зародышей КРС должны входить энергетические компоненты (пируват, лактат, глюкоза) и источники белка. Обмен веществ зародышей на различных стадиях развития имеет свои особенности. Так, на ранних стадиях дробления в качестве энергетического субстрата лучше использовать пируват, а на околокомпактизационных стадиях наблюдается значительное увеличение потребления зародышами глюкозы, ингибирующей развитие зародышей КРС на ранних стадиях даже в отсутствие экзогенного фосфата (в отличие от зародышей хомячка и мыши). Считают, что именно высокая концентрация глюкозы (5,56 мМ) в среде культивирования зародышей, соответствующая ее концентрации в плазме крови, а не в жидкости яйцеводов коров (0,05—0,2 мМ), может быть одним из основных факторов, вызывающих блок на 8—16-клеточной стадии у зародышей КРС, культивирующихся вне организма [30].

Ким и др. [33] показали, что пируват и лактат поддерживают развитие зародышей КРС *in vitro* до 8-клеточной стадии, а пируват необходим также для развития до стадии морулы; при этом соотношение лактат : пируват менее важно, чем общая концентрация лактата и пирувата, в отличие от зародышей мыши, для которых оптимальным является соотношение данных компонентов 1 : 20 [32]. Наличие аминокислот в средах культивирования зародышей КРС способствует повышению частоты развития до стадии формирования бластоциста и приводит к значительному увеличению количества клеток в бластоцистах [23, 30].

В качестве источника белка для доимплантационных зародышей обычно используют сыворотку (чаще всего FCS) и бычий сывороточный альбумин (BCA). Сыворотка содержит гормоны, факторы роста, витамины, хелатирующие соединения (связывающие ионы тяжелых металлов), пептиды, белки [29]. BCA может содержать пептиды, энергетические субстраты и факторы роста и положительно влияет на развитие зародышей вследствие высокой способности к связыванию лигандов, что выражается в защитном эффекте против токсичных компонентов среды и усилении положительного действия других компонентов [30]. Однако некоторые партии выпускаемого BCA могут ингибировать развитие зародышей и его иногда заменяют синтетическими макромолекулами — поливиниловым спиртом (PVA) или поливинилпирролидоном (PVP) [29].

Показано, что наличие сыворотки в средах культивирования зародышей КРС угнетает начальные деления дробления и стимулирует компактизацию морулы и формирование бластоцист для ооци-

тов коров, созревших и оплодотворенных *in vitro* [34]. Однако, хотя сыворотка ускоряет развитие при ее внесении в начале компактизации и способствует повышению частоты формирования бластоцист, результатом ее добавления являются бластоцисты худшего качества с увеличенным диаметром и уменьшенным количеством клеток [24, 35,]; бластоцисты, полученные в бессывороточной среде, имеют лучшую морфологию, более обычные размеры и форму, чем бластоцисты, культивируемые в присутствии сыворотки ([31, собствен. исследования]).

Наличие в среде сыворотки может негативно влиять на морфологию, метаболизм, ультраструктуру и развитие доимплантационных зародышей КРС. У зародышей, культивируемых в присутствии сыворотки, в цитоплазме выявлено повышенное количество липидных гранул по сравнению с бластоцистами, полученными в бессывороточной среде и *in vivo*. Предполагается, что они содержат большое количество триглицеридов, происходящих из сыворотки. Ультраструктурные исследования выявили дегенеративные изменения в митохондриях зародышей, культивировавшихся с сывороткой, что может влиять на их метаболические способности; исключение сыворотки из культуральных сред позволяет избежать дегенерации митохондриальной ДНК [24]. Влияние сыворотки на метаболизм зародыша заключается в возрастании выработки лактата, что негативно сказывается на жизнеспособности. Кроме того, добавление сыворотки не позволяет стандартизировать условия культивирования [28]. Существует предположение, что именно включение сыворотки в состав сред для созревания ооцитов и развития зародышей является причиной аномально большого веса полученных телят [36].

Коммерческое применение метода IVF ограничивается тем, что после пересадки полученных вне организма бластоцист наблюдается более высокая частота абортот и трудных отелов, удлиняется продолжительность стельности. Кроме того, показано, что полученные телята менее жизнеспособны, несмотря на их более высокий вес, у них наблюдаются такие аномалии, как сердечные нарушения, проблемы с конечностями и суставами, внутренние органы большого размера, дисплазия мозжечка, что является показателем несбалансированного развития, произошедшего девятью месяцами ранее [36, 37].

В настоящее время культивирование зародышей *in vitro* является недостаточно эффективным — только 20—30 % тщательно отобранных ооцитов достигают стадии бластоцисты. Показана худшая выживаемость после трансплантации бла-

стоцист, полученных *in vitro* (около 40 %) по сравнению с зародышами, полученными *in vivo* (50—60 %), а также более низкая устойчивость к замораживанию и оттаиванию. Это свидетельствует об их худшей жизнеспособности, хотя некоторый прогресс в эффективности криоконсервирования IVF-зародышей наметился в связи с использованием методики витрификации [38]. Показано, что повышенная чувствительность полученных *in vitro* бластоцист к температуре ниже 14 °С связана с их более низкой плавучей плотностью. Изменение белкового и/или липидного состава зародышей, определяющего плотность, может привести к повышению их криоустойчивости. Уже показано, что микрохирургическое удаление липидных гранул перед замораживанием повышает выживаемость бластоцист КРС. Использование для развития бластоцист промежуточных реципиентов повышает их устойчивость к замораживанию, тогда как наличие в культуральных средах сыворотки снижает ее вследствие увеличения содержания липидов [24].

Полученные в культуре бластоцисты КРС имеют пониженное количество клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) (и по количеству клеток ВКМ, и по соотношению ВКМ : ТЭ (трофобластодерма)). Хотя сами по себе условия в культуре обязательно приводят к снижению митотической активности, большинство культуральных систем отрицательно сказывается на частоте клеточных делений. На развитие бластоцист в культуре могут влиять и хромосомные нарушения. Наиболее часто встречающимся хромосомным нарушением у зародышей, полученных *in vitro* (15 против 7—10 % для зародышей, полученных *in vivo*), является триплоидия, которая может объясняться высоким уровнем наличия диплоидных ооцитов (около 11 %) после созревания в культуре [24].

При культивировании зародышей часто наблюдаются такие нарушения, как некроз, фрагментация, остановка развития, редукция контактов между клетками ВКМ и ТЭ и возрастание вакуолизации цитоплазмы. Степень компактизации морул, полученных *in vitro*, особенно культивировавшихся в средах с сывороткой, также отличается от морул, полученных *in vivo* [24].

Биохимические исследования показали, что скорость продукции АТФ сходна для зародышей, полученных *in vivo* и *in vitro*. Поскольку последние имеют меньшее количество клеток ( $97 \pm 7$  против  $117 \pm 10$ ), то у них продуцируется больше АТФ в расчете на один бластомер. Утилизация пирувата и глюкозы также сравнима для зародышей обоих видов, однако при тех же различиях на клеточном уровне. Потребление аминокислот примерно на

30 % больше для бластоцист КРС, полученных *in vivo*, чем для полученных *in vitro*, что может объясняться различиями в кинетике их транспорта и/или утилизации. Синтез и содержание белков примерно одинаковы в зародышах обоих видов до компактизации, на посткомпактизационных стадиях развития наблюдаются различия по этим показателям, определяемые по плавучей плотности и потреблению аминокислот [24].

Хотя значительное возрастание синтеза РНК отмечается только во время 4-го клеточного цикла, известно, что транскрипция происходит и раньше. Таким образом, на нее также могут влиять условия культивирования. Показаны различия в экспрессии некоторых генов (например, гена коннексина, *Cx43*, участвующего в формировании щелевых контактов) для бластоцист, полученных *in vivo* и *in vitro*. Описанные выше различия в морфологии, такие как ограниченная компактизация в присутствии сыворотки, могут быть обусловлены изменениями экспрессии генов во время развития. Этим же могут объясняться повышенный вес и размер телят, наблюдающиеся после культивирования зародышей вне организма и таких манипуляций, как пересадка ядер и изменение материнского окружения в матке (использование промежуточных реципиентов). Показано, что экспрессия генов некоторых факторов роста изменяется у зародышей, полученных после пересадки ядер, по сравнению с зародышами, полученными *in vivo* и *in vitro*. Обнаружена связь между крупноплодностью и изменениями в геномном импринтинге и характере метилирования ДНК. Для мышей выявлено, что аномалии в развитии плодов наблюдаются вследствие субоптимальных условий культивирования зародышей [24].

Одной из особенностей исследований на КРС является то, что зародыши подвергаются манипуляциям до того, как начинается транскрипция эмбрионального генома. Вполне возможно, что манипуляции влияют на транскрипцию одного или большего количества генов, связанных с ранним эмбриональным развитием. Известно, что кратковременное культивирование зигот мышей до 2-клеточной стадии может сказываться на экспрессии определенных генов. Более длительный период культивирования, видимо, оказывает значительное влияние на функцию генов, особенно у таких видов, как овцы и КРС, у которых транскрипция не начинается до 8—16-клеточной стадии [37].

Манипуляции с зародышами могут приводить к фенотипическим изменениям также вследствие их влияния на импринтинг генов, необходимых для эмбрионального и фетального развития. Идентифи-

цировано ограниченное число генов, подвергающихся импринтингу, некоторые из них участвуют в развитии плода, например, гены инсулиноподобного фактора роста II и его рецептора. У мышей материнская хромосома продуцирует транскрипт для рецептора, а отцовская — транскрипт для лиганда. Оба гена экспрессируются в доимплантационном зародыше независимо от их родительского происхождения, однако моноаллельная экспрессия зависит от метилирования ДНК. Нарушение регуляции генов такого типа из-за влияния внешних условий может приводить к аномалиям эмбрионального и плодного развития [24].

Следует отметить, что одним из преимуществ получения бластоцист КРС *in vitro* может также стать разработка методов селекции зародышей по полу до их трансплантации реципиентам. Так, было показано, что соотношение полов у 7—8-дневных зародышей КРС, полученных *in vitro*, зависело от их стадии развития — среди быстрее развивающихся зародышей большинство были мужскими (до 100 % для полностью экспандированных бластоцист), на 8-й день количество мужских зародышей составляло 20 % [39]; причиной более быстрого развития мужских зародышей может быть более высокий метаболизм глюкозы [40].

Однако преимущественное развитие мужских зародышей во время использования материнской мРНК не является атрибутом системы культивирования вне организма, так как их более быстрое развитие наблюдается также *in vivo* у мышей и КРС [40]. Было показано, что среди вымытых у коров-доноров зародышей более продвинутых стадий соотношение полов на 15 % сдвинуто в сторону самцов, а для зародышей менее продвинутых стадий — в сторону самок, однако у коров-доноров этот эффект маскируется неодновременной овуляцией яйцеклеток при суперовуляции [39]. При этом мужские зародыши менее способны к имплантации и частота их ранней эмбриональной смертности также выше, что свидетельствует о том, что для получения беременности нужно большее количество мужских зародышей, чем женских [40].

Различную скорость роста зародышей в зависимости от пола может объяснить то, что во время раннего эмбрионального развития активными являются обе X-хромосомы, одна из них становится неактивной на стадии бластоцисты. Следовательно (по крайней мере у мышей), экспрессия генов X-хромосомы, кодирующих, например, гипоксантин-фосфорибозилтрансферазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, т. е. ферменты, в присутствии глюкозы способствующие понижению внутриклеточной концентрации радикалов кислорода, при-

мерно в 2 раза выше у самок, чем у самцов, до времени активации эмбрионального генома и инактивации X-хромосомы [41].

В практическом отношении можно направлено влиять на соотношение полов у зародышей КРС, полученных вне организма. Например, если осеменение ооцитов, созревших *in vitro*, проводить через 8 ч после выделения первого полярного тела, то соотношение полов у полученных бластоцист сдвигается в сторону самцов (около 70 %), а если сразу после выделения первого полярного тела — в сторону самок (60—67 %). Этот феномен может быть объяснен наличием в X- и Y-несущих сперматозоидах каких-то связанных с половой хромосомой веществ (белков), которые могут влиять на время и успех развития зародышей, и приобретением ооцитами способности к их использованию [40].

Таким образом, системы культивирования *in vitro* позволяют получать жизнеспособные зародыши КРС, пересадка которых реципиентам приводит к получению потомства. Вместе с тем следует отметить, что хотя по многим биохимическим показателям бластоцисты, полученные вне организма, сравнимы с полученными от коров-доноров, однако на клеточном и субклеточном уровнях, а также в частоте развития после пересадки существуют значительные различия между этими двумя источниками зародышей. Для уменьшения этих различий необходимо дальнейшее изучение потребностей ооцитов и зародышей для их полноценного развития.

І. Б. Кузнецова, В. Є. Кузнецов, С. І. Ковтун

Фактори, що впливають на отримання біологічно повноцінних зародків великої рогатої худоби *in vitro*

Резюме

Обговорюється вплив різних факторів на процеси дозрівання і запліднення ооцитів корів *in vitro*, ранній розвиток зародків до стадії бластоцисти поза організмом, цитоморфологічні і біохімічні особливості зародків, отриманих *in vitro* та *in vivo*.

I. B. Kuznetsova, V. E. Kuznetsov, S. I. Kovtun

Factors affecting the viability of the bovine embryos produced *in vitro*

Summary

It is discussed the effects of different factors on the *in vitro* maturation and fertilization of cow oocytes, early embryonic development to the blastocyst stage and morphological and biochemical similarities and differences between embryos produced *in vitro* or *in vivo*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brackett B. G., Bousquet D., Boice M. L. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow // Biol. Reprod.—1982.—27.—P. 147—158.
2. Hinrichs K. Manipulation of oocyte maturation *in vitro* // Arch. Tierz. Dummerstorf.—1996.—39, Special Issue.—P. 43—50.
3. Goto K., Kajihara Y., Kosaka S. et al. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes // J. Reprod. Fertil.—1988.—83, N 2.—P. 753—758.
4. Galli C., Lazzari G. Large scale production of bovine embryos // Proc. Eur. Conf. Embryo Techn. and Genet. Engin. in Cattle and Sheep.—Krakow. 1994.—P. 111—116.
5. Sirard M. A., Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle // Anim. Reprod. Sci.—1996.—42.—P. 417—426.
6. Konishi M., Aoyagi Y., Takedomi T. et al. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVN-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration // Theriogenology.—1996.—45.—P. 573—581.
7. Inzen W. G., Stekelenburg-Hamers A. E. P., Weima S. M. et al. Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using Buffalo rat liver (BRL) cells // Theriogenology.—1995.—43.—P. 723.
8. Saumande J. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.—1991.—38, N 2.—P. 189—196.
9. O'Doherty E. M., Wade M. G., Hill J. L., Boland M. P. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts // Theriogenology.—1997.—48.—P. 161—169.
10. Адамс Р. Методи культури кліток для біохіміків.—М.: Мир, 1983.—258 с.
11. Gordon I. *In vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle ova // Embryo Transfer Newsletter.—1990.—8.—P. 6—11.
12. Menard D. P., Lamothe P., Smith L. C. Aspiration transvaginale d'ovocytes chez les bovins: mise au point et evaluation d'une technique // Med. Vet. Quebec.—1995.—25.—P. 92.
13. Blondin P., Guilbault L. A., Sirard M. A. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation // Theriogenology.—1995.—43.—P. 168.
14. Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., First N. L. Effect of heparin and chondroitin sulphate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro* // Ibid.—1985.—24.—P. 537—549.
15. Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., Handrow R. R. et al. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid // Biol. Reprod.—1989.—40.—P. 1020—1025.
16. Gordon I. Large-scale production of cattle embryos by *in vitro* culture methods // Agr. Biotech. News and Inform.—1989.—1, N 3.—P. 345—348.
17. Katska L., Smorag Z. Bull effect on *in vitro* embryo production in cattle // J. Physiol. Pharmacol.—1996.—47, N 2.—P. 71—78.
18. Miller G. F., Gliedt D. W., Rakes J. M., Rorie R. W. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate // Theriogenology.—1994.—41.—P. 689—696.
19. Lee E. S., Fujii Y., Fukui Y. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization // Theriogenology.—1996.—45.—P. 1151—1162.
20. Reed W. A., Suh T., Bunch T. D., White K. L. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, Buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium // Theriogenology.—1996.—45.—P. 439—449.

21. Thibodeaux J. K., Del Vecchio R. P., Hansel W. Role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos // J. Reprod. Fertil.—1993.—98, N 1.—P. 61—66.
22. Donnay I., Langendonck A., Auquier P. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos // Theriogenology.—1997.—47.—P. 1549—1561.
23. Gandolfi F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst // Theriogenology.—1994.—41.—P. 95—100.
24. Thompson J. G. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants // Reprod. Fertil. Dev.—1997.—9.—P. 341—354.
25. Berg U., Brem G. *In vitro* production of bovine blastocysts by *in vitro* maturation and fertilization of oocytes and subsequent *in vitro* culture // Zuchthygiene.—1989.—24, N 3.—P. 134—139.
26. Carnegie J. A., Durnford R., Algire J., Morgan J. Evaluation of mitomycin-treated Vero cells as a co-culture system for IVM/IVF-derived bovine embryos // Theriogenology.—1997.—48.—P. 377—389.
27. Katska L., Rynska B., Smorag Z. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes // Theriogenology.—1995.—43.—P. 859—870.
28. Katska L. Hodowla zarodkow ssakow *in vitro* // Med. Wet.—1996.—11.—P. 6.
29. Keskinetepe L., Brackett B. G. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media // Biol. Reprod.—1996.—55.—P. 333—339.
30. Takahashi Y., First N. L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins // Theriogenology.—1992.—37.—P. 963—978.
31. Mermillod P., Vansteenbrugge A., Wils C. et al. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos // Biol. Reprod.—1993.—49.—P. 582—587.
32. Rosenkrans C. F., Zeng C. Q., Mcnamara G. T. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates // Biol. Reprod.—1993.—49.—P. 459—462.
33. Kim J. H., Funahashi H., Niwa K., Okuda K. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium // Theriogenology.—1993.—39, N 4.—P. 875—886.
34. Lim J. M., Okitsu O., Okuda K., Niwa K. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* // Theriogenology.—1994.—41.—P. 1091—1098.
35. Shamsuddin M., Larsson B., Gustafsson H., Rodriguez-Martinez H. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability // Theriogenology.—P. 1033—1043.
36. Kruip T. A. M., Daas J. H. G. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring // Theriogenology.—1997.—47, N 1.—P. 43—52.
37. Walker S. K., Hartwich K. M., Seamark R. F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges // Theriogenology.—1996.—45.—P. 111—120.
38. Massip A., Mermillod P., Dinnyes A. Morphology and biochemistry of *in vitro*-produced bovine embryos: implications for their cryopreservation // Hum. Reprod. (Oxf.).—1995.—10.—P. 3004—3011.
39. Avery B., Madison V., Greve T. Sex and development in bovine *in vitro* fertilized embryos // Theriogenology.—1991.—35, N 5.—P. 953—963.
40. Dominko T., First N. L. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos // Theriogenology.—1997.—47.—P. 1041—1050.
41. Bredbacka K., Bredbacka P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro* // J. Reprod. Fertil.—1996.—106.—P. 169—172.

УДК 576.37:591.3:636.2

Поступила в редакцию 02.06.98