

УДК 636.2:612.64.089.67

ВЛИЯНИЕ КРАТНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРОВ-ДОНОРОВ НА ВЫХОД ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ

В. К. Пестис¹, Л. В. Голубец¹, А. С. Дешко¹, И. С. Кысса¹,
Д. В. Машталер², В. И. Белевич¹, Ю. В. Андалюкевич¹

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail:
ggau@ggau.by);

² – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
племенного дела»

п. Лесные Поляны, Московская область, Российская Федерация

(Российская Федерация, 141212, Московская область, Пушкинский

район, поселок Лесные Поляны, ул. Ленина, стр. 13; e-mail:

vniiplem@mail.ru)

Ключевые слова: крупный рогатый скот, донор, ооцит, *in vitro*, трансвагинальная аспирация ооцитов (ТАО), фолликул, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), воспроизводство животных, трансплантация эмбрионов.

Аннотация. В работе представлены результаты впервые проведенных в Республике Беларусь исследований по изучению биологических факторов прямого и опосредованного влияния на эффективность получения ооцитов в системе трансвагинальной аспирации. По результатам исследований не установлено достоверных различий по влиянию количества аспираций на выход ооцитов. Наибольшее количество ооцитов отличного и хорошего качества было отмечено у группы животных, аспирация у которых проводилась раз в неделю, и составило 24,1%. Уровень извлекаемости ооцитов с частотой извлечения каждые 7 дней снижался по сравнению с частотой извлечения в 3 дня на 10,0 п. п. Вместе с тем выход ооцитов отличного и хорошего качества увеличивался незначительно (на 4,5 п. п., как и выход пригодных клеток в целом – на 2,9 п. п.) и находился в пределах погрешности. По количеству извлеченных ооцитов 78% животных показали более высокий результат через 7 дней. У доноров с количеством аспираций от 20 до 30 выход жизнеспособных клеток увеличился до 84,4%. Полученные данные имеют практическую значимость для разработки технологии получения эмбрионов *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов, использование которой будет способствовать ускорению селекционного процесса и повышению эффективности селекционно-племенной работы в скотоводстве в целом.

THE INFLUENCE OF THE MULTIPLICITY OF USE OF DONOR-COWS TO THE EXIT OF THE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES

V. K. Pestis¹, L. V. Golubets¹, A. S. Deshko¹, I. S. Kyssa¹,
D. V. Mashtaler², V. I. Belevich¹, Yu. V. Andalyukevich¹

¹ – EI «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus

(Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail:

ggau@ggau.by);

² – FSBSI «All-Russian scientific-research Institute of breeding»

village Lesnye Polyany, Moscow region, Russian Federation

(Russian Federation, 141212, Moscow region, Pushkin district, village

Lesnye Polyany, p. 13 Lenin st.; e-mail: vniplem@mail.ru)

Key words: *cattle, donor, oocyte, in vitro, transvaginal oocyte aspiration (TOA), follicle, in vitro fertilization (IVF), animal reproduction, embryo transplantation.*

Summary. *This paper presents the results of studies conducted in the Republic of Belarus for the first time on the influence of biological factors of direct and indirect influence on the efficiency of obtaining oocytes in the system of transvaginal aspiration. According to the results of studies, there were no significant differences in the effect of the number of aspiration on the oocyte yield. The greatest number of oocytes of excellent and good quality was observed in a group of animals whose aspiration was carried out once a week and amounted to 24,1%. The level of extractability of oocytes with the frequency of extraction every 7 days decreased compared with the frequency of extraction in 3 days by 10,0 p. p. at the Same time, the yield of oocytes of excellent and good quality increased slightly (by 4.5 p. p. as well as the yield of suitable cells in General – by 2,9 p. p.) and was within the error. By the number of extracted oocytes 78% of animals showed higher results after 7 days. In donors with the number of aspiration from 20 to 30, the yield of viable cells increased to 84,4%. The data obtained are of practical importance for development of technology for in vitro embryo production in the system of transvaginal aspiration of oocytes which will help to accelerate breeding process and increase efficiency of breeding work in livestock production in general.*

(Поступила в редакцию 03.06.2019 г.)

Введение. Технология получения эмбрионов в культуре in vitro с последующей их пересадкой реципиентам занимает в настоящее время все более прочное положение в практике разведения и селекции крупного рогатого скота наравне с трансплантацией эмбрионов. Однако, несмотря на достаточно обширные исследования по данной теме, многие вопросы по-прежнему остаются актуальными для изучения. Так, например, на ячниках коров в каждый конкретный период времени присутствует различное количество фолликулов разного диаметра. В

связи с чем возникает вопрос о влиянии количества фолликулов на яичнике и их диаметра на эффективность созревания и оплодотворения полученных из них ооцитов [1, 3-4].

Трансвагинальная пункция фолликулов под ультразвуковым контролем, получившая свое начало в 1988 г., успешно обошла стороной негативные моменты, присущие технологии трансплантации, а также получению ооцитов из яичников после убоя животного, и заняла прочное место в системе получения эмбрионов в культуре *in vitro* и ее коммерческом использовании в селекции и разведении крупного рогатого скота [1].

Эффективность аспирации ооцитов во многом зависит от количества и качества антральных фолликулов, находящихся в яичнике и доступных для пункции. В связи с волнообразным характером роста и развития фолликулов у крупного рогатого скота их размер и численность популяции на протяжении полового цикла значительно колеблется. Овуляция или удаление доминантного фолликула стимулирует к росту новую фолликулярную волну. Каким образом пункция фолликулов и аспирация ооцитов влияет на фолликулогенез, количество и качество получаемых ооцит-кумулясных комплексов, как часто и какое количество аспираций можно проводить? Эти и другие вопросы по-прежнему остаются открытыми и требующими к себе пристального внимания. В связи с чем актуальность работ по этому вопросу не вызывает сомнения [2, 5-6].

Технология *in vitro* не только расширила рамки использования животных с выдающимися селекционными признаками, но и способна в ближайшем будущем стать если не альтернативой, то сильным конкурентом обычной трансплантации эмбрионов, в отличие от которой может успешно использоваться независимо от физиологического и репродуктивного статуса донора. Например, ооциты могут извлекаться до двух раз в неделю независимо от стадии полового цикла, их можно получать у стельных (до 3-х мес) животных, животных с патологиями репродуктивного тракта (за исключением яичников), а также у животных, не отвечающих реакцией суперовуляции на гормональную обработку. Для получения ооцитов нет необходимости в гормональной стимуляции множественного роста фолликулов и в перерасчете на месячную эмбриопродуктивность давать большее количество зародышей по сравнению с трансплантацией эмбрионов [7-9].

Получение компетентных к развитию ооцитов является одним из критических факторов, обуславливающих успех метода. На начальных этапах основным источником ооцитов были яичники, полученные после убоя животного на мясокомбинате, что уже само по себе являлось

сдерживающим фактором широкого внедрения данной технологии в производство, поскольку ооциты у донора можно было получить только один раз после его убоя [10-12].

Таким образом, прижизненная пункция фолликулов у животных открыла новые перспективы в технологии *in vitro*, поскольку, с одной стороны, предоставила возможность получения ооцитов у одних и тех же животных на протяжении длительного времени, а со второй стороны, появилась возможность получения ооцитов вовлеченных в половой цикл и в фолликулярную волну роста, а значит имеющих большую компетенцию к качественному росту и развитию. Существуют ли какие-либо пределы по количеству аспираций у одного и того же животного и как количество аспираций влияет на эффективность пункции фолликулов?

Цель работы – изучить влияние кратности использования коров-доноров на выход ооцит-кумулюсных комплексов и определить оптимальный режим использования доноров.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в рамках двух государственных программ научных исследований: «Биотехнология» (подпрограмма «Развитие биологической науки, биологического образования и биологической промышленности на 2007-2011 год и на период до 2020 года»), «Наукоемкие технологии и техника на 2016-2020 годы» (подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии-2020»). Исследования по изучению влияния кратности использования коров-доноров на выход ооцит-кумулюсных комплексов проводили на базе биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных Гродненского государственного аграрного университета, а также в учебно-практическом центре биотехнологий ОАО «Почапово» Пинского района Брестской области в 2013-2018 гг.

В качестве доноров ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) использовали коров-доноров живой массой 650-800 кг в возрасте 4-8 лет с удоем по наивысшей лактации 10-13,5 тыс. кг молока жирностью 3,8% и более.

Пункцию фолликулов проводили с использованием ультразвуковой системы Aloka SSD 500, включающей в себя 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). В качестве промывной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 100 ед./мл гентамицина и 5% 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. Качество ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) оценивали 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 [13].

Аспирацию проводили в такой последовательности: один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю после недельного перерыва, два раза в неделю после недельного перерыва, а также через 3 и 7 дней.

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. Одним из преимуществ трансвагинальной аспирации ооцитов, обусловленное наличием в яичниках в каждый конкретный момент времени популяции антральных фолликулов, является повторяемость процедуры. Возможность многократного извлечения ооцитов у одного и того же животного.

В первом опыте доноры были разбиты на 5 групп: первая – животные, у которых не было получено ни одного ооцита («нулевые» аспирации), во 2-ю группу вошли животные, у которых выход ОКК составлял 1-3, в третью – 4-7, в четвертую – 8-10 и в пятую – свыше 10 ОКК.

В таблице 1 представлен выход ооцитов по группам животных по мере увеличения количества аспираций.

Таблица 1 – Влияние количества аспираций на выход ооцитов

Номер аспирации	Всего, голов	Группы животных				
		1	2	3	4	5
		Выход ОКК, n-%				
		0	До 3	4-7	8-10	более 10
1-5	505	48-9,5	216-42,8	168-33,3	42-8,3	31-6,1
6-10	357	51-14,3	142-39,8	115-32,2	32-8,9	17-4,8
11-15	292	18-6,2	116-39,7	102-34,9	44-15,1	12-4,1
16-20	225	16-7,1	97-43,1	75-33,3	23-10,2	14-6,2
21-25	151	13-8,6	55-36,4	49-32,4	20-13,2	14-9,3
26-30	97	7-7,2	39-40,2	36-37,1	8-8,2	7-7,2
31-35	88	15-17,0	29-32,9	29-32,9	8-9,1	7-7,9
36-40	72	8-11,1	38-52,8	19-26,4	3-4,2	4-5,5
41-45	52	7-13,5	18-34,6	26-50,0	1-1,9	0

Продолжение таблицы 1

46-50	33	3-9,1	19-57,6	8-24,2	2-6,1	1-3,0
51-55	8	0	3-37,5	3-37,5	2-25,0	0
56-61	6	0	6-100	0	0	0

Как видно из представленных данных, достоверных закономерностей и различий между группами по мере увеличения количества аспираций не установлено. «Нулевые» аспирации колебались в пределах 0 до 17,0%, с выходом до трех ОКК от 34,6 до 100%, 4-7 ОКК от 24,2 до 50,0%, от 8 до 10 ОКК – от 1,9 до 25,0% и свыше 10 ОКК от 0 до 9,3%.

Известно, что режим использования доноров является одним из факторов, способных повлиять на эффективность аспираций. Анализируя данные, представленные в таблице 2, можно сделать вывод, что по уровню извлечения более эффективным оказался режим использования доноров с частотой два раза в неделю.

Уровень извлекаемости ооцитов при этом составил 81,3%, что на 2,8-81,3 п. п. выше по сравнению с другими режимами. В то же время наибольшее количество ооцитов отличного и хорошего качества было отмечено у группы животных, аспирация у которых проводилась раз в неделю, и составило 24,1% против 19,0% при аспирации два раза в неделю, 20,9% при аспирации один раз в неделю с интервалом через неделю и против 18,3% при аспирации два раза в неделю с интервалом через неделю.

Таблица 2 – Влияние кратности аспираций на их эффективность (n-%)

Кратность аспираций	К-во аспираций	К-во фолликулов	Получено ооцитов				
			Всего	Отл. и хор.	Уд. и условн. годн.	Всего пригод.	Непригод.
1 раз в неделю	8	311	233-74,9	75-24,1	105-33,7	180-57,9	53-17,0
2 раза в неделю	8	310	252-81,3	59-19,0	139-44,8	198-63,9	54-17,4
1 раз через неделю	8	287	212-73,9	60-20,9	120-41,8	180-62,7	32-11,1
2 раза в неделю через неделю	8	284	223-78,5	52-18,3	109-38,4	161-56,7	62-21,8

С целью изучения влияния частоты аспираций на их качество процедуру проводили каждые 3 или 7 дней по 12 (26 гол.) и 16 (26 гол.) аспираций подряд соответственно (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние частоты аспираций на их эффективность (n-%)

Частота аспираций	К-во аспираций	К-во фолликулов	Получено ооцитов					
			Всего	Отл. хор.	и	Уд. условн. годн.	и	Всего пригод.
Через 7 дн	180	1214	1106-91,1	275-24,9		540-48,8	815-73,7	291-26,3
Через 3 дн	138	1003	814-81,1	239-29,4		385-47,3	624-76,6	190-23,3

Как показывает анализ данных, приведенных в таблице 3, уровень извлекаемости ооцитов с частотой извлечения каждые 7 дней снижался по сравнению с частотой извлечения в 3 дня на 10,0 п. п. Вместе с тем выход ооцитов отличного и хорошего качества увеличивался незначительно (на 4,5 п. п., как и выход пригодных клеток в целом – на 2,9 п. п.) и находился в пределах погрешности.

По количеству извлеченных ооцитов 78% животных показали более высокий результат через 7 дней, однако такое превосходство колебалось в зависимости от донора в пределах 2,3-35,6 п. п. По выходу ооцитов отличного и хорошего качества у 56,5% доноров их количество снижалось при аспирации через 7 дней на 5,3-22,8 п. п., а у 30,4% увеличивалось на 2,2-14,6 п. п., у 13,0% животных этот показатель оставался на прежнем уровне.

Продолжительность использования доноров имеет важное значение как с физиологической, так и экономическое точки зрения. С целью определения эффективности аспирации ооцитов в зависимости от длительности их использования был проведен анализ результатов аспираций по 27 животным, которые были разбиты на группы в зависимости от количества процедур: от 1 до 50 и более аспираций. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние количества аспираций на их эффективность (n-%)

Количество аспираций	К-во доноров	Получено ОКК					
		Всего	из них пригодных			Непригодных	
			Отл. и хор.	и	Уд. условн. годн.		Всего пригод.
1-10	6	197	56-28,4		93-47,2	149-75,6	48-24,4
11-20	7	516	139-26,9		239-46,3	378-73,2	138-26,7
21-30	3	403	120-29,8		220-54,5	340-84,4	63-15,6
31-40	3	431	86-19,9		223-51,7	309-71,7	122-28,3
41-50	3	447	115-25,7		212-47,4	327-73,1	120-26,8
более 50	5	2121	359-16,9		974-45,9	1333-62,8	788-37,1
Итого	27	4115	875-21,3		1961-47,6	2836-68,9	1279-31,1

Как показывает анализ представленных данных, за период исследований всего было получено 4115 ооцитов. Из них 2836, или 68,91% оказались пригодными для постановки на дозревание.

При этом выход пригодных от числа полученных в промежутке от 1 до 20 и с 30 до 50 аспираций оставался практически на неизменном уровне и колебался в пределах 71,7-75,6%. У доноров с количеством аспираций от 20 до 30 выход жизнеспособных клеток увеличивался до 84,4%. В то же время анализ данных по пяти донорам, аспирированным более 50-ти раз, показал на снижение доли пригодных ооцитов до 62,8%.

Заключение. Таким образом, по результатам исследований не установлено достоверных различий по влиянию количества аспираций на выход ооцитов. «Нулевые» аспирации колебались в пределах 0 до 17,0%, с выходом до трех ОКК от 34,6 до 100%, 4-7 ОКК от 24,2 до 50,0%, от 8 до 10 ОКК – от 1,9 до 25,0% и свыше 10 ОКК от 0 до 9,3%.

Наибольшее количество ооцитов отличного и хорошего качества было отмечено у группы животных, аспирация у которых проводилась раз в неделю, и составило 24,1% против 19,0% при аспирации два раза в неделю, 20,9% при аспирации один раз в неделю с интервалом через неделю и против 18,3% при аспирации два раза в неделю с интервалом через неделю. Уровень извлекаемости ооцитов с частотой извлечения каждые 7 дней снижался по сравнению с частотой извлечения в 3 дня на 10,0 п. п. Вместе с тем выход ооцитов отличного и хорошего качества увеличивался незначительно (на 4,5 п. п., как и выход пригодных клеток в целом – на 2,9 п. п.) и находился в пределах погрешности. По количеству извлеченных ооцитов 78% животных показали более высокий результат через 7 дней, однако такое превосходство колебалось в зависимости от донора в пределах 2,3-35,6 п. п. У доноров с количеством аспираций от 20 до 30 выход жизнеспособных клеток увеличивался до 84,4%.

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

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. Пестис, В. К. Эффективность получения ооцитов методом трансвагинальной аспирации у коров-доноров / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко [и др.] // *Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сборник научных трудов / Учреждение образования*

- «Гродненский государственный аграрный университет». – Гродно, 2014. – Т. 26: Зоотехния. – С. 218-225.
3. Viana, J. H. M. Occurrence and characteristics of residual follicles formed after transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in cattle / J. H. M. Viana [et al.] // *Theriogenology*. – 2013. – Vol. 79. – P. 267-273.
 4. Viana, J. H. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up / J. H. Viana, M. P. Palhao, L. G. Siqueira, J. F. Fonseca, L. S. Camargo // *Theriogenology*. – 2010. – Vol. 73. – P. 966-972.
 5. Пестис, В. К. Первый опыт получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов (ТАО) / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко [и др.] // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. (Серыя аграрных навук)*. – Мінск, 2015. – № 1. – С. 86-91.
 6. Pontes, J. H. F. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors / J. H. F. Pontes [et al.] // *Theriogenology*. – 2011. – Vol. 75. – P. 1640-1646.
 7. Пестис, В. К. Получение ооцитов коров путем трансвагинальной пункции фолликулов / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко, И. С. Кысса, М. В. Попов // *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 123-128.
 8. Bisinotto, R. S. Luteal function and follicular growth following follicular aspiration during the peri-luteolysis period in *Bos indicus* and crossbred cattle / R. S. Bisinotto [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2012. – Vol. 47. – P. 319-27.
 9. Foster, B. A. 15 The effect of different bovine oocyte recovery methods on oocyte ultrastructure pre- and post-*in vitro* maturation / B. A. Foster, E. J. Gutierrez, K. R. Bondioli // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2018. – Vol. 31. – P. 133-134.
 10. Bisinotto, R. S. Luteal function and follicular growth following follicular aspiration during the peri-luteolysis period in *Bos indicus* and crossbred cattle / R. S. Bisinotto [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2012. – Vol. 47. – P. 319-327.
 11. Manik, R. S. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle / R. S. Manik, S. K. Singla, P. Palta // *Animal Reproduction Science*. – 2003. – Vol 76. – P. 155-161.
 12. Пестис, В. К. Вспомогательные репродуктивные технологии в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. (Серыя аграрных навук)*. – Мінск, 2019. – Т. 72, № 2. – С. 192-203.
 13. Пестис, В. К. Трансвагинальная аспирация ооцитов крупного рогатого скота в культуре *in vitro* / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко [и др.] // *Метод. рекомендацыі*. – Гродно: ГГАУ, 2015. – 48 с.