

Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных : мат. междунар. науч. конф. – Дубровицы, 2002. – С. 94-96.

6. Лобан, Н. А. Оценка стрессустойчивости и плодовитости свиней методами молекулярной генной диагностики / Н. А. Лобан, О. Я. Василюк, Н. А. Зиновьева // Интенсификация производства продуктов животноводства. – Жодино, 2002. – С. 18.

7. Лобан Н. А. Крупная белая порода свиней – методы совершенствования и использования / Н. А. Лобан. – Минск : ПЧУП Бизнесофсет, 2004. – 110 с.

8. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Изд. 3-е, испр. – Минск : Вышэйшая школа, 1973. – 320 с.

Поступила 7.02.2022 г.

УДК 636.2:591.465.12

<https://doi.org/10.47612/0134-9732-2022-57-1-60-68>

А.И. ГАНДЖА, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, В.П. СИМОНЕНКО,
И.В. КИРИЛЛОВА, Е.Д. РАКОВИЧ, Н.В. ЖУРИНА,
М.А. КОВАЛЬЧУК

УСЛОВИЯ ПОДГОТОВКИ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА К ПРОВЕДЕНИЮ МИКРОМАНИПУЛЯЦИЙ ВНЕ ОРГАНИЗМА

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

При оплодотворении ооцитов крупного рогатого скота посредством интрацитоплазматической инъекции сперматозоида сперматозоид вводится непосредственно в цитоплазму яйцеклетки, что позволяет преодолеть вне организма три естественных барьера. При угрозе утраты высокоценного генетического материала мужской или женской особи это может явиться единственным способом сохранения ценных наследственных качеств с высокой окупаемостью затрат, а также послужит фундаментом для дальнейшего развития генной инженерии. В связи с этим в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», в которых разработаны и изучены условия подготовки ооцитов крупного рогатого скота к проведению микроманипуляций вне организма. Установлено, что предпочтительно использовать яичники в лютеиновой и фолликулярной фазах.

Ключевые слова: ооцит, капацитация, подвижность, скорость, траектория, амплитуда, экстракорпоральное оплодотворение, капацитация, спермии.

A.I. GANDZHA, L.L. LETKEVICH, V.P. SIMONENKO,
I.V. KIRILLOVA, E.D. RAKOVICH, N.V. ZHURINA,
M.A. KOVALCHUK

CONDITIONS FOR PREPARATION OF CATTLE OOCYTES FOR IN VITRO MICROMANIPULATION

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

When cattle oocytes are fertilized through intracytoplasmic sperm injection, the sperm is injected directly into the cytoplasm of the egg cell, allowing three natural barriers to be overcome outside the body. If the loss of highly valuable genetic material in a male or female parent is threatened, this may be the only way to preserve valuable hereditary traits with a high cost recovery, and it may also serve as the basis for further development of genetic engineering. In this regard, the Laboratory for Molecular Biotechnology and DNA Testing of the RUE "Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Animal Breeding" has developed and studied conditions for preparation of cattle oocytes for in vitro micromanipulation. It has been established that it is preferable to use the ovaries in the luteal and follicular phases.

Keywords: oocyte, capacitation, motility, speed, trajectory, amplitude, in vitro fertilization, sperm cells.

Введение. Новым направлением в области клеточных репродуктивных технологий может стать оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота посредством интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ), когда для оплодотворения одной яйцеклетки используется один сперматозоид [1, 2, 3]. С помощью данного метода сперматозоид вводится непосредственно в цитоплазму яйцеклетки, что позволяет преодолеть вне организма три естественных барьера [4]. При современном состоянии воспроизводства крупного рогатого скота технологию массово использовать в производстве не представляется целесообразным, однако в исключительных случаях и в будущем, при угрозе утраты высокоценного генетического материала мужской или женской особи, это может явиться единственным способом сохранения ценных наследственных качеств с высокой окупаемостью затрат, а также послужит фундаментом для дальнейшего развития генетической инженерии.

В этой связи цель работы заключалась в изучении условий подготовки ооцитов крупного рогатого скота к проведению микроманипуляций вне организма на предмет ИКСИ.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси»

по животноводству» в 2021 году. Яичники получали на Минском мясокомбинате и убойном цехе ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области. Извлечение ооцитов проводили путём рассечения ткани яичников лезвием безопасной бритвы в растворе Хенкса. Для дозревания ооцитов использовали среду 199 (Medium 199, Hepes modification 25mM). Ооциты помещали в лунки планшетов объёмом 500 мкл в среду созревания под минеральное масло (Sigma, США) и культивировали продолжительностью до 20-24 часов в зависимости от условий опыта при температуре 38,5-39 °С в атмосфере 5 % CO₂ в воздухе. После выделения ооцитов их морфологическую оценку качества осуществляли по разработанной нами ранее 5-балльной шкале на стереомикроскопе лабораторного класса Olympus при 400-кратном увеличении. Для эксперимента были отобраны следующие группы ооцитов: I – ооциты с оценкой 4 и 5 баллов, II – ооциты, оценённые в 3 балла; III – гаметы от коров, имеющих продуктивность более 7000 кг молока в год, ввиду их физиологически обоснованного малого количества и низкого качества. Изучали следующие условия подготовки ооцитов крупного рогатого скота к проведению микроманипуляций вне организма на предмет ИКСИ: влияние физиологического состояния яичников по морфологическим признакам (лютеиновая или фолликулярная фаза, лютеиновая или фолликулярная киста, гипофункция, яичник без крупного жёлтого тела и фолликула), влияние плотности посадки ооцитов на единицу площади (0,04; 0,05; 0,1 и 0,2 ооц./мм²) и 0,02 нг/мл сурфагона при созревании на их жизнеспособность после денудации по морфологическим и цитологическим показателям гамет.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Данные по изучению влияния количества клеток, помещённых на единицу площади поверхности при культивировании, на их жизнеспособность после денудации представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние плотности посадки ооцитов на единицу площади при созревании на их жизнеспособность после денудации

Плотность посадки, ооц./мм ²	Пригодность ооцитов опытных групп к ИКСИ					
	I		II		III	
	1, n*	2, n-%*	1, n*	2, n-%*	1, n*	2, n-%*
0,04	85	44-51,8	59	9-15,3	72	20-27,8
0,05	61	32-52,5	43	6-16,3	63	23-36,5
0,1	78	38-48,7	75	11-14,7	94	22-23,4
0,2	69	32-45,4	68	9-13,2	81	13-16,0
0,3	74	34-45,9	83	10-12,0	54	8-14,8

Примечание: *1 – количество ооцитов; 2 – количество жизнеспособных ооцитов после созревания и денудации.

Наилучшие результаты получены в группах с плотностью посадки 0,04 и 0,05 ооц./мм². Количество клеток пригодных для микроманипуляций, в I группе составило 51,8–52,5 %, во II – 15,3-16,3 %, в III – 27,8-36,5 %.

Плотность размещения на 1 мм² от 0,1 до 0,3 ооцитов от общего количества ооцитов, поставленных на культивирование в группах, оказала негативное влияние на процессы пролиферации ооцит-кумулясных комплексов и процессы ядерно-цитоплазматического созревания.

Проведён анализ морфофункционального состояния трёх опытных групп ооцитов после созревания и денудации при использовании сурфагона в культуральных средах (таблица 2). Сурфагон добавляли в дозе 0,02 нг/мл к среде для созревания в опытных группах. В качестве контроля в каждой опытной группе служила среда без добавления Гн-РГ. Исследования показали, что применение сурфагона в среде для созревания ооцитов способствовало сохранению жизнеспособности в I опытной группе 48,1 % клеток, что на 2,3 п.п. больше, чем в контроле, II – 21,1 %, что больше контроля на 4,9 п.п., III – 31,9 %, что больше на 9,6 п.п.

Таблица 2 – Морфофункциональное состояние опытных групп ооцитов при использовании сурфагона

Опытные группы	I		II		III	
	К	О	К	О	К	О
Ооцитов всего, п	83	79	68	66	81	72
Пригодных ооцитов п-%	38-45,8	38-48,1	11-16,2	14-21,1	18-22,3	23-31,9

Примечание: К – контроль; О – опыт.

Проведён анализ влияния параметров подготовки ооцитов крупного рогатого скота на ожидаемую возможность проведения с ними микроманипуляций вне организма (таблица 3). Оценивалось качество трёх опытных групп ооцитов непосредственно после извлечения и после 22-24 часов созревания и денудации. Ооциты для созревания размещали в культуральной среде ТС-199 в объёме 0,5 мл группами с плотностью посадки 0,04 и 0,05 ооц./мм², с добавлением 0,02 нг/мл гонадотропин-рилизинг гормона (сурфагона) к среде для созревания.

Несмотря на то, что качество популяции извлечённых ооцитов I группы непосредственно после извлечения находилось на должном уровне (36,8 % клеток с оценкой 5 баллов и 63,2 % с оценкой 4 балла), количество ооцитов отличного и хорошего качества после 24 часов созревания и денудации снизилось и составило 20,7 и 31,7 % соответственно. За время созревания снизилось качество 47,6 % клеток (36,6 % с оценкой 3 балла и 11,0 % с оценкой 2 балла).

Таблица 3 – Влияние параметров подготовки ооцитов крупного рогатого скота на их морфофункциональное состояние

Показатель	Пригодность ооцитов опытных групп к ИКСИ, п-%					
	I		II		III	
Группы	1*	2*	1*	2*	1*	2*
Количество ооцитов, п	87	82	50	49	75	68
в том числе: оценённые в 5 баллов, п-%						
	32-36,8	17-20,7	-	-	2-2,7	2-2,9
в 4 балла, п-%	55-63,2	26-31,7	-	4-8,1	14-18,7	20-29,4
в 3 балла, п-%	-	30-36,6	50-100	16-32,7	34-45,3	22-32,4
в 2 балла, п-%	-	9-11,0	-	29-59,2	25-33,3	24-35,3

Примечание: * 1 – после извлечения; 2 – после созревания и денудации

Во II опытной группе, где все 100 % ооцитов имели оценку 3 балла при постановке на опыт, после созревания 8,1 % клеток получили оценку 4 балла, 32,7 % – 3 балла, 59,2 % оказались абсолютно непригодными для дальнейшего использования. В III опытной группе количество ооцитов с оценкой 5 баллов не изменилось в начале и после завершения эксперимента – 2,7 и 2,9 %, количество гамет с оценкой в 4 балла увеличилось на 10,7 п. п., в 3 балла, напротив, снизилось на 12,9 п. п. Количество непригодных клеток практически не изменилось и составило, соответственно, 33,3 и 35,3 %. Соблюдение параметров подготовки ооцитов критических групп (II и III) позволило получить 2,9 % гамет с оценкой 5 баллов, увеличить после созревания выход гамет с оценкой 4 балла на 8,1-10,7 п. п. до уровня 29,4 % и сохранить на уровне 32,4-32,7% уровень гамет с оценкой 3 балла. Таким образом, популяция гамет, пригодных для проведения микроманипуляций, на первичном этапе исследований возросла до 60 %.

Проведён анализ 40 яйчников во взаимосвязи с морфологическим и цитологическим состоянием гамет. По физиологическому состоянию гонады были распределены следующим образом: в лютеиновой фазе находилось 4 яйчника или 10 % от общего количества, в фолликулярной – 3 или 7,5 %, яйчников без крупного фолликула и желтого тела было 6 или 15 %, с фолликулярной или лютеиновой кистой – 15 или 37,5 % соответственно, с гипофункцией – 12 яйчников или 30 %. Как видно из анализа у 67,5 % яйчников возможность получения вне организма жизнеспособных ооцитов крайне низкая, так как гормональный дисбаланс в организме и, прежде всего, половых гормонов не способствует созреванию полноценных ооцитов, обладающих потенциальной способностью к мейозу. Всего выделено, проанализировано и поставлено на созревание 989 ооцит-кумулосных комплексов из них: 159-16,2 % – оценённых в 5 баллов, 224-22,6 % – в 4 балла, 474-47,9 % – в 3 балла и 132-13,3 % – в 2 балла.

Состояние выделенных ОКК оценивали по пятибалльной шкале. Морфологический анализ ОКК, извлечённых из яичников различного физиологического состояния, свидетельствует об их неоднородности (таблица 4).

Таблица 4 – Морфологическое состояние выделенных ооцит-кумулосных комплексов во взаимосвязи с физиологическим состоянием гонад

Показатель	Оценка ОКК, баллы	Физиологическое состояние яичников				
		Лютеиновая фаза n = 4	Фолликулярная фаза n = 3	Яичники без крупного фолликула и жёлтого тела n = 6	Киста n = 15	Гипофункция n = 12
Количество ооцитов, n-%	5	12-10,5	16-17,3	50-34,7	81-16,4	–
	4	45-39,1	26-28,3	33-22,9	120-24,2	–
	3	43-37,4	36-38,5	38-26,4	243-49,1	114-79,2
	2	15-13,0	13-15,9	23-16,0	51-10,3	30-20,8
В среднем на один яичник, M±m	5	3,0±1,0	5,2±1,5	8,5±3,6	5,4±1,9	–
	4	11,1±4,3	8,5±2,1	5,5±1,8	8,0±3,7	–
	3	10,7±2,5	11,6±3	6,5±2,2	16,2±6,5	9,5±2,2
	2	3,7±1,4*	4,8±1,4**	3,7±3,1	3,4±2,9	2,5±2,5

Примечание. * – P>0,05; ** – P >0,01

Количество ооцитов с оценкой в 5 баллов колебалось от 0 у доноров с гипофункцией и до 34,7 % в группе яичников без крупного фолликула и желтого тела, что было на 17,4-24,2 п. п. больше, чем в популяциях ооцитов в фолликулярной и лютеиновой фазах полового цикла. Количество ооцитов с 4 баллами составило от 0 при гипофункции до 39,1 % в лютеиновой стадии, больше всего клеток имели оценку 3 балла от 26,4 без крупного жёлтого тела и фолликула до 79,2 % при гипофункции, 2 балла – от 10,3 % при кистах до 20,8 % при гипофункции. Необходимо отметить, что при гипофункции получены все 100 % ооцит-кумулосных комплексов с оценкой 2 и 3 балла.

Наибольшее количество ОКК с оценкой 4 и 5 баллов получено из яичников без крупного фолликула и жёлтого тела, но с множеством фолликулов диаметром 3-5 мм – 57,4 %. В лютеиновой стадии полового цикла процент ооцитов, пригодных к культивированию вне организма (4 и 5 баллов), составил 49,6 %, в фолликулярной – 45,6 %.

Несмотря на эндокринный дисбаланс у яичников с кистами было извлечено 40,6 % клеток, по морфологическим и цитологическим признакам соответствующих оценке 4 и 5 баллов. В этой же популяции яичников извлечено больше всего ооцитов. В среднем на 1 яичник получено 24,7 ОКК, из них 4,0 – отличных, 5,6 – хороших, 11,9 –

удовлетворительных, 3,2 – неудовлетворительных.

Как показали исследования, из яичников коров в лютеиновой и фолликулярной фазе полового цикла, с кистами и яичниками без крупного фолликула или жёлтого тела, но с множеством фолликулов диаметром 3-5 мм можно получать от 10,5 до 34,7 % ооцитов с оценкой 5 баллов, от 22,9 до 39,1 % с оценкой 4 балла, от 26,4 до 49,1 % – 3 балла, кроме состояния гипофункции, где выход ооцитов с оценкой 3 балла составил 79,2 и 20,8 % 2 балла, а ооцитов с потенцией к оплодотворению не выделено.

Чтобы дать объективную оценку тому, каким образом физиологическое состояние яичников доноров влияет на морфологические и цитологические показатели ооцитов, нами изучены данные параметры ооцитов после 24 часов созревания (таблица 5).

Таблица 5 – Морфологические и цитологические показатели ооцитов после созревания во взаимосвязи с физиологическим состоянием гонад

Показатель	Оценка ОКК, баллы	Физиологическое состояние яичников				
		Лютеиновая фаза n = 4	Фолликулярная фаза n = 3	Яичники без крупного фолликула и жёлтого тела n = 6	Киста n = 15	Гипофункция n = 12
Количество ооцитов, n-%	5	9-8,8	13-16,1	36-29,7	19-4,9	–
	4	41-40,2	24-29,6	33-27,4	80-20,8	–
	3	39-38,3	33-40,7	33-27,4	235-61,3	84-78,5
	2	13-12,7	11-13,6	19-15,5	50-13,0	23-21,5
В среднем на один яичник, M±m	5	2,3±0,8	4,3±1,5	6,0±3,6	1,3±0,9	–
	4	10,3±3,3	8,0±2,1	5,5±1,8	5,3±1,7	–
	3	9,7±2,5	11,0±3	5,5±1,7	15,6±5,5	7,0±1,2
	2	3,3±1,4*	3,7±1,4**	3,2±2,8	3,3±1,9	1,9±1,3

Примечание: * – P>0,05; ** – P >0,01

Все ооциты, исследованные в предыдущем опыте, поставлены на культивирование. Однако не все ооциты завершили этот процесс и перенесли процедуру денудации. Таким образом, проанализированы цитологические особенности 795 ооцитов.

После 24-часового созревания и денудации состояние ооцитов оценивали по 5-балльной шкале согласно критериям классификации яйцеклеток коров по цитологическим параметрам [1]. Из 115 ооцит-кумуляных комплексов, поставленных на созревание, из яичников в лютеиновой фазе 102 или 88,7 % после денудации подверглись цитологическому анализу, в фолликулярной фазе из 91 – 81 или 89 %, из яичников без крупного фолликула и желтого тела из 144 – 121 или 84,0 %, с кистами из 495 – 384 или 77,6 %, с гипофункцией – из 144 – 107 или 74,3%.

После созревания ооцитов в искусственных условиях всего получено 77 ооцитов, что составило 9,7 % после денудации или 7,8 % от поставленных на созревание в начале эксперимента, имеющих размер ооцита – 130-150 мкм, толщину оболочки – 11-13 мкм равномерную, гомогенную цитоплазму без вакуолей, первое полярное тельце овальной формы, с равномерной оболочкой и перивителлиновое пространство без включений и оценённые в 5 баллов.

В 4 балла оценены всего 178 ооцитов – 22,4 % или 18,0 % от начала опыта, имеющих размер ооцита 130-150 мкм, толщину оболочки – 10-14 мкм неравномерную, наличие перивителлинового пространства с единичным включением мелких гранул, одинарное первое полярное тельце, овальной или округлой формы, цитоплазму гомогенную с отсутствием вакуолей.

424 ооцита – 53,3 % или 42,9 % от поставленных на культивирование оценены в 3 балла по сумме признаков: размер ооцита – 120-160 мкм, толщина оболочки – 10-14 мкм неравномерная, наличие перивителлинового пространства с включение мелких гранул, фрагментированное первое полярное тельце или его отсутствие, цитоплазма гранулярная с присутствием одиночных мелких вакуолей.

В 2 балла оценили всего 116 ооцитов – 14,6 % или 11,7 % от общего количества в начале эксперимента со следующими параметрами: размер ооцитов составил 90-180 мкм, толщина оболочки – 8-15 мкм неравномерная, отсутствие или наличие перивителлинового пространства с мелкой или крупной фрагментацией, отсутствие первого полярного тельца, цитоплазма гранулярная с присутствием вакуолей.

Больше всего ооцитов с оценкой 5 баллов получено из яичников без крупного фолликула и жёлтого тела – 29,7 %. Дело в том, что яичник является парным органом, а крупный рогатый скот относится к одноплодным животным, в связи с чем в течение одного полового цикла лишь на одном яичнике созревает один фолликул, после овуляции формируется одно жёлтое тело. На втором яичнике эти изменения морфологически не заметны и физиологически данный яичник функционирует полноценно, поддерживая нормальный оогенез. В остальных опытных группах этой популяции картина выглядела следующим образом: в лютеиновой стадии – 8,8 %, в фолликулярной – 16,1 %, с кистой – 4,9%, гипофункцией – 0.

Оценку 4 балла больше всего получили ооциты в лютеиновой фазе – 40,2 %, в фолликулярной – 29,6 %, без фолликула и жёлтого тела – 27,4%, с кистами – 20,8 %, гипофункцией – 0.

Ситуация с оценкой в 3 балла сложилась следующим образом: лютеиновая фаза – 38,3 %, фолликулярная – 40,7 %, без фолликула и жёлтого тела – 27,4 %, с кистами – 61,3 %, гипофункцией – 78,5 %, с оценкой

2 балла – 12,7 %, 13,6; 15,5; 13,0 и 21,5 % соответственно.

Большая часть из «утерянных» 194 ооцитов или 19,6 % от общего количества выделенных ооцитов по качеству были на уровне 3 или 2 балла и никак не могли попасть в популяцию ооцитов, пригодных для клеточных репродуктивных технологий.

В среднем в расчёте на один яичник получено 19,9 ооцитов, из них 1,9 имели оценку 5 баллов, 4,5 – 4 балла, 10,6 – 3 балла, 2,9 – 2 балла.

Заключение. Разработаны условия подготовки ооцитов крупного рогатого скота к проведению микроманипуляций вне организма. Предпочтительно использовать яичники в лютеиновой и фолликулярной фазах. Соблюдение условий подготовки ооцитов: культивирование их в течение 22-24 часов в 500 мкл культуральной среды ТС-199 с добавлением 0,02 нг/мл гонадотропин-рилизинг гормона, группами с плотностью посадки 0,04 и 0,05 ооц./мм² с последующей денудацией раствором бычьей гиалуронидазы 80 МЕ/мл в течение 30 сек. позволит получать 2,9 % гамет с оценкой 5 баллов, увеличить после созревания выход гамет с оценкой 4 балла на 8,1-10,7 п. п. до уровня 29,4 % и сохранить на уровне 32,4-32,7 % количество гамет с оценкой 3 балла.

Литература

1. Цитологические, цитогенетические показатели гамет, физиологическое состояние яичников коров и жизнеспособность полученных эмбрионов / В. П. Симоненко [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. – Горки : БГСХА, 2020. – Вып. 23, ч. 1. – С. 13-21.
2. Application of intracytoplasmic sperm injection to the embryo production in aged cows / F. Magata [et al] // J. Vet. Med. Sci. – 2019. – Vol. 81(1). – P. 84–90.
3. Kolbe, T. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) / T. Kolbe, W. Holtz // Animal Reproduction Science. – 2000. – Vol. 64. – P. 97–101.
4. Influence of gamete co-icubation time, sire and special additives on the in vitro fertilization of cumulus-enclosed or denuded buffalo oocytes / M. Gebaly [et al] // Slov. Vet. Res. – 2018. – Vol. 55(20). – P. 313-321.

Поступила 15.03.2022 г.