

УДК: 639.3.034:636.8

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.421

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ КОШАЧЬИХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРОКОВ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСЛЕ ОВАРИОЭКТОМИИ

Хуснетдинова Н.Ф.¹ * – канд. биол. наук, доц. каф. физиологии, фармакологии и токсикологии животных (0000-003-3092-248X); Колядина Н.И.² – канд. ветеринар. наук, руководитель центра репродукции и неонатологии (0000-0002-1330-0526); Полябин С.В.¹ – д-р ветеринар. наук, зав. каф. ветеринарной хирургии (0000-0003-1296-2840); Ромидонов А.Б.¹ – асп. каф. ветеринарной хирургии; Ромидонов В.Б.¹ – студ.

¹ ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА им. К.И. Скрябина

² ЛДВЦ МВА

*vet-doc@bk.ru

Ключевые слова: кошки, самки, донор, сперма, ооцит, зигота, бластомер, эмбрион, оплодотворение, хетчинг, вспомогательные репродуктивные технологии, *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, *vitrification*.

Key words: cats, females, donor, sperm, oocyte, zygote, blastomere, embryo, fertilisation, hatching, assisted reproductive technologies, *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, *vitrification*.

Поступила: 03.09.2024

Принята к публикации: 20.09.2024

Опубликована онлайн: 01.10.2024



РЕФЕРАТ

В настоящее время ВРТ развиваются быстрыми темпами у многих видов животных. Выделение ОКК из ткани яичника дает возможность получения *in vitro* эмбрионов для дальнейшего их культивирования. Соответственно, культивирование эмбрионов *in vitro*, дает шансы получать потомство у животных даже после их гибели. Использование гамет домашних кошек в качестве модели, позволяет усовершенствовать технику получения эмбрионов, которая может быть применима и к диким животным семейства кошачьих, находящихся под угрозой исчезновения. Целью нашего исследования служило: используя яичники кошек после проведения плановой овариогистерэктомии, оценить критичность температурного режима и временного интервала при транспортировке гонад в лабораторию до выделения ОКК. Параметром оценки служил процент получения ооцитов на стадии МП, эмбрионов на стадии морулы и бластоцисты. Метод получения ОКК, культивирование ооцитов и эмбрионов был одинаков во всех группах. Результаты показывают, что лучшие значения достигнуты при поступлении яичников в лабораторию при температуре 25 °С и взятии их в работу в течение от 1 часа до 4 часов, а увеличение времени и снижение температуры негативно влияет на компетентность к развитию ОКК. Исследование проведено на материале, полученном при плановой овариогистерэктомии 12 кошек и орхидэктомии 5 котов. В результате работы модифицирована, применительно к кошачьим, методика транспортировки гонад в лабораторию, позволяющая получить достаточное количество ОКК для последующего культивирования и оплодотворения *in vitro*. Разработана

технология коллекционирования ооцитов и сперматозоидов кошачьих. Усовершенствован способ проведения ЭКО и культивирования эмбрионов. На основании проведенных исследований, разработан алгоритм получения качественных эмбрионов кошачьих как для дальнейшего эмбриотрансфера, так и для проведения витрификации.

Сокращения: ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс, ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение, ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии, ОВГЭ – овариогистерэктомия.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

В настоящее время многие виды кошачьих имеют малочисленные популяции или вовсе находятся под угрозой исчезновения. Домашнюю кошку можно рассматривать как исследовательскую модель при разработки вспомогательных репродуктивных технологий для представителей семейства кошачьих, находящихся под угрозой исчезновения. ВРТ развиваются высокими темпами у всех видов животных и являются важным инструментом для сохранения видов, в том числе и кошачьих. Ооцит – кумулюсный комплекс (ОКК) можно выделить непосредственно из тканей яичников для получения гамет как прижизненно, так сразу после смерти животного. Это позволяет не только сохранить генетический материал, но и получать потомство от данных особей даже после их гибели. Использование яичников от животных после проведения плановой овариогистерэктомии является доступным источником ОКК для отработки технологии культивирования ооцитов и эмбрионов. В данной работе мы стараемся повысить эффективность *in vitro* созревание ооцитов, проведения ЭКО, культивирования эмбрионов до стадии выхода бластоцист из их блестящей оболочки (хетчинга). Эффективность получения и выращивания эмбрионов *in vitro* зависит от методики каждого этапа: 1) дозревания ооцитов; 2) *in vitro* оплодотворения; 3) культивирования эмбрионов [8,9]. Однако, не менее важными условиями являются способы и время доставки материала до лаборатории. В работах, проведенных на крупном рогатом скоте, показано, что транспортировка яичников в лабораторию оказывает серьезное влияние на качество ооцитов с точки зрения ядерного созревания и способности к развитию эмбрионов после культивирования

ооцитов и оплодотворения.[1] Влияние оказывают: температурный режим, сроки поставки, состав транспортной среды. Исходя из литературных данных между видами животных по чувствительности ооцитов к условиям транспортировки имеются различия. Так, например, у мышей хранение яичников при 4 °С в течение до 24 часов существенно не влияет на качество зрелых гамет [2], а у коров хранение яичников при 4 °С до 24 часов все не приводит к развитию бластоцист [3]. При этом у коров, когда их яичники хранят при 25 °С, ооциты обладают более высокой способностью к развитию, чем ооциты, полученные из яичников, хранившихся при 37 °С [4]. Хранение тканей яичников лошадей при 25 и 35 °С в течение 5–8 ч и 3–15 ч соответственно, не влияет на мейотическую компетентность ооцитов, но более низкая температура (4 °С) была пагубной по сравнению с комнатной температурой [5]. Хранение яичников лошадей при комнатной температуре более 5 часов увеличивает апоптоз гранулезных клеток [4]. Ооциты свиней, собранные из яичников, хранившихся при температуре 15 °С или ниже в течение 6 ч, не могли достичь стадии МII. А долгосрочное хранение (12 ч и более) яичников в теплых условиях (35 °С) увеличивает процент ооцитов свиней с фрагментированными ДНК ядрами и снижает скорость созревания ооцитов [6]. По представителям кошачьих есть немногочисленные работы, но их данные разрозненные и в большинстве случаев исследования обрываются на стадии дозревания ооцитов, без дальнейшей культивации. Так, показано, что ооциты кошек, извлеченные из яичников, хранившихся при 4 °С в течение до 72 ч, способны поддерживать мейотическую компетентность [7]. Цель нашего исследования состояла в следующем: в

зависимости от сроков поступления материала в лабораторию оценить *in vitro* созревание ооцитов домашних кошек, осуществить их дальнейшее оплодотворение (получение зигот), провести культивирование эмбрионов до стадии бластоциста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Работа выполнена на базе Лечебно-диагностического ветеринарного центра Московской ветеринарной академии (ЛДВЦ МВА), ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА им. К.И. Скрябина, Москва.

Поиск ОКК и оценку сперматозоидов проводили с помощью стереоскопического микроскопа (Nikon, Япония). Микроскопическую оценку эмбрионов проводили при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX73 (Япония). Культивирование эмбрионов проводили в инкубаторе WTA (Бразилия). Центрифугирование спермы проводили на центрифуги Elmi CM-6MT (Латвия)

Работа проведена на 5 половозрелых клинически здоровых котов и 12 кошек.

Коллекция яичников

Яичники домашней кошки получали после плановой овариогистерэктомии, проведенной лапаротомическим доступом. Гонады собирали от кошек в возрасте от 1 до 1,5 лет с марта по май 2024 г. Яичники в лабораторию транспортировали в растворе Дюльбекко (Панэко, Россия) с ампициллином (10 000 МЕ/мл), стрептомицином (10 000 мкг/мл) и амфотерицином (25 мкг/мл) в лабораторию в течение 30 мин после их извлечения. Далее часть яичников использовалась сразу в работе, часть помещалась в холодильник +4°C до 24 часов.

Сбор ооцитов и их созревание

Ооцит кумулюсные комплексы (ОКК) получали путем микродиссекции яичников в чашках Петри со средой ТС-199, модифицированной гентамицином, гепарином и бычьим сывороточным альбумином при комнатной температуре. Поиск ОКК осуществлялся с помощью стереоскопического микроскопа (Nikon, Япония). В дальнейшем только ОКК с тремя и более слоями гранулезных клеток, од-

нородно темной цитоплазмой и со сферической неповрежденной мембраной были использованы в работе. Ооциты, у которых наблюдалась дегенерация, или иные отклонения от нормы во время сбора или через 24 часа, не были включены в анализ. ОКК переносили в 500 мкл среды под минеральным маслом. Культивирование проводили в инкубаторе при температуре 38,5 °C, 5% CO₂ в течение 24 часов. Среду для созревания предварительно уравнивали в течение 2 часов.

Подготовка спермы кота.

Эпидимальные сперматозоиды получали из придатков семенников от 5 котов в возрасте 8-12 месяцев после плановой орхидэктомии. Сперму центрифугировали при 400 g x 5 минут для осаждения спермы. Сперматозоиды ресуспендировали в модифицированной среде, затем инкубировали в пробирках, в концентрации 0,5 x 10.6 сперматозоидов/мл при 38,5 °C с 5% CO₂. Для оценки параметров подвижности 25 мкл сперматозоидов нанесли пипеткой в предварительно нагретую камеру Маклера и наблюдали под фазово-контрастным микроскопом. (Nikon, Токио. Япония).

Проведение процедуры ЭКО

Подготовленные сперматозоиды добавляли к ооцитам в капельке объемом 100 мкл в конечной концентрации 0,5 млн сперматозоидов/мл. Гаметы инкубировали совместно в течение 18 часов при 38,5 °C и 5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂ во влажной камере.

Культивирование

Через 18 часов предполагаемые зиготы промывали осторожным пипетированием в свежей среде для удаления слабо прикрепленных сперматозоидов и/или кумулюсных клеток, затем переносили в отдельные капли по 50 мкл, предварительно уравновешенные под минеральным маслом для эко. Дробление эмбрионов оценивали через 24, 48 и 120 часов после ЭКО.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Всего в результате работы было собрано 273 ОКК. Стадии МII достигло 208 ооцита. Из них те ОКК, которые были

взяты в работу через час после ОВГЭ 70 бр 78 (89,7%), через 4 часа после ОВГЭ 120 из 144 (83%) и через 24 часа после ОВГЭ 18 бр 51 (35%).

То есть, более высокий процент ооцитов, возобновивших мейоз и достигших стадии МП в группе, где яйцники были взяты непосредственно сразу после ОВГЭ, однако стадии МП достигли и те ооциты, чьи яйцники хранились 24 часа при +4 °С. А также, стадии бластоциста достигли и те ооциты, чьи яйцники хранились при +4°С в течение 24 часов.

Стадии морулы достигло 67 эмбрионов (32,2%). Из них те ОКК, которые были взяты в работу через час после ОВГЭ - 34 (48,6% от достигших стадии МП), через 4 часа после ОВГЭ - 24 (20%), через 24 часа после ОВГЭ - 9 (50%). Стадии бластоцисты достигло 35 эмбрионов,

что составляет 16,8% от созревших ооцитов. Из них: те ОКК, которые были взяты в работу через час после ОВГЭ - 19 бластоцист, что составило 55,6 % от морул, через 4 часа после ОВГЭ получено 12 бластоцист - 50% от морул, и 4 бластоцисты через 24 часа после ОВГЭ.

ОКК, выделенные через час после плановой ОВГЭ, превосходят по способности развиваться *in vitro* по сравнению со всеми другими выделенными ОКК (полученными в отсроченное время).

На основании сравнения выхода бластоцист, относительно времени и условий доставки материала, самым эффективным зарекомендовал способ получения ОКК при доставке гонад в лабораторию в течение 1 часа при температуре 25 °С в специально подготовленных и обогащенных средах.

Таблица 1 – Развитие эмбрионов домашней кошки после ЭКО, в зависимости от условий транспортировки яйчников

Условия транспортировки	Кол-во ОКК	МП	морула	бластоциста
1 час 25 °С	78	70 (89,7%)	34 (48,6%от МП) 43,6% от ОКК	19(55,6% от морул) 24% от ОКК
4 часа 25 °С	144	120 (83%)	24 (20% от МП) 16,7% от ОКК	12 (50% от морул) 8,3% от ОКК
24 часа 4 °С	51	18 (35%)	9 (50% от МП) 17% от ОКК	4 (44,4% от морул) 7,8% от ОКК

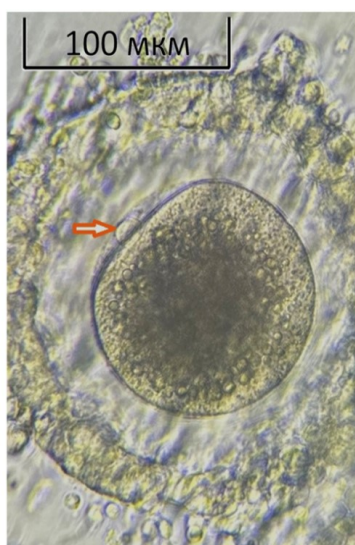


Рисунок 1 – Полученный зрелый ооцит кошки на стадии метафазы 2 (МП). Стрелкой отмечено первое полярное тельце. Увеличение x 400.

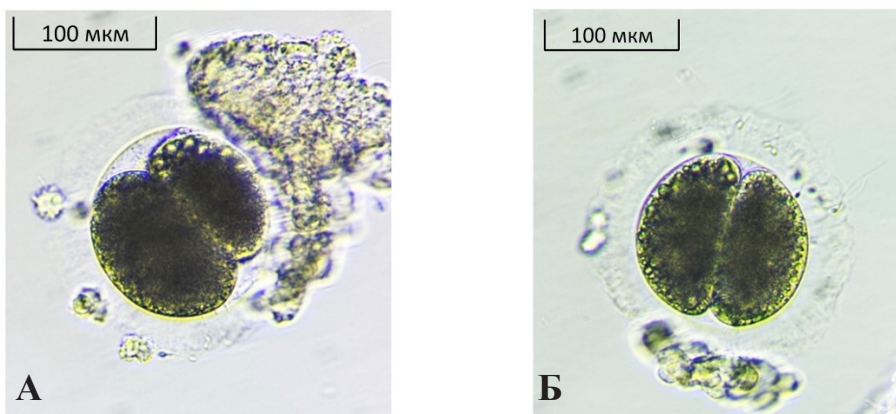


Рисунок 2 – Эмбрионы кошки, полученные при культивировании. Зиготы на стадии двух бластомеров (а, б). Увеличение $\times 400$.

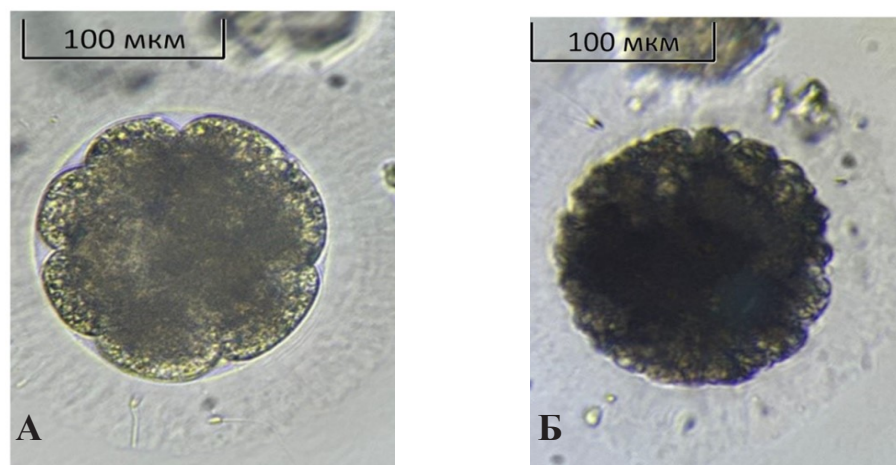


Рисунок 3 – Эмбрионы кошки, полученные при культивировании. а) стадия 16 клеточного эмбриона 3 сутки. б) стадия морулы -4 сутки развития. Увеличение $\times 400$.



Рисунок 4 – Эмбрион кошки, полученный при культивировании. Стадия бластоциста 5 сутки развития. Увеличение $\times 400$.

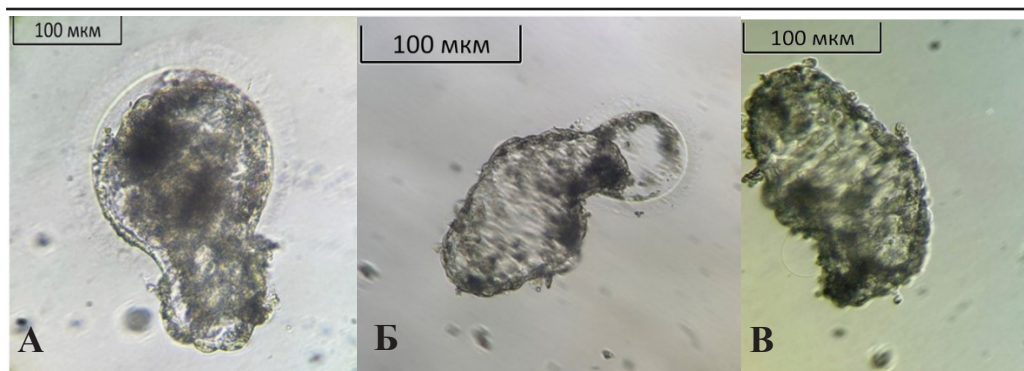


Рисунок 5 – Эмбрион кошки, полученный при культивировании. а), б) бластоциста совершает хетчинг- выход из блестящей оболочки. 6-7 сутки развития. в) - бластоциста, полностью вышедшая из блестящей оболочки, 8 день развития.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Получение ОКК, ооцитов и сперматозоидов кошачьих является одним из важнейших звеньев в проведении ЭКО и культивации эмбрионов. А получение эмбрионов нужной стадии дробления, в свою очередь, имеет фундаментальное значение для проведения последующей их трансплантации, либо сохранения путем витрификации. Эта технология даёт новые возможности в применении ВРТ для сохранения редких и исчезающих пород из семейства кошачьих.

EFFICIENCY OF METHODS OF CULTIVATION OF FELINE EMBRYOS DEPENDING ON THE TERMS OF THEIR OBTAINING AFTER OVARIOECTOMY

Khusnetdinova N.F.*¹ – Candidate of Biology Science, Associate Professor of the Department of Physiology, Pharmacology and Toxicology of Animals; **Kolyadina N.I.**² – Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Centre of Reproduction and Neonatology; **Pozyabin S.V.**¹ – Doctor of Veterinary Science, Head of the Department of Veterinary Surgery; **Romidonov A.B.**¹ – post-graduate student of the Department of Veterinary Surgery; **Romidonov V.B.**¹ – student.

¹ Federal state budgetary educational institution of higher education MSAVMiB-MVA named after K.I. Skryabin

² LDVC MVA

*vet-doc@bk.ru

ABSTRACT

Currently, ART is developing rapidly in many animal species. The isolation of OCC from ovarian tissue makes it possible to obtain in vitro embryos for further culturing. Accordingly, culturing embryos in vitro, gives chances to obtain offspring in animals even after their death. Using the gametes of domestic cats as a model, it is possible to improve the technique of obtaining embryos, which can be applied to wild animals of the endangered feline family. The aim of our study was: using cat ovaries after routine ovariohysterectomy, to evaluate the criticality of the temperature regime and time interval during transportation of gonads to the laboratory prior to OCC isolation. The evaluation parameter was the percentage of oocytes at the MII stage, embryos at the morula and blastocyst stage. The method of obtaining OKCs, culturing oocytes and embryos was the same in all groups. The results show that the best values were achieved when the ovaries were received in the laboratory at a temperature of 25 °C and taken for 1 hour to 4 hours, while the increasing the time and decreasing the temperature negatively affects the competence to develop OCC. The study was carried out on the material obtained during scheduled ovariohysterectomy of 12 female cats orchidectomy of 5 male cats. As a result of the work, the technique of transportation of gonads to the laboratory was modi-

fied for felines, allowing to obtain a sufficient number of OCCs for subsequent culturing and fertilization in vitro. The technology of collecting feline oocytes and spermatozoa has been developed. The method of IVF and embryo culturing was improved. Based on the conducted research, an algorithm for obtaining quality feline embryos both for further embryotransfer and vitrification is developed.

Abbreviations: OCC - oocyte cumulus complex, IVF - in vitro fertilisation, ART - assisted reproductive technologies, OVHE - ovariectomy.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Шульгин И.К., Ротарь Л.Н., Шульгина В.Д. Сравнение методик выделения ооцит-кумулусных комплексов из яичников животных после овариоэктомии // Разведение, селекция, генетика и биотехнология животных. 2023. Р. 114–120.
2. Kamoshita K. et al. Investigation of in vitro parameters and fertility of mouse ovary after storage at an optimal temperature and duration for transportation // Hum. Reprod. 2016. Vol. 31, № 4. P. 774–781.
3. Matsushita S. et al. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer // Anim. Reprod. Sci. 2004. Vol. 84, № 3–4. P. 293–301.
4. Pedersen H.G., Watson E.D., Telfer E.E. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology // Theriogenology. 2004. Vol. 62, № 3–4. P. 468–480.
5. Love L.B. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes // Theriogenology. 2003. Vol. 59. P. 765–774.
6. Wongsrikeao P. Effects of Ovary Storage Time and Temperature on DNA Fragmentation and Development of Porcine Oocytes // J. Reprod. Dev. 2005. Vol. 51, № 1. P. 87–97.
7. Wolfe B.A. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized

in vitro after prolonged cold storage // J. re. 1996. № 106. P. 135–141.

8. Зиновьева, Н. А. Вспомогательные репродуктивные технологии: история становления и роль в развитии генетических технологий в скотоводстве (обзор) / Н. А. Зиновьева, С. В. Позябин, Р. Ю. Чинаров // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – № 2. – С. 225–242.
9. Луканина, В.А. Сравнительное исследование результативности лапаротомического и лапароскопического методов трансплантации клонированных эмбрионов у овец / В. А. Луканина, Р. Ю. Чинаров, С. В. Позябин [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37, № 3. – С. 39–43.

REFERENCES

1. Shulgin I.K., Rotar L.N., Shulgina V.D. Comparison of techniques for isolation of oocyte-cumulus complexes from the ovaries of animals after ovarioectomy // Breeding, selection, genetics and biotechnology of animals. 2023. P. 114–120.
2. Kamoshita K. et al. Study of in vitro parameters and fertility of mouse ovary after storage at optimal temperature and duration of transport // Hum. Reprod. 2016. Vol. 31, № 4. P. 774–781.
3. Matsushita S. et al. Effect of low-temperature storage of bovine ovaries on maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilisation, parthenogenetic activation or somatic cell nuclear transfer // Anim. Reprod. Sci. 2004. Vol. 84, № 3–4. P. 293–301.
4. Pedersen H.G., Watson E.D., Telfer E.E. Effect of ovarian holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology // Theriogenology. 2004. Vol. 62, № 3–4. P. 468–480.
5. Love L.B. Influence of ovarian storage and oocyte transport method on the rate of maturation of horse oocytes // Theriogenology. 2003. Vol. 59. P. 765–774.
6. Wongsrikeao P. Effects of Ovary Storage Time and Temperature on DNA Fragmentation and Development of Porcine Oocytes // J. Reprod. Reprod. Dev. 2005. Vol. 51, № 1.

P. 87-97.

7. Wolfe B.A. Development to blastocyst of domestic cat oocytes matured and fertilised in vitro after prolonged cold storage // J. Re. 1996. № 106. P. 135-141.

8. Zinovieva, N. A. Auxiliary reproductive technologies: the history of formation and role in the development of genetic technologies in cattle breeding (review) / N. A. Zinovieva, S. V. Pozyabin, R. Yu Chinarov //

Agricultural Biology. - 2020. - № 2. - C. 225-242.

9 Lukanina, V. A. Comparative study of the effectiveness of laparotomic and laparoscopic methods of transplantation of cloned embryos in sheep / V. A. Lukanina, R. Y. Chinarov, S. V. Pozyabin [et al.] // Achievements of science and technology in agroindustrial complex. - 2023. - T. 37, № 3. - C. 39-43.