

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, А.И. ГАНДЖА, И.В. КОСТИКОВА, Е.Д. РАКОВИЧ

СОСТОЯНИЕ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ ВЫБРАКОВАННЫХ КОРОВ И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ОПЛОДОТВОРЕНИЮ ВНЕ ОРГАНИЗМА

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

Введение. Потенциальный запас ооцитов в яичниках коровы составляет несколько сот тысяч, однако за свою жизнь высокопродуктивные животные приносят 2-4 теленка. В течение жизни огромная часть ооцитов подвергается атрезии и в воспроизводстве не участвует. Суперовуляцией можно лишь частично повысить реализацию генетического потенциала и получить от коровы дополнительное потомство. Идеальным способом использования нереализованного запаса яйцеклеток является культивирование ооцитов вне организма. В настоящее время разработаны методы, позволяющие выделить из яичников убитой коровы до 100 ооцитов, культивировать их и оплодотворять *in vitro* [1, 2]. Однако выход эмбрионов на преимплантационных стадиях развития остается крайне низким [2, 3]. Основной причиной этого является несоответствие условий созревания клеток вне организма естественным условиям материнского организма, что приводит к остановке развития зародышей на стадии 8-16 клеток, их дегенерации и гибели [4, 5]. Кроме того, ооциты, извлеченные из фолликулов, находятся на разных стадиях развития. По морфологическим признакам не всегда видно биологическая полноценность клеток, поскольку морфологические изменения наступают значительно позже функциональных. Для успешного культивирования ооцитов и дробящихся зародышей необходима оценка морфофункционального состояния яичников и их связи с выходом ооцит-кумулусных комплексов (ОКК), цитогенетических характеристик ооцитов, определение оптимальных условий культивирования ооцитов и ранних зародышей вне организма [6, 7].

Целью работы стало изучение состояния извлеченных ооцит-кумулусных комплексов из яичников выбракованных высокопродуктивных коров и их способности к оплодотворению вне организма.

Материал и методы исследований. Исследования проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Объектом исследований служили яичники, ооциты крупного рогатого скота и эмбрионы на ранних преимплантационных ста-

диях развития, полученные вне организма. В качестве доноров яичников использовались высокопродуктивные коровы (6 тыс. кг молока за лактацию и выше), выбракованные по различным причинам и поступившие на мясокомбинат. Яичники получали на Минском мясокомбинате, а также в убойном цехе РУП «Экспериментальной базы «Жодино».

Изучали морфологические характеристики ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) высокопродуктивных коров в зависимости от морфофункционального состояния яичников и их связь с оплодотворяемостью вне организма. Яичники разделили на группы: 1) яичники в лютеиновой стадии полового цикла; 2) в фолликулярной стадии; 3) яичники без крупного фолликула и желтого тела; 4) от стельных коров; 5) телочек в 12 месяцев; 6) яичники с гипофункцией; 7) со свежей овуляцией. Учитывали количество извлеченных ооцитов из каждого яичника индивидуально. Выделение ооцитов проводили путем надрезания стенок фолликулов. Цитогенетическую характеристику ооцитов изучали по методу А.К. Тарковского (1966 г.).

Результаты эксперимента и их обсуждение. В каждом яичнике находятся фолликулы на различных стадиях фолликулярного роста, визуально отличающиеся размерами. В технологии получения ранних зародышей вне организма оптимальным является диаметр антральных фолликулов 3-6 мм [6]. Как правило, в таких фолликулах находятся ооциты, способные возобновлять мейоз в искусственных условиях и после оплодотворения достигать стадии морула-бластоциста. Нами изучена связь между количеством фолликулов и морфофункциональным состоянием яичников выбракованных коров (табл. 1). Всего исследовано 36 яичников. В каждой группе визуально учитывали три стадии развития антральных фолликулов и сравнивали группы между собой по размерам диаметра фолликулов в миллиметрах: 1) 10-20 мм; 2) 3-6 мм; 3) < 3 мм.

Таблица 1 – Связь между количеством фолликулов и морфофункциональным состоянием яичников

Морфофункциональное состояние яичников	Размер фолликулов, мм	Количество фолликулов		В среднем на один яичник, $M \pm m$
		n	%	
1	2	3	4	5
Лютеиновая стадия n = 8	10 и более	4	2,7	0,5±0,2
	3 – 6	35	24	4,37±1,1**
	< 3	107	73,3	13,75±2,8**
	Всего	146	100	18,25±2,2
Фолликулярная стадия n = 10	10 и более	15	5,8	1,5±0,2**
	3 – 6	96	37,4	9,6±1,5***

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
	< 3	146	56,8	14,6±1,4**
	Всего	257	100	25,7±2,2
Яичники без крупного фолликула и желтого тела n = 4	10 и более	—	—	—
	3–6	13	16,9	3,25±2,6
	< 3	64	83,1	16,0±2,9**
	Всего	77	100	19,25±4,6
Яичники от стельных коров n = 5	10 и более	—	—	—
	3–6	2	1,3	0,4±0,4
	< 3	157	98,7	31,4±0,8**
	Всего	159	100	31,8±7,7
Телочки 12 мес. n = 2	10 и более	—	—	—
	3–6	1	2,5	0,5±0,5
	< 3	40	97,5	20,0±10,0
	Всего	41	100	20,5±9,5
Гипофункция n = 4	10 и более	—	—	—
	3–6	—	—	—
	< 3	62	100	15,5±2,6**
	Всего	62	100	15,5±2,6
Свежая овуляция n = 3	10 и более	2	6,1	0,6±0,3
	3–6	11	33,3	3,6±3,2
	< 3	20	60,6	6,6±1,3
	Всего	33	100	11,0±4,1

Примечание: здесь и далее: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,01

В количественном отношении в среднем на один яичник больше всего фолликулов насчитывалось в яичниках стельных коров – 31,8, однако 98,7 % из них имели диаметр менее 3 мм, почти такое же количество указанных фолликулов (97,5 %) отмечено в яичниках телочек до 12 месяцев. Меньше всего фолликулов на одном яичнике (11,0) отмечено в яичниках со следами свежей овуляции, из них 33,3 % – диаметром 3-6 мм. В гонадах коров на лютеиновой и фолликулярной стадии насчитывалось 24,0 (P<0,01) и 37,4 % (P<0,001) фолликулов с диаметром 3-6 мм.

Состояние выделенных ОКК оценивали по пятибалльной шкале, учитывая структуру кумулюса, его многослойность, компактность, состояние ооциты, целостность и форму оболочки. Проведен сравнительный морфологический анализ ОКК между группами яичников с различным функциональным состоянием (табл. 2).

Количество ооцитов с оценкой в 5 баллов колебалось от 0 до 35,1 % в группах; в 4 балла – от 0 до 49,1 %; в 3 балла – от 24,2 до 79,2 %; 2 балла – от 0 до 20,8 %. В среднем на 1 яичник получено 24,2 ОКК, из

них 4,2 – отличных, 8,3 – хороших, 8,6 – удовлетворительных, 3,1 – неудовлетворительных.

Таблица 2 – Зависимость качества ооцит-кумулюсных комплексов от морфофункционального состояния яичников

Морфофункциональное состояние яичников	Оценка, баллы	Количество ооцитов		В среднем на один яичник, М±m
		п	%	
Лютеиновая стадия, n = 8	5	24	10,3	3,0±1,0
	4	89	38,9	11,1±4,3
1	2	3	4	5
	3	86	37,6	10,7±2,5
	2	30	13,2	3,7±1,4
	Всего	229	100	28,6±6,7
Фолликулярная стадия n = 10	5	52	17,3	5,2±1,5
	4	85	28,3	8,5±2,1
	3	116	38,5	11,6±3,0
	2	48	15,9	4,8±1,4*
	Всего	301	100	30,1±4,0
Яичники без крупного фолликула и желтого тела n = 4	5	34	35,1	8,5±3,6
	4	22	22,7	5,5±1,8
	3	26	26,8	6,5±2,2
	2	15	15,4	3,7±3,1
	Всего	97	100	24,2±5,6
Яичники от стельных коров n = 5	5	27	16,4	5,4±1,9
	4	81	49,1	16,2±6,5
	3	40	24,2	8,0±3,7
	2	17	10,3	3,4±2,9
	Всего	165	100	33,0±8,4
Телочки 12 мес. n = 2	5	–	–	–
	4	25	55,6	12,5±2,5*
	3	20	44,4	10,0±0,9*
	2	–	–	–
	Всего	45	100	22,5±2,5
Гипофункция n = 4	5	–	–	–
	4	–	–	–
	3	38	79,2	9,5±2,2
	2	10	20,8	2,5±2,5
	Всего	48	100	12,0±3,9
Свежая овуляция n = 3	5	22	40,0	7,3±2,6
	4	14	25,5	4,6±1,8
	3	17	30,9	5,6±1,8
	2	2	3,6	0,8±0,4
	Всего	55	100	18,3±6,6

В лютеиновой стадии полового цикла процент ооцитов, пригодных к культивированию вне организма (4 и 5 баллов), составил 49,2 %; в фолликулярной – 45,6 %; из яичников без крупного фолликула и желтого тела – 57,8 %; от стельных коров – 65,5 %; от телочек в 12 месяцев – 55,6 %; со следами свежей овуляции фолликула – 65,5 %. От коров с гипофункцией хороших клеток не выделено.

Изучена зависимость оплодотворяемости ооцитов вне организма от морфологического состояния выделенных ОКК. Сравнивали между собой ОКК трех групп яичников: I группа (n = 5) – при культивировании получены эмбрионы на стадии Мо – ВI; II группа (n = 12) – после оплодотворения получены дробящиеся клетки не достигшие стадии ранней Мо; III группа (n = 4) – не получено дробящихся клеток (табл. 3).

Таблица 3 – Зависимость оплодотворяемости ооцитов вне организма от состояния ооцит-кумулюсных комплексов

Группы яичников	Состояние ОКК, баллы	Количество ооцитов, n - %	M±m	Оплодотворено, M±m	Уровень дробления, n - %	Выход морул-бластоцист n - %
I n=5	5	40 – 29,6	8,0±1,5**	22,0±3,4** *	11,2±2,3 – 49,6±5,3	3,4±0,9 – 16,4±4,8
	4	41 – 30,4	8,2±2,4			
	3	47 – 34,8	9,4±1,4			
	2	7 – 5,2	1,4±1,0			
	Всего	135 – 100		110	56–50,9	17–15,5
II n=12	5	30 – 9,1	2,5±0,5	28,5±4,9** *	6,6±0,9 – 25,8±2,8	–
	4	149 – 45,3	12,4±3,3			
	3	112 – 34,0	9,3±1,7			
	2	38 – 11,6	3,1±1,5			
	Всего	329 – 100		329	79-24,0	–
III n=4	5	–	–	4,0±0,9	–	–
	4	–	–			
	3	36 – 75,0	9,0±2,4			
	2	12 – 25,0	3,0±2,4			
	Всего	48 – 100		48		

В ходе эксперимента не учитывались клетки, снятые с опыта в результате пророста питательной среды. В I группе получены эмбрионы, пригодные для трансплантации, в количестве 15,5 % от поставленных на созревание ОКК. Следует отметить, что данную группу составляли яичники в фолликулярной стадии полового цикла и яичники со следами свежей овуляции. В морфологической структуре клеток этой груп-

пы ОКК с 5 баллами было больше на 20,5 % ($P < 0,01$), чем во II группе, что составило в среднем 5,5 ооцита на яичник, а с 4 баллами – меньше на 14,9 %. Дробящихся клеток получено 50,9 %; во II группе – 24,0 %. Во II группу вошли яичники в фолликулярной и лютеиновой стадиях полового цикла. В III группе отмечены только ОКК в 3 и 2 балла.

Таким образом, яичники в фолликулярной, лютеиновой стадиях полового цикла и со следами свежей овуляции содержат 60,0-54,4 % ОКК, пригодных к культивированию вне организма, что позволяет получать 50,9-24,0 % дробящихся клеток и 15,5 % морул-бластоцист.

Изучены цитогенетические характеристики ооцитов, извлеченных из фолликулов высокопродуктивных коров до и после созревания вне организма. Учитывали морфофункциональное состояние яичников и их связь с цитогенетическими особенностями ооцитов.

Цитогенетический анализ извлеченных ооцитов из яичников коров после убоя свидетельствует об их разнородности и различной способности к дальнейшему развитию. Большая часть ооцитов была в стадии диплотеи мейоза, что составило соответственно в яичниках лютеиновой стадии 80,0 %, фолликулярной – 78,7 %, со следами свежей овуляции и в яичниках от стельных коров – 75,0 %. В яичниках с гипофункциональной активностью количество ооцитов, обладающих потенцией к развитию, составило 30,0 %, в этой же группе больше всего выявлено дегенерированных клеток – 20,0 %. Во всех группах наблюдался небольшой процент зрелых ооцитов – от 1,3 до 10,0 %. В среднем из 260 ооцитов на стадии диплотеи профазы I находилось 71,9 % клеток; метафазы I – 7,7 %; анафазы I – 3,8 %; телофазы I – 2,3 %; метафазы II – 3,1 %; дегенерированных – 11,1 %.

Однако в технологии культивирования ооцитов и ранних эмбрионов вне организма определяющим фактором является способность ооцитов инициировать мейоз в синтетических питательных средах и достигать стадии метафазы II, на которой происходит оплодотворение с последующим выходом эмбрионов.

Через 24 часа культивирования больше всего ооцитов, подготовленных к оплодотворению, получено из яичников с крупными фолликулами 62,2 % и с овулировавшими фолликулами – 60,0 %. У яичников с хорошо выраженным желтым телом отмечено 50,0 % клеток на стадии метафаза II. Ооциты в этих группах характеризовались низким процентом дегенерации (до 5,0 %). В гонадах с гипофункцией 30,0 % клеток оказались дегенерированными, а в яичниках без крупного фолликула и желтого тела – 25,0 %. Однако больше всего (47,8 %) таких клеток наблюдалось в яичниках стельных коров.

Таким образом, наибольшей потенцией к инициации мейоза обладают яичники выбракованных коров, находящиеся в фолликулярной

или лютеиновой стадии полового цикла, а также яйцники со свежеевулировавшем фолликулом. Стадии метафаза II достигают соответственно 62,2 %, 50,0 и 60,0 % ооцитов. В среднем 47,1 % ооцитов достигают метафазы II через 24 часа культивирования вне организма.

Заключение. 1. Яйцники выбракованных высокопродуктивных коров в фолликулярной, лютеиновой стадиях полового цикла, а также со следами свежей овуляции содержат 60,0-54,4 % ооцит-кумулюсных комплексов пригодных к культивированию вне организма, что позволяет получать 50,9-24,0 % дробящихся клеток и 15,5 % морул-бластоцист.

2. Наибольшей потенцией к инициации мейоза обладают яйцники выбракованных коров, находящиеся в фолликулярной или лютеиновой стадии полового цикла, а также яйцники со свежеевулировавшем фолликулом. Стадии метафаза II достигают соответственно 62,2 %, 50,0 и 60,0 % ооцитов. В среднем 47,1 % ооцитов достигают стадии метафазы II через 24 часа культивирования вне организма.

Литература

1. Дегай, В. Эндокринные аспекты физиологии и патологии размножения крупного рогатого скота / В. Дегай. – Владивосток, 1994. – 177 с.
2. Завертяев, Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / Б. П. Завертяев. – Л. : Агропромиздат, 1989. – 255 с.
3. Callesen, H. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle / H. Callesen, T. Greve, P. Hyttel // Theriogenology. – 1986. – Vol. 25. – P. 71-86.
4. Ахмолдаева, А. М. Созревание и оплодотворение in vitro ооцитов крупного рогатого скота при действии биологически активных веществ / А. М. Ахмолдаева, Н. И. Сергеев, И. А. Порфирьев // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – № 6. – С. 58-65.
5. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct / W. H. Eyestone [et al.] // Theriogenology. – 1987. – Vol. 28. – P. 1-7.
6. Бугров, А. Д. Зависимость выхода и качества ооцитов от типоразмеров яйцников коров / А. Д. Бугров, И. В. Ткачева // Зоотехния. – 1999. – № 6. – С. 30-32.
7. Роль метаболических гормонов в регуляции функции яйцников у коров / В. А. Лебедев [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2005. – № 2. – С. 14-20.

(поступила 4.03.2008 г.)