

0531.2012.02067.x.

8. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement / M. G. Diskin [et al.] // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2016. – Vol. 28. – P. 83–93. – DOI: 10.1071/RD15366.

9. Hasler, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle / J. F. Hasler // *Theriogenology*. – 2001. – Vol. 56(9). – P. 1401-1415. – DOI: 10.1016/s0093-691x(01)00643-4.

10. Effect of donor - embryo-recipient interactions on pregnancy rate in large-scale bovine embryo transfer program / J. F. Hasler [et al.] // *Theriogenology*. – 1987. – Vol. 27. – P. 139-168. – DOI:10.1016/0093-691X(87)90075-6

11. Chebel, R. C. Metzger Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds / R. C. Chebel, D. G. B. Demétrio, J. Metzger // *Theriogenology*. – 2008. – Vol. 69. – P. 98-106. – DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.008.

12. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows / V. Maillou [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2012. – Vol. 95. – P. 3865-3876. – DOI: 10.3168/jds.2011-5270.

Поступила 19.02.2024 г.

УДК 636.2.034:612.02

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

РАЗВИТИЕ ЯЙЦЕКЛЕТОК КОРОВ ПОСЛЕ ПРОЦЕДУРЫ ИКСИ

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

Метод ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) – важный этап вспомогательной репродуктивной технологии для преодоления тех или иных причин бесплодия. Однако эффективность этой методики на сельскохозяйственных животных, в частности коров, остаётся низкой. В этой связи изучение способности яйцеклеток коров к дальнейшему развитию после процедуры ИКСИ актуально. Входе исследований установлено, что жизнеспособность клеток после проведения процедуры микроинъекции спермия обеспечивается введением сперматозоида непосредственно в оолему яйцеклетки с положением первого полярного тельца на 6 или 12 часов. Аспирация в микроиглу производится головкой вперед, а значит транспортировка в оолему после перфорации оболочки хвостовой частью мужской гаметы. Угол изгиба микропипетки в дистальной её части должен составлять 25-30 °. В целом из 52 яйцеклеток в опыте получено 6 дробящихся клеток, что составило 11,5 % от всех результатов микроинъекций. Соблюдение указанных технических параметров процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов позволяет

сохранить жизнеспособность 19,2% прооперированных яйцеклеток, обладающих потенцией к оплодотворению и последующему дроблению.

Ключевые слова: ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида), микроигла, микроприсоска, микроманипулятор, микроинъекция, яйцеклетка, спермий, оплодотворение, дробление.

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

DEVELOPMENTAL POTENCY OF COW OOCYTES AFTER ICSI PROCEDURE

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

ICSI (intracytoplasmic sperm injection) is an important step in assisted reproductive technology to overcome the causes of infertility. However, the effectiveness of this technique on farm animals, particularly cows, remains low. In this regard, the study of developmental potency of cow oocytes after the ICSI procedure is relevant. Studies have revealed that cell viability after sperm microinjection procedure is ensured by injection of sperm directly into the oolemma of the oocyte with the position of the first polar body at 6 or 12 o'clock. Aspiration into the microneedle is performed with the head forward, hence transportation to the oolemma after perforation of the membrane is performed with the tail part of the male gamete. The bending angle of the micropipette in its distal part should be 25-30°. A total of 6 dividing cells were obtained from 52 oocytes in the experiment, representing 11.5% of all successful microinjections. Compliance with the specified technical parameters of the procedure of intracytoplasmic sperm injection allows preserving the viability of 19.2% of the operated oocytes with the potency for fertilization and subsequent division.

Keywords: ICSI (intracytoplasmic sperm injection), microneedle, microsuction cup, micromanipulator, microinjection, oocyte, sperm, fertilization, division.

Введение. Первое сообщение о формировании пронуклеусов после ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) у млекопитающих получено в гаметях хомяков [1]. В 1992 году родился первый ребёнок, зачатый путём инъекции спермия в яйцеклетку [2]. С тех пор метод ИКСИ стал важным этапом вспомогательной репродуктивной технологии человека во всём мире для преодоления тех или иных причин бесплодия. После этого достижения метод ИКСИ начали использовать на других видах млекопитающих [3, 4, 5], включая крупный рогатый скот [4]. Однако, несмотря на усилия многих учёных по всему миру, эффективность этой методики на сельскохозяйственных животных остаётся низкой. Наименьшая степень оплодотворения после

процедуры ИКСИ была достигнута у коров по сравнению с другими видами сельскохозяйственных животных [6, 7]. Рядом учёных удалось достигнуть улучшения показателей оплодотворения после ИКСИ различными методами искусственной активации, как яйцеклеток, так и спермиев, но при этом уровень развития эмбрионов до преимплантационных стадий остался критически низким [8, 9]. Таким образом, важно определить критические моменты самой процедуры ИКСИ, условия и параметры активации половых клеток для улучшения показателей созревания ооцитов, их оплодотворения и дальнейшего развития. Также важно определить влияние отдельных условий и элементов выполнения процедуры на её эффективность.

В этой связи цель работы заключалась в изучении способности яйцеклеток коров к дальнейшему развитию после процедуры 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 2023 году.

Отбор ооцитов и сперматозоидов крупного рогатого скота для интрацитоплазматической инъекции проводили согласно разработанным нами критериям [10, 11]. В микроиглу, соединённую с микроманипулятором, через держатель помещали спермий. Инъекционную иглу, несущую сперматозоид, располагали в поле зрения инвертированного микроскопа напротив микроприсоски в положении 3 часов. Яйцеклетку фиксировали микроприсоской в капле среды под микроскопом. Инструмент, контактирующий с яйцеклеткой, располагали в положении 9 часов. Вводили сперматозоид в цитоплазму или под оболочку яйцеклетки с наличием полярного тела на 6 или 12 часов, после чего микроиглу убиралась, а яйцеклетка в среде для культивирования помещалась в CO₂-инкубатор. Эффективность проведенной процедуры определяли по наличию перетяжки или двух и более бластомеров.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Всего проведено 46 попыток микроинъекций, из них 33 технически результативных операций по пересадке спермия в яйцеклетку (таблица 1). Остальные операции оказались неэффективными, в процессе выполнения перфорации оболочки произошло её повреждение и вытекание ооплазмы в культуральную среду.

Пересадка спермия под оболочку в перивителлиновое пространство произведена 15 яйцеклеткам, а в центральную часть оолеммы через прокол оболочки – 18. Известно, что результативность интрацитоплазматической инъекции зависит от положения первого полярного тельца относительно оси координат. Нами проведены инъекции с положением

полярного тельца на 6 часов у 13 яйцеклеток, из них под оболочку – у 6 и в ооплазму – у 7 клеток. Проведено 20 инъекций в положении полярного тела на 12 часов, из них 9 – под оболочку и 11 – непосредственно в центр ооплазмы.

Таблица 1 – Количество проведенных операций в зависимости от места введения спермия в яйцеклетку

Под оболочку, n		В цитоплазму, n	
полярное тело на 6 ч	полярное тело на 12 ч	полярное тело на 6 ч	полярное тело на 12 ч
6	9	7	11

В ходе проведения исследований учитывали количество выполненных аспираций в зависимости от расположения спермия в микроигле и, как следствие, в зависимости от того, какой частью спермий принудительно внедряется в яйцеклетку (таблица 2).

Таблица 2 – Количество проведенных операций в зависимости от пространственного расположения спермия в микроигле

Под оболочку, n		В цитоплазму, n	
аспирация хвостом	аспирация головкой	аспирация хвостом	аспирация головкой
10	5	8	10

После перфорации оболочки перемещение спермия в яйцеклетку провели головкой вперед, т. е. аспирировали эти гаметы, наоборот хвостовой частью вперед у 18 клеток, из них у 10 клеток – под оболочку и у 8 клеток – в цитоплазму. Аспирация головкой вперед, а, соответственно, транспортировка в оолемму хвостовой частью проведена у 15 яйцеклеток, 5 клеткам произведена инъекция сперматозоида под оболочку клетки и 10 яйцеклеткам вглубь цитоплазмы.

Несмотря на простую суть ИКСИ, тонкости технологии очень сложны. Например, среди технологических особенностей принципиальное значение имеет внешний и внутренний диаметр пипеток, и даже такой, казалось бы, неощутимый фактор, как угол изгиба микропипеток в её дистальной части. Для проведения технических манипуляций в процедуре ИКСИ, как говорилось выше, применяли 2 типа микроинструментов: фиксационную пипетку, которая используется для удержания ооцита в нужном положении во время проведения процедуры ИКСИ (внешний диаметр фиксационной пипетки составляет 75-150 мкм, внутренний диаметр – 15-25 мкм) и инъекционную микропипетку/иглу – применяется для аспирации и инъекции сперматозоида (внешний

диаметр иглы составляет 7-8 мкм, внутренний диаметр – 5-5,5 мкм). Оба типа микроинструментов были изогнуты под углом, который составлял от 20 до 35 градусов в дистальном конце.

Нами проведён анализ жизнеспособности яйцеклеток после процедуры ИКСИ. После выполнения инъекции сперматозоида в яйцеклетку женские гаметы помещали в среду для культивирования зародышей в условиях CO₂-инкубатора. Через 20-24 часа после оплодотворения осуществляли контроль эффективности произведенной процедуры. В таблице 3 приведены данные по жизнеспособности прооперированных яйцеклеток в зависимости от места введения спермия в зрелый ооцит (под оболочку или непосредственно в цитоплазму) и в зависимости от положения первого полярного тела в перивителлиновом пространстве (на 6 или 12 часов).

Таблица 3 – Жизнеспособность проинъецированных яйцеклеток в зависимости от места расположения спермия в клетке после инъекции и положения первого полярного тела в перивителлиновом пространстве

Под оболочку				В цитоплазму			
полярное тело на 6 ч		полярное тело на 12 ч		полярное тело на 6 ч		полярное тело на 12 ч	
инъ- ециро- ван- ных кле- ток, n	дробя- щихся кле- ток, n-%						
9	-	15	1-6,7	10	2-20,0	18	3-16,7

Всего проведены 52 технически результативные операции по пересадке спермия в яйцеклетку. Пересадка спермия под оболочку в перивителлиновое пространство произведена 24 зрелым ооцитам, а в центральную часть оолеммы через прокол оболочки – 28 клеткам. Проведены инъекции в положении полярного тельца на 6 часов 19 яйцеклеткам, из них под оболочку – у 9 и в ооплазму – у 10 клеток. Проведены 33 инъекции в положении полярного тела на 12 часов, из них 15 – под оболочку и 18 – непосредственно в центр ооплазмы. Дробящихся клеток после инъекции спермия под оболочку с полярным телом на 6 часов не было получено, а под оболочку с полярным телом на 12 часов составило 6,7 %. Инъекция спермиев в ооплазму яйцеклеток, которые имели полярное тело на 6 часов, позволила получить 20,0 % дробящихся клеток, а с полярным телом на 12 часов – 16,7 % подробившихся клеток. Всего после инъекции под оболочку подробилось 4,2 % яйцеклеток, после

проведения процедуры ИКСИ в ооплазму – 19,2 % зрелых ооцитов. В целом из 52 яйцеклеток в опыте получено 6 дробящихся клеток, что составило 11,5 % от всех результативных микроинъекций. Представленный результат с учётом эксперимента на начальном этапе можно считать вполне удовлетворительным, хотя необходимо продолжение исследований по изучению дальнейшего развития зародышей до преимплантационных стадий, их имплантации и постимплантационного развития.

Учитывали также количество жизнеспособных зародышей после выполненных аспираций в зависимости от расположения спермия в микропипетке/игле и, как следствие, в зависимости от того, какой частью спермий принудительно внедряется в яйцеклетку (таблица 4). Жизнеспособность проинъецированных яйцеклеток определяли, как говорилось выше, по количеству дробящихся клеток.

Таблица 4 – Жизнеспособность проинъецированных яйцеклеток в зависимости от пространственного расположения спермия в микроигле

Под оболочку				В цитоплазму			
аспирация хвостом		аспирация головкой		аспирация хвостом		аспирация головкой	
инъецированных клеток, п	дробящихся клеток, п-%						
11	-	13	1-7,7	12	1-8,3	16	4-25,0

После перфорации оболочки перемещение спермия в яйцеклетку провели головкой вперед, т. е. аспирировали эти гаметы в микропипетку наоборот хвостовой частью вперед у 23 клеток, из них у 11 клеток под оболочку и у 12 клеток – в цитоплазму. Лишь у одной клетки замечена перетяжка после аспирации вглубь цитоплазмы, что составило 8,3 % в этой группе из 12 гамет или 4,3 % в группе яйцеклеток аспирированных хвостовой частью. Дробления после аспирации под оболочку яйцеклетки хвостовой частью не наблюдалось. Аспирация головкой вперед в микропипетку/иглу, а, соответственно, транспортировка в оолемму хвостовой частью проведена 29 яйцеклеткам. Инъекция сперматозоида под оболочку клетки произведена 13 яйцеклеткам и 16 клеткам вглубь цитоплазмы, из них 5 подробилось, что составило 17,2 %: 7,7 % после аспирации под оболочку клетки и 25 % после аспирации в оолемму.

Немаловажное влияние на эффективность производимых

манипуляций с гаметами оказывают технические характеристики используемых микроинструментов. К техническим характеристикам микропипеток относятся материал, из которого они изготовлены, внутренний и внешний диаметр, угол изгиба в дистальном конце. Необходимо отметить, что угол изгиба дистального конца микроприсоски составил во всех процедурах 25°. А критерием оценки эффективности на начальном этапе разработки технологии, как указывалось выше, является уровень дробления аспирированных яйцеклеток вне организма. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Количество проведённых операций в зависимости от угла изгиба микропипетки в дистальном конце

Под оболочку, n				В цитоплазму, n			
угол изгиба микропипетки (°)							
20	25	30	35	20	25	30	35
4	6	8	6	5	7	5	9

Под оболочку яйцеклетки произведены инъекции спермиев микроиглами с разными углами изгиба: 20, 25, 30, 35° в количестве 4, 6, 8 и 6 инъекций соответственно. Следует отметить, что лишь одна микрооперация оказалась успешной, что характеризовалось началом дробления. При этом угол изгиба составил 30°. Непосредственно в цитоплазму яйцеклетки произведено 26 инъекций спермиев: 5, 7, 5 и 9 введений. Инъекции проведены при использовании углов изгиба кончика микроиглы 20, 25, 30, 35° соответственно. В данной серии опытов успешными оказались 5 микроинъекций: 3 с углом изгиба 25° и 2 с углом изгиба кончика пипетки 30°.

Проведён анализ жизнеспособности яйцеклеток коров после проведения процедуры ИКСИ в зависимости от угла изгиба микропипетки в дистальном конце. Дробящихся клеток после инъекции спермия под оболочку с полярным телом на 6 часов не было получено, а под оболочку с полярным телом на 12 часов составило 6,7%. Инъекция спермиев в ооплазму яйцеклеток, которые имели полярное тело на 6 часов, позволила получить 20,0% дробящихся клеток, а с полярным телом на 12 часов – 16,7% подробившихся клеток. Всего после инъекции под оболочку подробилось 4,2% зрелых ооцитов, после проведения процедуры ИКСИ в ооплазму – 19,2% зрелых ооцитов. В целом из 52 яйцеклеток в опыте получено 6 дробящихся клеток, что составило 11,5% от всех результирующих микроинъекций. Аспирация головкой вперёд в микропипетку/иглу, а, соответственно, транспортировка в оолемму после перфорации оболочки хвостовой частью оказалась наиболее

результативной. Инъекция сперматозоида под оболочку клетки произведена 13 яйцеклеткам и 16 – вглубь цитоплазмы, из них 5 подробилось, что составило 17,2 %: 7,7 % после аспирации под оболочку клетки и 25 % после аспирации в оолему. Непосредственно в цитоплазму яйцеклетки произведено 26 инъекций спермиев с углом изгиба кончика микропипетки 20, 25, 30, 35 °. В данной серии опытов успешными оказались 5 микроинъекций (19,2 %): 3 с углом изгиба 25 ° и 2 с углом изгиба кончика пипетки 30 °.

Заключение. Таким образом, жизнеспособность клеток после проведения процедуры микроинъекции спермия обеспечивается введением сперматозоида непосредственно в оолему яйцеклетки с положением первого полярного тельца на 6 или 12 часов. Аспирация в микроиглу производится головкой вперед, а, соответственно, транспортировка в оолему после перфорации оболочки хвостовой частью мужской гаметы. Угол изгиба микропипетки в дистальной её части должен составлять 25-30 °. В целом из 52 яйцеклеток в опыте получено 6 дробящихся клеток, что составило 11,5 % от всех результативных микроинъекций. Соблюдение указанных технических параметров процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов позволяет сохранить жизнеспособность 19,2 % прооперированных яйцеклеток, обладающих потенцией к оплодотворению и последующему дроблению.

Литература

1. Can apoptosis and necrosis coexist in ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection? / M. Fraczek [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2015. – Vol. 32, № 5. – P. 771-779. – DOI: 10.1007/s10815-015-0462-x.–2015.
2. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / В. В. Долгов [и др.]. – Москва-Тверь, 2006. – 145 с.
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(1-2). – P. 97–101. – DOI: 10.1016/s0378-4320(00)00204-9.
4. Fauvel, C. Evaluation of fish sperm quality / C. Fauvel, M. Suquet, J. Cosson // *Journal of Applied Ichthyology*. – 2010. – Vol. 26(5). – P. 636–643. – DOI: **10.1111/J.1439-0426.2010.01529.X**
5. Uehara, T. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei / T. Uehara, R. Yanagimachi // *Biology of Reproduction*. – 1976. – Vol. 15. – P. 467–470. – DOI: 10.1095/biolreprod15.4.467.
6. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte / G. Palermo [et al] // *Lancet*. – 1992. – Vol. 340. – P. 17–18. – DOI: 10.1016/0140-6736(92)92425-f.
7. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa / K. Goto [et al.] // *Veterinary Research*. – 1990. – Vol. 139. – P. 494–495.
8. 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. – DOI: 10.1016/s0378-4320(00)00204-9.
9. The in vitro and in vivo development of goat embryos produced by intracytoplasmic

sperm injection using tail-cut spermatozoa / B. Wang [et al] // *Zygote*. – 2003. – Vol. 11. – P. 219–227. – DOI: 10.1017/s0967199403002260.

10. Условия подготовки ооцитов крупного рогатого скота к проведению микроманипуляций вне организма / А. И. Ганджа [и др.] // *Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2022. – Т. 57, ч. 1 : Генетика, разведение, селекция, биотехнология разведения и воспроизводство. Технология кормов и кормления, продуктивность. – С. 60-68. – DOI: 10.47612/0134-9732-2022-57-1-60-68.*

11. Условия подготовки сперматозоидов быков для проведения интрацитоплазматической инъекции / Л. Л. Леткевич [и др.] // *Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2023. – Т. 58, ч. 1 : Генетика, разведение, селекция, биотехнология разведения и воспроизводство. Технология кормов и кормления, продуктивность. – С. 102-110.*

Поступила 8.02.2024 г.

УДК 636.4.082.12:004

К.В. НЕВАР

БИОМЕТРИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СЕЛЕКЦИОНИРУЕМЫХ ПРИЗНАКОВ ПОПУЛЯЦИИ ПЛЕМЕННЫХ СВИНЕЙ

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

В статье представлены материалы исследований, целью которых было разработать биометрические модели и провести расчёт селекционно-генетических параметров селекционируемых признаков популяции племенных свиней. На основании дисперсионного анализа системных факторов среды разработаны оптимальные уравнения прогноза (биометрические модели) развития селекционируемых признаков племенных свиней. В ходе дисперсионного анализа фиксированных факторов репродуктивных признаков свиноматок материнских пород установлено, что средние значения всех признаков в разрезе факторов имели значительные различия по всем исследуемым вариантам моделей. На основе разработанных оптимальных статистических моделей, описывающих развитие селекционируемых признаков, определены компоненты общей дисперсии, а также наследуемая (аддитивная) генетическая часть общей фенотипической изменчивости – коэффициенты наследуемости.

Ключевые слова: дисперсионный анализ, племенная ценность, биометрические модели, BLUP, племенное свиноводство.