

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В СИСТЕМЕ IN VITRO

**А. С. Дешко¹, Л. В. Голубец¹, А. А. Сехин¹, И. С. Кысса¹,
Ю. А. Якубец¹, М. В. Попов², В. Ю. Бабенков³, Н. И. Хромов³**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28
e-mail: ggaubio@mail.ru)

² – Учебно-практический центр биотехнологий ОАО «Почапово»
Пинский р-н, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 225737, Пинский р-н, д. Почапово, ул. Зелёная, 1
e-mail: oaopochapovo@mail.ru)

³ – ООО «Бетагран Липецк»
г. Липецк, Российская Федерация
(Российская Федерация, Липецкая область, Добринский район
ст. Пластица, e-mail: betagran48@yandex.ru)

***Ключевые слова:** крупный рогатый скот, ооцит, in vitro, трансвагинальная аспирация ооцитов.*

***Аннотация.** В работе представлены результаты изучения влияния некоторых факторов на эффективность получения ооцитов крупного рогатого скота в системе in vitro. Установлено, что по мере увеличения количества аспираций прослеживается четкая тенденция увеличения выхода не только общего количества ооцитов, но и ооцитов, пригодных для дальнейшего культивирования. При этом на одну аспирацию получено 4,5 ооцит-кумулясных комплексов. Выход жизнеспособных ооцит-кумулясных комплексов на одну аспирацию составил 4,5.*

EFFICIENCY OF OOCYTE RETRIEVAL IN CATTLE IN VITRO

**A. S. Deshko¹, L. V. Golubets¹, A. A. Sehin¹, I. S. Kyssa¹,
Yu. A. Yakubets¹, M. V. Popov², V. Yu. Babenkov³, N. I. Hromov³**

¹ – EI «Grodno State Agrarian University» Grodno, Belarus
(Republic of Belarus, 230008, Grodno, street Tereshkova, 28
e-mail: ggaubio@mail.ru)

² – Educational and practical center of biotechnology «Pochapovo»
Pinsk, Belarus
(Republic of Belarus, 225737, Pinsk, Pochapovo, street Green, 1
e-mail: oaopochapovo@mail.ru)

³ – «Betagan Lipetsk»

Lipetsk, Russian Federation
(Russian Federation, Lipetsk oblast, Dobrinskiy rayon, Plavica
e-mail: betagran48@yandex.ru)

Key words: *cattle, oocyte, in vitro, transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval.*

Summary. *The results of studying the influence of some factors on the efficiency of the ovum pick up are represented in the article. It is established that increasing the number of aspirations there is a clear trend of increasing output not only the total number of oocytes, but oocytes suitable for further cultivation. In General, one aspiration, received 4,5 of the oocyte–Cumulus complexes. The release of a viable oocyte–Cumulus complexes one aspiration amounted to 4.5.*

(Поступила в редакцию 02.06.2017 г.)

Введение. На первых этапах развития и становления технологии экстракорпорального оплодотворения основным источником ооцитов являлись яичники, полученные после убоя животного на мясокомбинате, что уже само по себе являлось сдерживающим фактором широкого внедрения данной технологии в практику животноводства, поскольку, с одной стороны, ооциты у донора можно было получить только один раз – после его убоя и то в ограниченном количестве. С другой стороны, ооциты, находящиеся в яичниках *in vivo*, вовлекаются в фолликулярную волну роста и имеют большую компетенцию к дальнейшему развитию по сравнению с ооцитами, полученными из яичников после убоя животного, что очень важно для получения эмбрионов в достаточном количестве и соответствующего качества. Только получение ооцитов у живого животного могло решить эту проблему. Разработка и использование оборудования для прижизненной пункции фолликулов у животных открыло новые перспективы технологии *in vitro*, появилась возможность получения ооцитов у одних и тех же животных на протяжении длительного времени, предоставилась возможность получения ооцитов из фолликулов физиологически активных яичников [2, 5].

Впервые трансвагинальная аспирация ооцитов у крупного рогатого скота была проведена Callesen et.al. в 1987 г. [6]. У 7 суперовулировавших телок было аспирировано 38 фолликулов и получено 16 ооцитов.

Рядом исследователей [4, 8] было установлено, что многократные пункции фолликулов у одних и тех же животных не наносят какого-либо ущерба здоровью животного и его репродуктивной активности. Ими было проведено 36 операций у 10 коров. После пункции 197 фолликулов получено 54 ооцита (27,4%) или по 1,5 ооцита на животное. Ими же были проведены исследования по изучению влияния частоты аспираций на половой цикл животных. В первом опыте аспирации

проводили еженедельно в течение 3 и 6 месяцев, во втором – в начале, в середине и конце полового цикла в течение 3 месяцев. Указанный выше режим использования доноров не оказал отрицательного влияния на проявление и течение у них полового цикла.

Pieterse M. [12] был проведен тщательный мониторинг телок после ТАО за два периода в течение 4-5 недель, по результатам которого было установлено, что повторные ТАО приводили к некоторой ацикличности животных, однако уже к концу первого периода телки восстановили свою обычную цикличность а послеубойное исследование (по окончании второго периода) показало только некоторое утяжеление яичников. Следовательно, ТАО не оказывает особого влияния на яичниковые структуры и их функциональную активность.

Переход от одноразовой к двухразовой аспирации в неделю ассоциировался со значительным увеличением эффективности ТАО. Дальнейшее изучение и сравнение этих двух подходов к получению ОКК подтвердило, что двукратная аспирация достоверно повышала, по сравнению с однократной, не только выход ооцитов, но и количество жизнеспособных эмбрионов. Многие авторы сходятся во мнении [5, 8] о том, что 2-кратная в неделю аспирация стимулирует и синхронизирует не только новую волну роста фолликулов, но и повышает эмбриопродуктивность ооцитов. Объяснение этому видят в том, что при такой схеме постоянно удаляется доминантный фолликул, что стимулирует к росту дополнительный пул малых фолликулов, хотя другие исследователи и не согласны с этим и утверждают, что более частые аспирации характеризуются снижением как количества аспирированных фолликулов, так и количества полученных ооцитов, поэтому отдают предпочтение аспирации с интервалом в 7 дней [10, 17].

Одну из важнейших ролей, обуславливающих количество и качество получаемых ооцит-кумулосных комплексов, играют диаметр иглы и величина вакуума [1, 3, 6]. Величина вакуума на кончике иглы во многом зависит от ее диаметра конструкции помпы, длины и диаметра соединительных шлангов. Как показали результаты исследований, уровень извлекаемости был более высоким при большом диаметре иглы (18 g) и высоком вакууме, однако процент интактных клеток (75%) в среднем был выше при более низком вакууме (36 мл/мин). С увеличением вакуума количество интактных ооцитов снижалось на фоне увеличения «голых» ооцитов. Это было подтверждено в дальнейшем и исследованиями Ward et.al. [16] Влияние же самой процедуры аспирации на ее эффективность была дополнительно оценена путем аспирации *in vitro* ранее полученных ОКК. «Извлекаемость» составила 80%, т. е. примерно каждый пятый ооцит терялся в системе трубок и игл.

Кроме этого, около 10-20% клеток получали микроповреждения кумулюса в процессе аспирации.

Актуальным является вопрос гормональной стимуляции яичников перед аспирацией. Аспирацию можно и нужно проводить и без стимуляции, поскольку антральные фолликулы присутствуют в яичниках в любой конкретный момент времени, однако Lonergan P et.al. и Paul G. et.al, V. Soom A. et.al, [9, 11, 15] отметили положительное влияние ФСГ на количество фолликулов, особенно диаметром свыше 6 мм и выход blastocyst. В то же время Paul G. et.al [11] указал на то, что положительное влияние ФСГ зависит от фазы полового цикла. Stubings [14], в свою очередь, не отметил различий ни по количеству фолликулов, ни по выходу ооцитов между донорами без стимуляции при аспирации два раза в неделю и стимулированными донорами с одной аспирацией в неделю. В то же время Ruigh L. [13] отмечает, что при стимуляции ТАО можно проводить только один раз в две недели, в то время как без стимуляции два раза в неделю и хотя стимуляция дает намного более высокий результат в перерасчете на сессию, общее количество эмбрионов в перерасчете на месяц оказывается выше при двухкратной аспирации в неделю у нестимулированных доноров.

ТАО может быть использовано при получении эмбрионов у доноров с нарушенной воспроизводительной функцией и у тех, которые не дают эмбрионы при трансплантации. Так, Hasler J. [7] провел аспирацию у 155 доноров голштинской породы, которых не смогли плодотворно осеменить, в результате на каждую аспирацию было получено по 4,1 жизнеспособному ооциту, проведено 2268 эмбриопересадок, получено 1220 стельностей (53,8%).

Цель работы: установление эффективности получения ооцитов крупного рогатого скота в системе *in vitro*.

Материал и методика исследований. Для решения поставленных задач в 2016 г. на базе биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет», учебно-практическом центре биотехнологий ОАО «Почапово» Пинского района Брестской области и ООО «Бетагрн Липецк» Российской Федерации была проведена серия опытов.

В качестве доноров ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) использовали коровы-доноры живой массой 700-800 кг в возрасте от 4 до 8 лет с удоем по наивысшей лактации 10-12,5 тыс. кг молока жирностью 3,8% и более в лютеиновую и фолликулярную фазы полового цикла.

Пункция фолликулов проводилась с использованием ультразвуковой системы Aloka SSD 500, включающей ультразвуковой сканер

Aloka Prosound 2, ультразвуковой излучатель с частотой 7,5 МГц, вакуумную помпу Craft suction unit, держатель ультразвукового излучателя, иглы длиной 55 см и диаметром 17G (1.473 мм), 18 G (1.27 мм) и 20G (0.91 мм). Величина вакуума составляла 70, 80, 90, и 100 mmHg. В качестве промывной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 100 ед./мл гентамицина и 1% BSA. Локализацию ооцит-кумулюсных 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 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 ч. Культивирование ранних зародышей проходило на монослое клеток кумулюса в течение 7-9 дней. Качество ооцит-кумулюсных комплексов оценивалось по 4-балльной шкале. При этом основным критерием являлось наличие кумулюса и его качество. Ооциты отличного качества имели более 3 слоев кумулюса, хорошего – 2-3 слоя, удовлетворительного – 1 слой кумулюса или его фрагменты на отдельных участках зоны пеллюцида. Неудовлетворительные ооциты – это ооциты без кумулюса.

Полученные результаты исследований были обработаны биометрически с использованием компьютерной программы M. Excel. В работе приняты следующие обозначения уровня P: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Результаты исследований и их обсуждение. Получение эмбрионов *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов свидетельствует о том, что более высокий выход ооцитов отмечается при использовании иглы диаметром 18 и 17G (1,3 и 1,5 мм) – 91,9 и 90,2%, что выше по сравнению с использованием игл диаметром 20G (0,9 мм) на 12,2 и 10,5 п. п., соответственно (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние диаметра иглы на эффективность аспирации ооцитов

Показатели	Диаметр иглы, мм (G)		
	0,91 (20)	1,27 (18)	1,47 (17)
1	2	3	4
Количество аспираций	25	27	26
Аспирировано фолликулов	125	124	126

Продолжение таблицы 1

1		2	3	4
Получено ооцитов, n-%		79-63,2	86-69,3	82-65,1
в т. ч. отличных, n-%		14-17,7	20-23,2	24-29,3
хороших, n-%		21-26,6	27-31,4	32-39,0
удовлетворительных, n-%		28-35,4	32-37,2	18-21,9
Итого	пригодных, n-%	63-79,7	79-91,9	74-90,2
	непригодных, n-%	16-20,2	7-8,1	8-9,8

Аналогичная картина наблюдалась и по выходу ооцитов отличного и хорошего качества. Превышение составило 5,5-11,6 и 4,8-12,4 п. п., соответственно. Данные результаты говорят о том, что больший диаметр иглы в меньшей степени повреждает кумулюсные клетки, окружающие ооцит.

Таблица 2 – Влияние величины вакуума на выход и качество ооцитов

Показатели	Величина вакуума, mmHg (мм.р.ст.)			
	70	80	90	100
Количество аспираций	19	18	20	21
Аспирировано фолликулов	88	94	89	104
Получено ооцитов, n-%	48-54,5	57-60,6	64-71,9	78-75,0
в т. ч. отличных, n-%	12-25,0	16-28,1	15-23,4	15-19,2
хороших, n-%	16-33,3	20-35,1	19-29,7	25-32,0
удовлетворительных, n-%	14-29,2	13-22,8	23-35,9	28-35,9
Итого	пригодных, n-%	42-87,5	49-86,0	57-89,1
	непригодных, n-%	6-12,5	8-14,0	7-10,9

Анализ результатов, представленных в таблице 2, характеризующих влияние величины вакуума на количество и качество получаемых ооцит-кумулясных комплексов, говорит о том, что если по общему выходу пригодных для культивирования ооцитов различий практически не было, то выход клеток отличного качества снижался с 28,1% при вакууме 80 mmHg до 19,2 при вакууме 100 mmHg, в то время как уровень ооцитов удовлетворительного качества увеличивался с 28,8% (80 mmHg) до 35,9% (100 mmHg). Количество ооцитов хорошего качества оставалось на примерно одинаковом уровне с небольшими колебаниями.

В таблице 3 представлены результаты опытов по изучению влияния кратности аспираций на эффективность получения ооцитов.

Как видно из анализа представленных в таблице данных, количество аспираций не оказало негативного влияния на количество и качество получаемых ооцит-кумулясных комплексов.

При изучении связи кратности аспираций на эффективность получения ооцитов установлено, что с каждым последующим использованием растет и количество фолликулов, пригодных для аспирации.

Таблица 3 – Влияние количества и кратности аспираций на эффективность получения ооцитов

Показатели	Порядковый номер аспирации				
	1	2	3	4	5
	n=18	n=17	n=16	n=9	n=4
Аспирировано фолликулов всего, n	46	70	58	54	28
в т.ч. на донора	2,6±0,37	4,1±0,61	3,6±0,71	4,9±1,63	7,0±3,03
Получено ОКК всего, n	28	51	42	40	28
в т.ч. на донора	1,6±0,36	2,9±0,59	2,6±0,56	4,4±1,44	7,0±2,84
Получено пригодных ОКК всего, n	24	42	34	31	18
в т.ч. на донора	1,3±0,37	2,4±0,51	2,1±0,45	3,4±1,11	4,5±1,22
из них:					
отличных	0,2±0,10	1,0±0,41	0,8±0,24	1,2±0,15	1,2±0,41
хороших	0,9±0,37	0,9±0,31	0,9±0,28	1,7±1,25	1,2±0,97
удовлетворительных	0,2±0,13	0,5±0,19	0,4±0,21	0,5±0,24	2,0±1,38
не пригодных	0,2±0,1	0,5±0,21	0,5±0,18	1,0±0,44	2,4±0,50

Так, при первом использовании на одного донора приходилось 2,6 фолликула, пригодных для аспирации, когда уже к пятой аспирации их количество выросло до 7,0. При этом на одну аспирацию получено 1,6 при первой процедуре и 7,0 ОКК при пятой аспирации. Возрос и выход пригодных ОКК, который составил в целом на одну аспирацию 4,5 ОКК при пятой аспирации, что на 3,2 ОКК выше по сравнению с первой процедурой.

Закключение. По мере увеличения количества аспираций прослеживается четкая тенденция увеличения выхода не только общего количества ооцитов, но и ооцитов, пригодных для дальнейшего культивирования. При этом в целом на одну аспирацию получено 4,5 ооцит-кумуляусных комплексов. Выход жизнеспособных ооцит-кумуляусных комплексов составил в целом на одну аспирацию 4,5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пестис, В. К. Получение ооцитов коров путем трансвагинальной пункции фолликулов / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко, М. В. Попов // Доклады НАН Беларуси. 2016. Т. 60, № 1. – С. 123-128.
2. Голубец, Л. В. Эффективность получения эмбрионов крупного рогатого скота в системе трансвагинальной аспирации ооцитов / Л. В. Голубец, А. С. Дешко, М. В. Попов, Е. К. Стецкевич, М. П. Старовойтова // Современные технологии сельскохозяйственного производства: сборник научных статей по материалам XVII Междунар. науч.-практ. конф. – Грод-но: ГГАУ, 2014. – С. 161-163.
3. Bols, P. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes / P. Bols [et al.] // Theriogenology. – 1996. – Vol. 45. – P. 1001-1014.
4. Boni, R. Ovum Pick-Up and embryo production in vitro: an established procedure in cattle / R. Boni [et al.] // In: Proceedings of the VIII Congress. European Embryo Transfer Association / AETE. - France. Lyon, 1992. - P. 128.

5. 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. – P. 277-289.
6. Callesen, H. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes / H. Callesen, T. Greve, F. Christensen // *Theriogenology*. – 1987. Vol. 27. – P. 217.
7. Hasler, J.F. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results / J.F. Hasler [et al.] // *Theriogenology*. – 1995. Vol. 43. – P. 141-152.
8. Imai, K. Effect of the frequency of ovum pick-up intervals on follicle number, oocyte recovery and embryo production rates in cattle / K. Imai [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53. – P. 359.
9. Lonergan P. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro / P. Lonergan [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 1994. – Vol. 37. – P. 48-53
10. Palasz A., et al. The effect of volume of culture medium and embryo density on vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*, 1998, Vol.49. №1,- p.212.
11. Paul, J.B. Gonadotropin stimulation of cattle donors at estrus for transvaginal oocyte collection // J.B. Paul [et al.] // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – P. 294
12. Pieterse, M.C. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes / M.C. Pieterse [et al.] // *Theriogenology*. – 1991. – Vol. 35. – P. 19-24.
13. Ruigh, L. The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield / L. De Ruigh, E. Mullaart, AM. van Wagtenonk-de Leeuw // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53. – P. 349.
14. Stubbings, R.B. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows / R.B. Stubbings, J.S. Walton // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – P. 705-712.
15. 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. – P. 67.
16. 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. – P. 433-446.
17. Ward, F., Effect of group size and oocyte to medium volume post – fertilization on the development of bovine embryos in vitro / F. Ward, B. Enright // *Theriogenology*. – 2000. - Vol. 53. – P. 306-311.