

УДК 636.2:612.64.089.67

ВЛИЯНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЯИЧНИКОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ IN VITRO

Голубец Л.В.- д. с.-х. наук, гл. науч. сотр. отраслевой биотехнологической лаб. по репродукции с.-х. животных
УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь

Ключевые слова: крупный рогатый скот, донор, ооцит, in vitro, яичники, фолликул, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), воспроизводство животных, трансплантация эмбрионов. **Key words:** cattle, donor, oocyte, in vitro, follicle, in vitro fertilization (IVF), animal reproduction, embryo transplantation.



РЕФЕРАТ

Решение проблемы модернизации и динамичного развития молочного скотоводства невозможно без качественного улучшения и обновления имеющегося поголовья скота. 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 проводили на базе отраслевой биотехнологической лаборатории по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет».

В настоящей работе представлены результаты исследований по изучению влияния морфофункционального состояния яичников на выход эмбрионов предимплантационных стадий в культуре in vitro. По результатам исследований установлено, морфологические показатели яичников среднем составляли: длина $-33,1 \pm 4,62$ (lim – 21,3-43,1 мм), ширина – $19,2 \pm 1,32$ (lim – 10,9-27,1 мм) при коэффициенте вариации 26,6%. Объем яичника в среднем составлял $6,8 \pm 0,62$ (lim – 3,5-12,1 см³). Отмечается тенденция увеличения количества фолликулов и ооцитов у яичников объемом свыше 6,0 см³, при этом разница по количеству фолликулов диаметром 2-4 мм достоверна ($P < 0,05$). Более эффективным оказалось использование яичников с количеством фолликулов более 20 и их диаметром от 3 до 8 мм. Выход жизнеспособных эмбрионов при этом составлял 20,7-23,2% от числа оплодотворенных ооцитов и достоверно превышал аналогичный показатель по другим группам яичников при $P < 0,01$.

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

ВВЕДЕНИЕ

Решение проблемы модернизации и динамичного развития молочного скотоводства невозможно без качественного улучшения и обновления имеющегося

поголовья скота. Одним из путей эффективного решения данной задачи может стать широкое внедрение в селекционные программы вспомогательных репродуктивных технологий, которые позволяют увеличивать выход молодняка от каждой

отдельно взятой особи и в значительно более короткие сроки, моделировать и создавать высокоудойные стада, сокращать генерационный интервал, минимизировать распространение инфекционных заболеваний, программировать и оптимизировать продуктивные качества, создавать генофонд существующих и у исчезающих пород животных, сохранять их генетическое разнообразие и конструировать новые генотипы [1, 5, 6]. Трансплантация создает более благоприятные условия для использования мировых генетических ресурсов путем покупки, вместо животных, глубоко замороженных зародышей и тем самым устраняет ветеринарные препятствия в международном обмене селекционным материалом [1, 3]. В отношении мясных пород трансплантация дает возможность получения до 40% телят-двоен, а также получения животных мясных пород в стадах молочных коров. Являясь одним из методов ускоренного размножения высокоценных генотипов животных, биотехнология получения эмбрионов в культуре *in vitro* представляет собой комплексный процесс, включающий в себя получение ооцит-кумулусных комплексов, их отбор и оценку жизнеспособности, экстракорпоральное созревание, оплодотворение и культивирование ранних зародышей до завершающей стадии предимплантационного развития – бластоцисты [2, 4, 8]. Поэтому четкое и правильно исполнение всех этапов, первым из которых является получение и отбор ооцитов, определяет эффективность всей технологии в целом. Одним из источников ооцитов служат яичники животных овариоэктомированных на конвейере мясокомбината [7].

Цель работы: изучить влияние морфофункционального состояния яичников на эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводились в рамках двух государственных программ научных исследований:

«Биотехнология» (подпрограмма «Развитие биологической науки, биологи-

ческого образования и биологической промышленности на 2007-2011 год и на период до 2020 года»), «Научно-технологические и технические на 2016-2020 годы» (подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии-2020»). Исследования проводили на базе отраслевой биотехнологической лаборатории по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет».

Яичники получали на конвейере гродненского мясокомбината. После овариоэктомии они помещались в бытовой термос с 0,9% раствором натрия хлорида при температуре 20-25°C. После доставки в лабораторию яичники освобождали от связок и жировой ткани и два-три раза промывали в свежем физиологическом растворе.

Ооциты выделяли путем иссечения ткани яичников стерильным лезвием безопасной бритвы в стеклянной чашке Петри диаметром 90 мм наполненной соевым раствором Дюльбекко с добавлением 1% эстральной сыворотки коров, 50 ед./мл гентамицина и 1 ед./мл гепарина.

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 увеличением соответственно. Качество ооцит-кумулусных 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.

Пригодные для созревания ооцит-кумулусные комплексы помещали в культуральную среду созревания и помещали в CO₂ инкубатор «Memmert» при температуре 38,7°C, с влажностью 96-98% и уровнем углекислого газа 5%. Подготовку спермы проводили с использовани-

ем градиента плотности Перколл. Для оплодотворения использовали заморожено-оттаянную сперму в концентрации 1×10^6 /мл.

Совместная инкубация ооцитов и спермиев продолжалась в течение 18-20 часов при температуре $38,7^\circ\text{C}$, максимальной влажности и в присутствии 5% CO_2 . После завершения инкубации предположительные зиготы отмывались от спермы в среде для культивирования ранних зародышей и возвращались в CO_2 инкубатор до получения эмбрионов на предимплантационных стадиях развития.

Питательные среды для созревания, капацитации и оплодотворения были приготовлены по нашим методикам на основе реактивов фирмы Sigma.

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

По мнению многих отечественных и зарубежных авторов выход и качество ооцитов во многом определяется морфо-

функциональным состоянием яичников [7, 8].

В таблице 1 представлены данные морфологических показателей яичников, использованных в опытах по получению эмбрионов в культуре *in vitro*. Как показывает анализ приведенных данных, длина яичников в среднем составляла $33,1 \pm 4,1$ с колебанием от 21,3 до 43,1 мм. Ширина – $19,2 \pm 1,32$ при коэффициенте вариации 26,6%. Объем яичника колебался в пределах 3,5-12,1 см³ и в среднем составлял $6,8 \pm 0,62$ см³.

Количество антральных фолликулов на одном яичнике составляло в среднем $18,7 \pm 1,45$ (lim 11-32), в том числе диаметром до 2 мм – $10,6 \pm 0,83$ (lim 5-15); от 2 до 4 мм – $6,1 \pm 0,93$ (lim 1-15) и диаметром свыше 4 мм – $2,0 \pm 0,59$ (lim 1-5). Выход ооцитов в среднем составил $11,5 \pm 0,93$, в том числе пригодных для созревания – $5,9 \pm 0,57$ (51,3%).

В таблице 2 представлены данные по количеству фолликулов и полученных ооцитов в зависимости от объема яичника. Анализ результатов исследования, показывает на увеличение указанных показателей у яичников объемом свыше 6,0 см³, по сравнению с объемом до 6,0 см³

Таблица 1
Параметры яичников коров, использованных для получения ооцит-кумулюсных комплексов

Показатели	$M \pm m$	lim	Cv
Длина яичника (мм)	$33,1 \pm 4,1$	21,3-43,1	47,7
Ширина яичника (мм)	$19,2 \pm 1,32$	10,9-27,1	26,6
Объем яичника (см ³)	$6,8 \pm 0,62$	3,5-12,1	35,3
Количество антральных фолликулов	$18,7 \pm 1,45$	11-32	29,9
Количество фолликулов диаметром до 2 мм	$10,6 \pm 0,83$	5-15	30,2
Количество фолликулов диаметром 2-4 мм	$6,1 \pm 0,93$	1-15	59,0
Количество фолликулов диаметром более 4 мм	$2,0 \pm 0,59$	1-5	68,0
Количество ооцитов на один яичник	$11,5 \pm 0,93$	5-19	31,3
в том числе пригодных для созревания	$5,9 \pm 0,57$	3-9	37,3
не пригодных к культивированию	$5,6 \pm 0,92$	2-12	63,9

Таблица 2

Взаимосвязь количества ооцитов и фолликулов с объемом яичников

Показатели	Объем яичников, см ³	
	до 6,0 n=7	более 6,0 n=8
Количество антральных фолликулов	16,6±1,42	20,5±2,30
Количество фолликулов диаметром до 2 мм	9,1±1,46	10,6±4,50
Количество фолликулов диаметром 2-4 мм	4,0±0,81	7,9±1,35*
Количество фолликулов диаметром свыше 4 мм	2,0±0,96	2,0±0,60
Количество ооцитов на один яичник	10,8±1,15	12,5±1,50
Количество ооцитов пригодных для культивирования	6,6±1,3	5,2±1,28
Количество ооцитов не пригодных для культивирования	4,3±0,99	6,7±1,25

за исключением количества пригодных для культивирования клеток. При этом по количеству фолликулов диаметром 2-4 мм разница достоверна ($P<0,05$). В таблицах 3 и 4 представлены результаты исследований по изучению эффективности получения эмбрионов в культуре *in vitro* в зависимости от количества фолликулов на яичнике и их диаметра. Как показывает анализ представленных данных, если выход эмбрионов на предимплантационных стадиях на один яичник оказался достоверно выше при оплодотворении ооцитов из яичников с количеством фолликулов более 20 – $4,8\pm0,26$ против $2,8\pm0,22$, $2,2\pm0,33$, $1,4\pm0,17$ и $0,7\pm0,12$ при $P\geq0,001$, также как и выход ооцитов пригодных для постановки на созревание $19,4\pm0,76$ против $12,5\pm0,84$, $9,8\pm0,58$, $5,7\pm0,38$ и $2,8\pm0,21$ при $P\geq0,001$, то выход эмбрионов от числа оплодотворенных ооцитов оказался примерно на одном и том же уровне с колебанием от 22,4% при количестве фолликулов на яичнике 11-20 до 25,0% при количестве фолликулов менее 5. При анализе данных по выходу эмбрионов в зависимости от диаметра фолликулов достоверно более высокие показатели получены при использовании ооцитов, из фолликулов диаметром от 3 до 8 мм – $1,4\pm0,15$, при диаметре фолликулов 3,1-6,0 мм и $1,1\pm0,16$ при диаметре фолликулов 6,1-8,0 мм против $0,5\pm0,18$ и $0,1\pm0,06$ при диаметре фолликулов до 3 мм и свыше 8 мм при $P\geq0,01$ и

$P\geq0,05$, соответственно. При пересчете выхода эмбрионов от числа оплодотворенных ооцитов данные показатели составили: при диаметре фолликулов до 3 мм – 7,8%, 3,1-6,0 мм – 25,0%, при диаметре фолликулов 6,1-8,0 – 20,7% и при диаметре свыше 8 мм – 9,1%.

ВЫВОДЫ

Таким образом, по результатам исследований установлено что, морфологические показатели яичников среднем составляли: длина – $33,1\pm4,62$ (lim – 21,3-43,1 мм), ширина – $19,2\pm1,32$ (lim – 10,9-27,1 мм) при коэффициенте вариации 26,6%. Объем яичника в среднем составил $6,8\pm0,62$ (lim – 3,5-12,1 см³).

Отмечается тенденция увеличения количества фолликулов и ооцитов у яичников объемом свыше 6,0 см³, при этом разница по количеству фолликулов диаметром 2-4 мм достоверна ($P<0,05$).

Более эффективным является использование яичников с количеством фолликулов до 5 и более 20 и их диаметром от 3 до 8 мм. Выход жизнеспособных эмбрионов при этом составлял 20,7-25,0% от числа оплодотворенных ооцитов.

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

Таблица 3
Эффективность получения эмбрионов в культуре in vitro в зависимости от количества фолликулов на яичнике

Используй- вано яичников	Количество фолликулов		Аспирирова- но фоллику- лов	Получено ОКК		Оплодотворе- но ОКК	Количе- ство дро- бящихся зароды- шей	Выход эмбрионов				всего
								день цикла				
	всего	на один яичник		всего	пригод- ных			7	8	9	10	
35	до 5	3,8±0,18	3,8±0,18	3,1±0,19	2,8±0,21	2,8±0,21	1,6±0,17	0,2±0,06	0,2±0,06	0,2±0,06	0,1±0,04	0,7±0,12
16	6- 10	7,0±0,42	7,0±0,42	6,2±0,38	5,7±0,38	5,7±0,38	3,7±0,33	0,6±0,21	0,5±0,17	0,2±0,14	0,1±0,06	1,4±0,17
12	11- 15	12,3±0,52	12,3±0,52	10,5±0,56	9,8±0,58	9,8±0,58	5,2±0,20	0,9±0,22	0,6±0,19	0,6±0,22	0,1±0,08	2,2±0,33
11	16- 20	16,6±0,50	16,6±0,50	12,9±0,65	12,5±0,84	12,5±0,84	8,4±0,32	0,9±0,20	1,1±0,27	0,7±0,23	0,1±0,09	2,8±0,22
9	>20	23,4±0,81	23,4±0,81	20,3±0,87	19,4±0,76	19,4±0,76	10,8±0,61	1,3±0,15	1,9±0,33	1,4±0,17	0,2±0,14	4,8±0,35**

Таблица 4
Выход эмбрионов в зависимости от диаметра фолликулов

Ис- пользо- вано яични- ков	Диа- метр фолли- кулов	Количе- ство фол- ликулов в среднем на яичник	Аспири- ровано фоллику- лов	Получено ОКК		Оплодо- творено ОКК	Количе- ство дробя- щихся зароды- шей	Выход эмбрионов				всего
				всего	пригод- ных			день цикла				
								7	8	9		
14	до 3мм	10,9±0,53	10,9±0,53	7,6±0,42	6,4±0,36	6,4±0,36	3,1±0,26	0,1±0,09	0,3±0,16	0,1±0,09	0,5±0,18	
16	3.1-6.0	7,7±0,50	7,7±0,50	6,2±0,38	5,6±0,36	5,6±0,36	4,0± 0,32	0,4±0,15	0,6±0,12	0,4±0,13	1,4±0,15*	
15	6.1-8.0	7,5±0,38	7,5±0,38	6,0±0,34	5,3±0,29	5,3±0,29	4,2±0,24	0,3±0,12	0,6±0,18	0,2±0,10	1,1±0,16*	
30	> 8мм	1,5±0,10	1,5±0,10	1,3±0,10	1,1±0,11*	1,1±0,11	0,8±0,11	-	0,1±0,05	-	0,1±0,05	

THE INFLUENCE OF THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF THE OVARIES ON THE EFFICIENCY OF OBTAINING EMBRYOS IN VITRO

L.V. Golubets - Doctor of Agricultural Sciences, Ch. scientific. sotr. branch biotechnology lab. on reproduction with farm animals. "Grodno State Agrarian University", Grodno, Republic of Belarus

ABSTRACT

It is impossible to solve the problem of modernization and dynamic development of dairy cattle breeding without qualitative improvement and renewal of the existing livestock. The research was carried out within the framework of two state research programs: "Biotechnology" (sub-program "Development of biological science, biological education and biological industry for 2007-2011 and for the period up to 2020"), "High-tech technologies and equipment for 2016-2020" (sub-program 1 "Innovative Biotechnologies-2020"). The research was conducted on the basis of the branch biotechnological laboratory for reproduction of farm animals of the State Educational Institution "Grodno State Agrarian University".

This paper presents the results of studies on the influence of the morphofunctional state of the ovaries on the yield of preimplantation stage embryos in vitro culture. According to the results of the studies, the morphological parameters of the ovaries were on average: length 33.1 ± 4.62 (lim – 21.3-43.1 mm), width 19.2 ± 1.32 (lim – 10.9-27.1 mm) with a coefficient of variation of 26.6%. The ovarian volume averaged 6.8 ± 0.62 (lim – 3.5-12.1 cm³). There is a tendency to increase the number of follicles and oocytes in ovaries with a volume of more than 6.0 cm³, while the difference in the number of follicles with a diameter of 2-4 mm is significant ($P < 0.05$). More effective was the use of ovaries with more than 20 follicles and a diameter of 3 to 8 mm. The yield of viable embryos in this case was 20.7-23.2% of the number of fertilized oocytes and significantly exceeded the same indicator for other ovarian groups at $P < 0.01$.

The obtained data are of practical significance for the development of technology for obtaining embryos in vitro, the use of which will help to accelerate the selection process and increase the efficiency of breeding work in cattle breeding in general.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубец, Л.В. Инновационные технологии в разведении и селекции племенного скота : монография / Л.В. Голубец, А.С. Дешко, И.С. Кысса, Е.К. Стецкевич. – Гродно : ГТАУ, 2019 – 430 с. – ISBN 978-958-537-148-0.
2. Bousquet, D. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach / D. Bousquet // *Theriogenology*. – 1999. – Vol. 51 (1). – P. 59–70.
3. Brachett, B.G. Normal development following in vitro fertilization in the cow / B.G. Brachett, D. Bausque, W.J. Donawick // *Biol. Reprod.* – 1982. – Vol. 27. – P. 147–158.
4. De Loos, F. Morphology of immature bovine oocytes / F. De Loos, P. Van Mawik // *Gametes Res.* – 1989. – Vol. 24. – P. 197–204.
5. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring / A.M. Wagten-donk-de Leeuw et. al. // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53 (2). – P. 575–597.
6. Galli, C. Bovine embryo technologies / C. Galli, R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N.Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina, G. Lazzari // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 59. – P. 599–616.
7. Lazzari, G. In vitro embryos production from valuable cows slaughtered for reproductive failure or terminal illness / G. Lazzari, C. Galli // *Report of the 9th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association*. – 1993. – P. 87–99.
8. Merton, J.S. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry / J.S. Merton, A.P.W. De Roos, E. Mullaart, L. De Ruigh, L. Kaal et al. // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 59. – P. 651–674.