

стрессустойчивыми) и гену H-FABP (имеют сравнительно высокие показатели по содержанию внутримышечного жира), среднюю – по показателям многоплодия (ген ESR) и низкую – по откормочным качествам (ген IGF-2).

Построение генетических профилей позволит разрабатывать программы отбора и подбора родительских пар с учётом генотипов и аллелей генов-маркеров продуктивных качеств.

Литература

1. Лобан, Н. А. Достижения белорусских селекционеров / Н. А. Лобан, О. Я. Василюк, А. С. Чернов // Животноводство России. – 2008. - № 3. – С. 33-34.
2. Лобан, Н. А. Крупная белая порода свиней – методы совершенствования и использования : монография / Н. А. Лобан. – Минск : ПЧУП Бизнесофсет, 2004. – 110 с.
3. Генетические основы селекции животных / В. Л. Петухов [и др.]. – Москва : Агропромиздат, 1989. – 448 с.
4. Никитченко, И. Н. Гетерозис в свиноводстве / И. Н. Никитченко. – Ленинград : Агропромиздат, 1987. – 215 с.
5. Степанов, В. И. Достижения популяционной генетики – на службу селекционному процессу / В. И. Степанов, В. А. Коваленко, Н. В. Михайлов // Генетика и селекция животных на Дону. – Ростов-на-Дону, 1997. – С. 12-15.

Поступила 2.03.2023 г.

УДК 636.2.034:612.02

Л.В. ГОЛУБЕЦ¹, А.С. ДЕШКО², И.С. КЫССА³, Т.Ю. ДРАГУН²,
М.А. СЕХИНА², Д.Н. ХАРИТОНИК²

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЁМ ТРАСВАГИНАЛЬНОЙ ПУНКЦИИ ФОЛЛИКУЛОВ

¹*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

²*Гродненский государственный аграрный университет,
г. Гродно, Республика Беларусь*

³*ООО «БелСимекс», а.г. Самохваловичи, Беларусь*

Использование трансвагинальной аспирации ооцитов с их последующим оплодотворением и получением таким образом эмбрионов *in vitro* в значительной мере продиктовано потребностью отрасли племенного животноводства в постоянном генетическом совершенствовании крупного рогатого скота молочных и мясных пород. Это направление приобрело ещё большую важность после внедрения геномной селекции. В технологии прижизненного получения эмбрионов коров *in vitro* качественные и количественные показатели исходной

популяции жизнеспособных ооцитов определяют успешный выход бластоцист, пригодных для последующего эмбриотрансфера или криоконсервации. В представленной работе изложены результаты исследований по изучению морфологических особенностей ооцит-кумулясных комплексов, полученных путём трансвагинальной пункции фолликулов. Анализ полученных данных показывает, что при аспирации количество непригодных ооцитов находилось примерно на одном уровне – 5,8 и 8,2 % в контрольной и опытной группе соответственно. Доля ооцитов со слоем кумулюсных клеток от одного до трёх увеличивалась по сравнению с контролем на 27,1 и 17,7 п. п. соответственно, а с многослойным кумулюсом уменьшалась на 47,2 п. п. При этом уровень ооцитов с многослойным плотным кумулюсом снижался на 10,2 п. п., а уровень с многослойным рыхлым кумулюсом увеличивался на 10,2 п. п.

Ключевые слова: OPU, TAO, ооцит, ооцит-кумулясный комплекс, ооплазма, зона пеллюцида, аспирация.

L.V. GOLUBETS¹, A.S. DESHKO², I.S. KYSSA³, T.Y. DRAGUN²,
M.A. SEKHINA², D.N. KHARITONIK²

MORPHOLOGICAL FEATURES OF OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES OBTAINED BY TRANSVAGINAL OOCYTE PICK UP

¹*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

²*Grodno State Agrarian University, Grodno, Republic of Belarus*

³*BelSimex JLLC, Samokhvalovichi agro-town, Republic of Belarus*

The use of transvaginal aspiration of oocytes (TAO) with their subsequent fertilization and thus obtaining embryos *in vitro* is largely dictated by the need of the livestock breeding industry for continuous genetic improvement of dairy and beef cattle. This area has become even more important after the introduction of genomic selection. In the technology of life-time *in vitro* production of bovine embryos, the qualitative and quantitative indicators of the initial population of viable oocytes determine the successful yield of blastocysts suitable for subsequent embryo transfer or cryopreservation. This paper describes the results of studies on the morphological features of oocyte-cumulus complexes obtained by transvaginal oocyte pick up (OPU). Analysis of the data obtained shows that the number of unsuitable oocytes during retrieval was approximately at the same level – 5.8% and 8.2% in the control and experimental groups, respectively. The proportion of oocytes with a layer of cumulus cells from one to three increased compared to the control by 27.1 and 17.7 p.p., respectively, and with a multilayer cumulus decreased by 47.2 p.p. The level of oocytes with a multilayer dense cumulus decreased by 10.2 p.p., and the level with a multilayer loose cumulus increased by 10.2 p.p.

Key words: OPU, TAO, oocyte-cumulus complex, ooplasm, pellucid zone, aspiration.

Введение. Внедрение эмбриональных биотехнологий в практику

животноводства способствует повышению эффективности племенной работы. Прижизненное получение и трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота рассматривается как эффективный метод биотехнологии ускоренного размножения высокопродуктивных самок [1], в котором выделяются два основных эффективных направления – *in vivo* (стимуляция суперовуляции, осеменение, вымывание эмбрионов из рогов матки) и *in vitro* (трансвагинальная аспирация ооцитов, с последующим дозреванием, оплодотворением и культивированием эмбрионов до стадии бластоцисты) Актуальной задачей для обоих направлений является отбор коров-доноров, которые должны соответствовать следующим критериям: иметь высокую племенную ценность, обладать высокой продуктивностью, соответствующей конституцией, способностью к воспроизводству и передаче ценного генотипа максимальному количеству эмбрионов [2, 3, 4].

В период разработки технологии и на первых этапах её внедрения в практику животноводства ооциты получали из яичников, выделенных на конвейере мясокомбинатов или убойных цехов после убоя животного, что являлось серьёзным сдерживающим фактором коммерческого использования разработки и её широкого внедрения в практику селекционно-племенной работы, поскольку дело приходилось иметь с довольно ограниченным количеством доноров и ооцитов: донора можно использовать только один раз и то только после убоя. Поэтому параллельно с развитием и совершенствованием самой технологии велись поиски возможностей получения ооцитов у живых доноров. Поиски завершились разработкой технологии прижизненной аспирации ооцитов, заключающейся в трансвагинальной пункции фолликулов или трансвагинальной аспирации ооцитов – ТАО, по международной классификации Ovum Pick Up (OPU) [5, 6, 7, 8, 9, 10]. Работа проводится с помощью комплекса оборудования, обеспечивающего визуализацию, яичника и его структур, забор ооцитов из фолликулов и их доставку в принимающую ёмкость. С разработкой и коммерциализацией данной технологии получение эмбрионов в культуре *in vitro* стало неотъемлемой частью селекционных программ развития не только молочного, но и мясного скотоводства во всех странах с развитым племенным животноводством [11]. В целях увеличения числа получаемых эмбрионов и потомства на одного донора необходимы исследования, направленные на успешное развитие программ по производству эмбрионов *in vitro*, что в дальнейшем позволит повысить интенсивность селекции для последующих поколений. Сочетание технологии *in vitro* и геномной оценки с использованием сексированной спермы для молодых тёлочек может стать стратегией минимизации времени, необходимого для получения ремонтного молодняка для замены элитных матерей. Число особей для

такой замены увеличивается за счёт повторных вымываний в ходе программ пересадки эмбрионов, полученных в результате инициирования множественной овуляции и использования процедуры ТАО/ОРУ. Кроме того, такое сочетание будет способствовать уменьшению интервала между поколениями, что может дать удвоение темпов генетических улучшений по сравнению с обычными системами тестирования потомства

Одним из основных факторов, определяющих эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro*, является качество получаемых ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) [11, 13, 14], которое в последующем и определяет вопросы количества и качества получаемых эмбрионов на предимплантационных стадиях. В связи с этим одной из задач нашей работы явилось изучение морфофункциональных характеристик ооцитов, полученных путём трансвагинальной пункции фолликулов.

Материалы и методика исследований. Яичники получали на конвейере мясокомбината после убоя животного. После этого они помещались в бытовой термос с физраствором температурой 20-25 °С. После доставки в лабораторию яичники освобождали от жира и соединительной ткани, 2-3 раза промывали солевым раствором Дюльбекко. Выделение ооцитов проводили путём надреза стенки фолликулов стерильным лезвием безопасной бритвы в чашке Петри (Ø90) в среде Дюльбекко с добавлением 1%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 50 ед./мл гентамицина и 1 ед./мл гепарина. Ооциты, полученные после убоя животного, служили контролем. Трансвагинальная пункция фолликулов проводилась с использованием ультразвуковой системы Aloka SSD 500, включающей в себя ультразвуковой сканер Aloka Prosound 2, ультразвуковой излучатель с частотой 7,5 MHz, вакуумную помпу Craft suction unit, держатель ультразвукового излучателя и иглы диаметром 20 g (0,9 мм). Величина вакуума, выраженная в скорости потока жидкости (в нашем случае воды), составляла 25 мл/мин. Локализацию ооцит-кумулюсных комплексов проводили с помощью эмбрионального фильтра EMCON, поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под микроскопом Olympus SZ51 при 16- и 90-кратным увеличением соответственно. Биометрическую обработку полученного цифрового материала проводили общепринятыми методами вариационной статистики с использованием компьютерной техники.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Одним из основных показателей жизнеспособности ооцит-кумулюсных комплексов является наличие и состояние кумулюсных клеток, окружающих ооцит, а также состояние ооплазмы и зоны пеллюцида.

Как было отмечено выше, получение ооцит-кумулюсных комплексов из яичников, полученных на мясокомбинате после убоя животного,

проводилось путём надреза стенок фолликулов лезвием безопасной бритвы. В результате этого ооцит вместе с фолликулярной жидкостью вытекает в чашку Петри. При трансвагинальной аспирации забор ооцита проводится путём прокола стеки фолликула иглой с последующим отсасыванием фолликулярной жидкости вместе с ооцитом с помощью вакуумного насоса. Таким образом, в первом случае клетка выходит из фолликула самотоком, во втором клетка забирается принудительно, с усилием, создаваемым вакуумным насосом. Далее клетка, прежде чем попасть в приёмную ёмкость, проходит через трубку, соединяющую иглу с приёмной пробиркой. Таким образом, с одной стороны усилия, создаваемое вакуумом, а с другой – движение по трубке в потоке жидкости могут стать причиной различного рода повреждений клеток кумулюса, окружающих клетку и обеспечивающих её жизнеспособность. Жизнеспособный ооцит-кумуляный комплекс отличного качества представляет собой комплекс наличием не менее трёх слоёв кумулюсных клеток, плотно окружающих ооцит, тёмную, мелкозернистую, равномерно расположенную ооплазму с округлой аппалесцирующей, без каких-либо повреждений, равномерную по толщине зону пеллюцида. Любые отклонения от этой норы снижают качественную оценку её жизнеспособности. Сравнительная характеристика ооцит-кумуляных комплексов представлена в таблицах 1-3.

Как показывает анализ материалов, представленных в таблице 1, количество непригодных ооцитов (без кумулюса) находилось примерно на одном уровне (5,8 и 8,2 %) в контрольной и опытной группе соответственно. Доля ооцитов с одним слоем кумулюсных клеток увеличивалась по сравнению с контролем на 27,1 п. п., с 2-3 слоями на 17,7 п. п., а с многослойным кумулюсом уменьшалась на 47,2 п. п. При этом уровень ооцитов с многослойным плотным кумулюсом снижался на 10,2 п. п., а уровень с многослойным рыхлым кумулюсом увеличивался на 10,2 п. п.

Таблица 1 – Характеристика ОКК по состоянию кумулюса

Показатели		Контроль, n-%	Опыт, n-%
Получено ооцитов, всего		121	73
из них	ооциты без кумулюса	7-5,8	6-8,2
	1 слой кумулюсных клеток	12-9,9	27-37,0
	2-3 слоя кумулюсных клеток	25-20,7	28-38,4
	многослойный кумулюс	77-63,6	12-16,4
в том числе	плотный кумулюс	40-51,9	5-41,7
	Рыхлый кумулюс	37-48,1	7-58,3

Ооциты отличного качества имеют тёмную, плотную, мелкозернистую, равномерно распределенную по зоне пеллюцида ооплазму.

Любые отклонения от данной нормы снижают их качественные характеристики от оценки хорошо до непригодных для дальнейшего использования, в зависимости от характера недостатков. Анализ качественных показателей ооплазмы (таблица 2) показал, что если при аспирации количество ооцитов отличного качества с плотной, тёмной, мелкозернистой, равномерно распределенной ооплазмой и удовлетворительного с тёмной, фрагментированной ооплазмой было несколько выше у ооцитов, полученных после аспирации (52,0 против 47,1 % и 35,6 против 27,3 %), то ооцитов с ооплазмой плохого качества (светлая, равномерно распределённая или фрагментированная ооплазма) было больше в группе клеток, полученных из яичников, полученных с мяскокомбината после убоя животного: 19,0 против 12,3 % и 6,6 против 4,1 % соответственно.

Таблица 2 – Характеристика ОКК по состоянию ооплазмы

Показатели		Контроль, п-%	Опыт, п-%
Получено ооцитов, всего		121	73
в том числе	с плотной, темной, мелкозернистой равномерно распределенной ооплазмой	57-47,1	38-52,0
	с темной, фрагментированной ооплазмой	33-27,3	26-35,6
	со светлой, мелкозернистой, равномерно распределённой ооплазмой	23-19,0	9-12,3
	со светлой фрагментированной ооплазмой	8-6,6	3-4,1

По состоянию зоны пеллюцида каких-либо отклонений о нормы ни в одной из групп не наблюдалось (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика ооцитов по состоянию зоны пеллюцида

Показатели		Контроль, п-%	ТАО, п-%
Получено ооцитов всего		121	73
в том числе	со светлой, равномерной по толщине зоной пеллюцида	121-100	73-100
	с наличием микроповреждений	-	-

Заключение. Таким образом, при аспирации ооцитов увеличивалось количество ооцит-кумулюсных комплексов с 1-3 слоями кумулюса, а также ооцитов с рыхлым кумулюсом на 27,1 и 17,7 п. п. на 10,2 п. п. соответственно и уменьшалось число клеток с плотным кумулюсом на 10,2 п. п. По состоянию ооплазмы отмечается более высокая доля ооцитов с темной фрагментированной ооплазмой (на 8,3 п. п.) и ооцитов с ооплазмой отличного качества (на 4,9 п. п.), среди клеток, полученных от животных после аспирации, по сравнению с животными

после их убоя на мясокомбинате и более низкая доля ооцитов с ооплазмой неудовлетворительного качества.

Литература

1. Кысса, И. С. Ускоренное воспроизводство высокопродуктивных племенных животных в молочном и мясном скотоводстве на основе новых биотехнологических методов : автореф. дисс. ... д-ра биол. наук / Кысса И.С. – Дубровицы, 2000. – 42 с.
2. Эффективность получения ооцитов методом трансвагинальной аспирации у коров-доноров / В. К. Пестис [и др.] // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. – Гродно : ГГАУ, 2014. – Т. 26 : Зоотехния. – С. 218-225.
3. Карымсаков, Т. Н. Сравнительные результаты приживляемости сексированных эмбрионов, полученные методами *in vivo* и *in vitro* / Т. Н. Карымсаков, Д. М. Бекенов, А. А. Спанов // Молочное и мясное скотоводство. – 2017. – № 6. – С. 9–11.
5. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows / S. R. Ashimoto [et al.] // Theriogenology. – 1919. – Vol. 51. – P. 757-765.
5. Bilodeau-Goeseels, S. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos / S. Bilodeau-Goeseels, P. Panich // Anim. Reprod. Sci. – 2002. – Vol. 71. – P. 143-155.
6. Blondin, P. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes / P. Blondin, M. A. Sirard // Mol. Reprod. Dev. – 1995. – Vol. 41. – P. 54-62.
7. 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.
8. Callesen, H. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes / H. Callesen, T. Greve, F. Christensen // Theriogenology. – 1987. – Vol. 27. – P. 217.
9. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes / M. C. Pieters [et al.] // Theriogenology. – 1991. – Vol. 35. – P. 857–862.
9. Embryo production by ovum pick up from live donors / C. Galli [et al.] // Theriogenology. – 2001. – Vol. 55. – P. 1341-1357.
10. *In vitro* developmental competence of embryos derived from transvaginal ultrasound oocyte aspiration in cycling cows and from slaughterhouse ovaries / I. Gerz [et al.] // ESDAR Newsletter 6: Proceedings of the 5th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. 13-15. September, 2001, Vienna, p. 27.
11. Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos : monography / I. Gordon. – Dublin, 2003. – 548 p.
12. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryotechnologies in the cattle breeding industry / J. S. Merton [et al.] // Theriogenology. – 2003. – Vol. 59. – P. 651-674.
13. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries / M. C. Pieterse [et al.] // Theriogenology. – 1988. – Vol. 30. – P. 751-762.

Поступила 9.03.2023 г.