

УДК 636.2:612.64.089.67

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ООЦИТОВ МЕТОДОМ ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ АСПИРАЦИИ У КОРОВ-ДОНОРОВ

В.К. Пестис¹, Л.В. Голубец¹, А.С. Дешко¹, М.П. Старовойтова¹, Стецкевич Е.К.¹, И.С. Кысса², Ю.А. Якубец², М.В. Попов³

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

² – СООО «Бел-Симекс»,
г. Минск, Республика Беларусь

³ – Учебно-практический центр биотехнологий ОАО «Почапово»,
г. Пинск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 21.08.2014 г.)

Аннотация. Впервые в Республике Беларусь начаты исследования по разработке метода получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов, открывающие новые перспективы и расширяющие возможности технологии *in vitro* в рамках ускоренного создания и качественного обновления племенных стад. Применение метода трансвагинальной аспирации ооцитов у коров-доноров повышает эффективность использования технологии трансплантации эмбрионов путем увеличения выхода эмбриопродукции на одного донора в 3,4 раза (64,8 против 19,3), в связи с этим снижается стоимость получаемого высокоценного приплода. Так, стоимость теленка, полученного от пересадки эмбриона (ТАО), в опытной группе была ниже, чем в контрольной (*in vivo*) на 1111 тыс. руб.

Summary. For the first time in republic Belarus there are begun researches on working out of a method of reception of embryos of a horned cattle *in vitro* in system трансвагинальной аспирации ооцитов, discovering new prospects and dilating possibilities of technology *in vitro* within the limits of the accelerated building and qualitative

innovation of breeding herds. Method application трансвагинальной аспирации ооцитов at cows-donors raises efficacy of use of technology of transplantation of embryos by gain in yield эмбрионпродукции on one donor in 3,4 times (64,8 against 19,3), and in this connection depreciation received высокоценного an issue. So, cost of the calf received from transplantation of an embryo (OPU) in skilled bunch was more low, than in control (in vivo) on 1111 thousand BLR.

Введение. Современное сельскохозяйственное производство базируется на использовании высокоэффективных технологий производства молока и мяса, обеспечивающих получение прибыли. В связи с этим необходимо ускоренное создание новых пород, линий, семейств высокопродуктивного скота с качествами, удовлетворяющими требованиям конъюнктуры рынка. Проблемы обеспечения молоком и молочными продуктами должны решаться, прежде всего, путем повышения молочной продуктивности коров [1, 2, 8].

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 [2, 6, 10].

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 [3, 7, 11].

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 интенсивность 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 [4, 9].

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

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

Все более широкое распространение в практике животноводства наряду с трансплантацией получает 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 созревать до стадии оплодотворения (метафаза 2) вне организма [1-11].

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, и 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 впоследствии 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 [3, 5, 10].

Цель работы – определить эффективность получения ооцитов методом трансвагинальной аспирации (ТАО) у коров-доноров.

Материал и методы исследований. Исследования по получению ооцитов методом трансвагинальной аспирации (ТАО) у коров-доноров проводились на базе биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных УО “Гродненский государственный аграрный университет”, а также в учебно-практическом центре биотехнологий ОАО «Почапово» Пинского района Брестской области в 2010-2014 гг.

В качестве доноров ооцит-кумулусных комплексов (ОКК) использовалось 18 постоянных (выбраванных) коров-доноров живой массой 650-800 кг в возрасте от 4 до 8 лет с удоом по наивысшей лактации 10-12,5 тыс. кг молока жирностью 3,8% и более.

Пункция фолликулов проводилась с использованием ультразвуковой системы AlokaSSD 500, включающей в себя ультразвуковой сканер AlokaProsound 2, ультразвуковой излучатель с частотой 7.5 MHz, вакуумную помпу Craft suction unit, держатель ультразвукового излучателя, иглы длиной 55 см и диаметром 18G. Скорость аспирации фолликулярной жидкости составляла 25мл/мин. В качестве промывной жидкости использовали фосфатно солевой буфер Дюльбекко с добавлением 100 ед/мл гентамицина и 1% BSA. Локализацию ооцит-кумулусных комплексов проводили с помощью эмбрионального фильтра «EMCON», поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под микроскопом «Olympus» при 16 и 90-кратном увеличении, соответственно. Дозревание ооцитов, капацитация спермы, оплодотворение и культивирование ранних зародышей проходило по ранее разработанным нами методикам с некоторыми модификациями. В качестве основной среды созревания использовалась TCM-199 с добавлением 10 мкг/мл ФСГ, 5 мкг/мл эстрадиола и 5 мкг/мл LH, а также 5% эстральной сыворотки. Капацитацию спермы проводили в среде SpermTalp, оплодотворение в среде FertTalp. Совместное инкубирование продолжалось в течение 18-20 часов. Культивирование ранних зародышей проходило на монослое клеток кумулюса в течение 7-9 дней.

Качество ооцит-кумулусных комплексов оценивалось по 4-балльной шкале. При этом основным критерием являлось наличие кумулюса и его качество. Ооциты отличного качества имели более трех слоев кумулюса, хорошего – 2-3 слоя, удовлетворительного – 1 слой кумулюса или его фрагменты на отдельных участках зоны пеллюцида. Неудовлетворительные ооциты – это ооциты без кумулюса.

Биометрическую обработку полученного цифрового материала проводили согласно общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты исследований и их обсуждение. Исследования по оценке эффективности получения ОКК в культуре *in vitro* в зависимости от функционального состояния яичников показали, что по уровню дробления значительно более высокие результаты получены при использовании ооцитов из яичников первых 3-х групп (на фолликулярной и лютеиновой фазе полового цикла, а также с желтым телом беременности). Использование яичников с персистентным желтым телом, с кистой и с гипофункцией резко снижало уровень дробления. Так, если средний уровень дробления при использовании яичников первых трех групп составлял 58,1%, то последних 3-х всего лишь 33%, т. е. на 25,1% меньше.

Установлено, что наиболее эффективным оказалось использование яичников в фолликулярной фазе.

В результате исследования эффективности ТАО у стельных коров было выяснено, что наибольшее количество фолликулов было получено у коров на 1-2 месяце стельности – 21,9 на яичник. У нестельных коров и коров на 2-3 месяце стельности этот показатель оказался ниже – 17,5 и 17,9 на яичник.

Установлено, что незрелые ооциты с многослойным, плотно прилегающим кумулосом хорошо культивируются. Ооциты с многослойным кумулосом отмечены у коров со сроком стельности 1-2 мес. и 2-3 мес. и диаметром 6-10 мм – 54% и 50%; практически такой же показатель у коров на 1-2 мес. стельности с диаметром 3-6 мм составляет 45,5%. Плотный кумулос у коров на 1-2 мес. стельности в среднем составил 46,8%, на 2-3 мес. – 60,8%. Наибольший процент цельных ооцитов у коров на 1-2мес. стельности прослеживается с диаметром (3-6 мм; 6-10 мм) и составляет в среднем 46%, на 2-3мес. с диаметром (до 3 мм; 3-6 мм; 6-10 мм) – 55%.

Незрелые ооциты с рыхлым, отслаивающимся кумулосом или освобожденные от него для культивирования малопригодны. Больше всего ооцитов без кумулоса отмечено у коров на 2-3мес. стельности с диаметром до 3 мм, что составляет 40,4%. Меньше всего указанных ооцитов у коров на 1-2 мес. и 2-3 мес. стельности с диаметром 3-6 мм – по 7%. Рыхлый кумулос у коров на 1-2 мес. стельности с диаметром (3-6 мм; 6-10 мм) в среднем составил 54,5%, в диаметре до 3 мм ниже – 38%. Количество ооцитов с фрагментированным кумулосом у коров на 1-2 мес. стельности с диаметром до 3мм составляет 61%, с диаметром (3-6 мм; 6-10 мм) – в среднем 54%. У коров на 2-3мес. стельности с диаметром фолликулов (до 3 мм; 3-6 мм; 6-10 мм) – 45%.

Анализ данных показывает, что ооциты с темной ооплазмой преобладают над ооцитами со светлой ооплазмой независимо от диаметра фол-

ликулов. Темная ооплазма ооцитов у коров на 1-2 мес. в среднем составляет 75%, на 2-3 мес. – 82,5%. Светлая ооплазма ооцитов у коров на 1-2 мес. в среднем составляет 25%, на 2-3 мес. – 45,1%. Ооциты с ооплазмой ооцитов, равномерно заполняющей зону пеллюцида, также преобладают над ооцитами с фрагментарной ооплазмой.

Ооплазма равномерно заполняет зону пеллюцида ооцитов у коров на 1-2 мес. в среднем составляет 73,5%, на 2-3 мес. – 80%. Фрагментированная ооплазма ооцитов у коров на 1-2 мес. в среднем составляет 26,5%, на 2-3 мес. – 26%.

Важным показателем, характеризующим эффективность исследований, является экономическая эффективность, которая определяет не только общую результативность проводимых исследований, но и целесообразность дальнейшего использования предлагаемых разработок в практической работе.

Эффективность получения ооцитов методом трансвагинальной аспирации у коров-доноров приведена в таблице.

При этом учитывались такие показатели, как затраты, используемые в одном цикле обработки коровы-донора, себестоимость эмбрионов, полученных методом ТАО, общие затраты на результативную эмбриоперсадку у реципиентов и стоимость получения теленка-трансплантанта.

Таблица – Экономическая эффективность получения ооцитов методом трансвагинальной аспирации у коров-доноров

Показатели	Ед. изм.	ГРУППЫ	
		Контроль (in vivo)	Опыт (ТАО in vitro)
1	2	3	4
Использовано коров-доноров	n	10	10
Реагировало полновулящей	n-%	8-80	-
Положительных доноров по извлечению эмбрионов / ооцитов	n-%	8-80	10-100
Кратность получения эмбрионов / ооцитов в год	n	4	24
Количество эмбрионов / ооцитов на процедуру (вымывание / аспирация)	n	4,8	12
Выход эмбрионов in vitro на одну процедуру	n-%	-	2,7-30
Всего получено пригодных для пересадки эмбрионов (в год)	n	154	648

Продолжение таблицы

1	2	3	4
Выход пригодных для пересадки эмбрионов на 1 донора (в год)	n	19,3	64,8
Себестоимость одного эмбриона	тыс. руб.	1210	530
Общие затраты на 1 эмбриоперсадку	тыс. руб.	73,3	73,3
Произведено пересадок эмбрионами	n	21	21
Итого затрат на пересадку	тыс. руб.	26949	12670

Получено телят	n	10	8
Приживляемость свежеполученных эмбрионов	%	47	38
Стоимость 1-й результативной пересадки	тыс. руб.	2695	1584
Затраты на содержание стельного реципиента	тыс. руб.	2870	2870
Стоимость теленка от пересадки свежеполученного эмбриона	тыс. руб.	5565	4454

Анализ данных таблицы свидетельствует о том, что применение метода трансвагинальной аспирации ооцитов повышает эффективность использования технологии трансплантации путем увеличения выхода эмбриопродукции на одного донора в 3,4 раза (64,8 против 19,3), в связи с этим снижается стоимость получаемого высокоценного приплода. Так, стоимость теленка, полученного от пересадки эмбриона (ТАО) в опытной группе была ниже, чем в контрольной (*in vivo*) на 1111 тыс. руб.

Заключение. Применение метода трансвагинальной аспирации ооцитов повышает эффективность использования технологии трансплантации эмбрионов путем увеличения выхода эмбриопродукции на одного донора в 3,4 раза (64,8 против 19,3), в связи с этим снижается стоимость получаемого высокоценного приплода. Так, стоимость теленка, полученного от пересадки эмбриона (ТАО), в опытной группе была ниже, чем в контрольной (*in vivo*) на 1111 тыс. руб.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганджа, А.И. Возможность использования репродуктивного потенциала выбракованных коров в технологии *in vitro* / А.И. Ганджа, Л.Л. Леткевич, Е.Д. Ракович, И.В.Костикова, О.В. Гришина // ВНАНБ. – 2008. – №2. – 82-89 с.
2. Кузьмина, Т.И. Перспективы использования донорских яйцеклеток коров в новейших технологиях репродукции / Т.И. Кузьмина // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: материалы между-нар. науч. конф. – Дубровицы, 2002. – 52-57 с.
3. Bols, P. Gebruik van de transvaginale Ovum Pick-Up (OPU) techniek: geboorte van de eerste OPU kalveren in België. (Use of transvaginal oocyte pick-up: first OPU calves born in Belgium) / P. Bols, A. Soom Van, A. de Kruijff // Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. – 1996. – Vol. 65. – 86-91 p.
4. Boni, R. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows submitted to repeated follicular puncture / R. Boni [et al.] // Theriogenology. – 1997. – Vol. 48. – 277-289 p.
5. De Ruigh, L. The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield / L. De Ruigh, E. Mullaart, A.M. van Wagendonck-de Leeuw // Theriogenology. – 2000. – Vol. 53. – 349 p.
6. Inai, K. Effect of the frequency of ovum pick-up intervals on follicle number, oocyte recovery and embryo production rates in cattle / K. Inai [et al.] // Theriogenology. – 2000. – Vol. 53. – 359 p.
7. Paul, J.B. Gonadotropin stimulation of cattle donors at estrus for transvaginal oocyte collection // J.B. Paul [et al.] // Theriogenology. – 1995. – Vol. 43. – 294 p.
8. Pieterse, M.C. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes / M.C. Pieterse [et al.] // Theriogenology. – 1991. – Vol. 35. – 19-24 p.

9. Pieterse, M.C. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows / M.C. Pieterse [et al.] // *Theriogenology*. – 1992. – Vol. 37. – 273 p.
10. Van Soom, A. Improved results in IVF-treatment of sterility patients by careful selection of bulls and by stimulation of cows with FSH before slaughter / A. Van Soom, P.E.J. Bols, A. de Kruif // *Reprod. Dom. Anim.* – 1995. – Suppl. 3. – 67 p.
11. Ward, F.A. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology / F.A. Ward [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 54. – 433-446 p.