

АГРАРНЫЕ НАУКИ

УДК 636.2:612.64.089.67

Член-корреспондент В. К. ПЕСТИС¹, Л. В. ГОЛУБЕЦ¹, А. С. ДЕШКО¹,
И. С. КЫССА¹, М. В. ПОПОВ²

ПОЛУЧЕНИЕ ООЦИТОВ КОРОВ
ПУТЕМ ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ ПУНКЦИИ ФОЛЛИКУЛОВ

¹Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, Беларусь
ggaubio@mail.ru; ggau@ggau.by; ggaubio@mail.ru; deshkoas@mail.ru; semexbelarus@tut.by
²ОАО «Почапово», Пинск, Беларусь
maxim.popov10@mail.ru

В работе представлены результаты изучения влияния некоторых факторов на эффективность получения ооцитов крупного рогатого скота путем трансвагинальной пункции фолликулов. Установлено, что уровень извлекаемости ооцит-кумулясных комплексов от числа проаспиривированных фолликулов составляет 68,7 %. Выход ооцитов на одну аспирацию – 2,7, в том числе на одну положительную по извлечению – 3,3. Наиболее приемлемой для аспирации является игла диаметром 17G независимо от уровня вакуума. Наибольшее количество аспирированных фолликулов (6,2 и 8,0) и полученных ооцитов (4,0 и 5,5) отмечено при использовании для стимуляции фолликулостимулирующего гормона Плюсета в дозе 750 И. Е. как без, так и с использованием в схеме стимуляции прогестагенного препарата Crestar.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, ооцит, гормоны, *in vitro*, трансвагинальная аспирация ооцитов.

V. K. PESTIS¹, L. V. GOLUBETS¹, A. S. DESHKO¹, I. S. KYSSA¹, M. V. POPOV²

COW OOCYTE PICK-UP BY THE TRANSVAGINAL PUNCTURE OF FOLLICLES

¹Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus
ggaubio@mail.ru; ggau@ggau.by; ggaubio@mail.ru; deshkoas@mail.ru; semexbelarus@tut.by
²«Pochapovo», Pinsk, Belarus
maxim.popov10@mail.ru

The results of studying the influence of some factors on the efficiency of the cattle pick-up are presented in the article. It is established that the level of recoverability of the oocyte-cumulus complexes from the number of punctured follicles is 68.7%. The yield of oocytes per one aspiration is 2.7, including per one positive aspiration for extraction – 3.3. Most acceptable for aspiration is the 17G dia needle regardless of the vacuum level. The greatest number of aspirated follicles (6.2 and 8.0) and picked-up oocytes (4.0 to 5.5) is observed when for simulation the follicle-stimulating Pluset hormone is used at a dose of 750 I. E. with or without the use of the progestagen drug Crestar during the stimulation process.

Keywords: cattle, oocyte, hormones, *in vitro*, transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval.

Введение. В настоящее время благодаря последним достижениям в области биологии размножения открылись новые возможности интенсификации процессов воспроизведения высокоценных генотипов сельскохозяйственных животных. Установление того факта, что ооциты, извлеченные из фолликула и помещенные в соответствующие условия, возобновляют мейоз и созревают до стадии оплодотворения, а полученные после оплодотворения зародыши способны развиваться до предимплантационных стадий, послужило основой разработки технологии получения эмбрионов вне организма матери или *in vitro* [1–3]. Сегодня это один из наиболее динамично развивающихся и занимающих все более прочное положение биотехнологических методов интенсификации использования репродуктивного и генетического потенциала племенных животных.

Технология *in vitro* не только расширила рамки использования животных с выдающимися селекционными признаками, но и способна, в ближайшем будущем, стать если не альтернати-

вой, то сильным конкурентом обычной трансплантации эмбрионов, в отличие от которой может успешно использоваться независимо от физиологического и репродуктивного статуса донора [4–6]. Например, ооциты могут извлекаться до двух раз в неделю независимо от стадии полового цикла, их можно получать у стельных (до 3 месяцев) животных, животных с патологиями репродуктивного тракта (за исключением яичников), а также у животных, не отвечающих реакцией суперовуляции на гормональную обработку. Для получения ооцитов нет необходимости в гормональной стимуляции множественного роста фолликулов и что самое главное в перерасчете на месячную эмбриопродуктивность давать большее количество зародышей по сравнению с трансплантацией эмбрионов [7].

Получение компетентных к развитию ооцитов является одним из критических факторов, обуславливающих успех метода. На начальных этапах основным источником ооцитов были яичники, полученные после убоя животного на мясокомбинате, что уже само по себе являлось сдерживающим фактором широкого внедрения данной технологии в производство, поскольку ооциты у донора можно было получить только один раз после его убоя [8; 9].

Цель исследований – совершенствование приемов получения ооцитов при жизни животного для повышения интенсивности использования репродуктивного и генетического потенциала коров-доноров.

Материалы и методы исследования. Для решения поставленных задач в 2012 г. на базе биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет» и в учебно-практическом центре биотехнологий ОАО «Почапово» Пинского района Брестской области была проведена серия опытов.

В качестве доноров ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) использовались коровы-доноры живой массой 650–750 кг в возрасте от 4 до 8 лет с удоем по наивысшей лактации 10–12,5 тыс. кг молока жирностью 3,8 % и более в лютеиновую и фолликулярную фазы полового цикла.

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, иглы длиной 55 см и диаметром 17G (1,473 мм), 18G (1,27 мм) и 20G (0,91 мм). Величина вакуума составляла 70, 80, 90, и 100 mmHg. Для стимуляции яичников использовали фолликулостимулирующий гормон «Плюсет» в дозах 500, 750 и 1000 И. Е. как без, так и в сочетании с прогестагеновым препаратом Crestar. В качестве промывной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 100 ед/мл гентамицина и 1 % BSA. Локализацию ооцит-кумулюсных комплексов проводили с помощью эмбрионального фильтра «EMCON», поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под микроскопом «Olympus» при 16- и 90-кратном увеличении соответственно. Дозревание ооцитов, капацитация спермы, оплодотворение и культивирование ранних зародышей проходило по ранее разработанным нами методикам с некоторыми модификациями. В качестве основной среды созревания использовалась TCM-199 с добавлением 10 мкг/мл ФСГ, 5 мкг/мл эстрадиола и 5 мкг/мл ЛН, а также 5 %-ной эстральной сыворотки. Капацитацию спермы проводили в среде SpermTalp, оплодотворение в среде FertTalp. Совместное инкубирование продолжалось в течение 18–20 ч. Культивирование ранних зародышей проходило на монослое клеток кумулюса в течение 7–9 дней. Качество ооцит-кумулюсных комплексов оценивалось 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.

Полученные результаты исследований были обработаны биометрически с использованием компьютерной программы Microsoft Excel. В работе приняты следующие обозначения уровня P : * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Результаты и их обсуждение. Диаметр иглы и величина вакуума – одни из важнейших факторов, влияющих на выход ооцитов и их качество. В своих исследованиях мы использовали иглы диаметром 17G (1,473 мм), 18G (1,27 мм) и 20G (0,91 мм) при величине вакуума 70, 80, 90, и 100 mmHg. Как показывает анализ данных, приведенных в табл. 1, при использовании иглы диаметром 20G

количество жизнеспособных ооцитов снижалось по мере увеличения вакуума с 84,3 % при величине вакуума 80 mmHg до 79,7 % при величине вакуума 100 mmHg, при этом количество отличных снижалось с 26,3 до 8,7 %, а хороших с 31,6 до 26,1 %, в то время как количество удовлетворительных и нежизнеспособных увеличивалось с 26,3 до 39,1 % и с 15,8 до 26,1 %. При диаметре иглы 18G количество жизнеспособных ооцит-кумулясных комплексов увеличивалось по сравнению с использованием иглы диаметром 20G на 11,4; 15,2; и 18,9 п. п. при вакууме 70, 90 и 100 mmHg соответственно.

Т а б л и ц а 1. Влияние диаметра иглы и величины вакуума на эффективность аспирации ооцитов

Диаметр иглы, G	Показатель	Величина вакуума, mmHg			
		70	80	90	100
20	Количество аспираций	6	7	6	6
	Аспирировано фолликулов	30	31	29	35
	Получено ооцитов	17	19	20	23
	в т. ч. отличных, n/%	4/23,5	5/26,3	3/15,0	2/8,7
	хороших, n/%	5/29,4	6/31,6	4/20,0	6/26,1
	удовлетворительных, n/%	5/29,4	5/26,3	9/45,0	9/39,1
	Итого: пригодных, n/%	14/82,3	16/84,2	16/80,0	17/73,9
непригодных, n/%	3/17,6	3/15,8	4/20,0	6/26,1	
18	Количество аспираций	6	6	7	8
	Аспирировано фолликулов	27	33	29	35
	Получено ооцитов	16	21	21	28
	в т. ч. отличных, n/%	4/25,0	6/28,6	5/23,8	5/17,8
	хороших, n/%	5/31,2	7/33,3	6/28,6	9/32,1
	удовлетворительных, n/%	6/37,5	5/23,8	9/42,8	12/42,8
	Итого: пригодных, n/%	15/93,7	18/85,7	20/95,2	26/92,8
непригодных, n/%	1/6,2	3/14,3	1/4,8	2/7,1	
17	Количество аспираций	7	5	7	7
	Аспирировано фолликулов	31	30	31	34
	Получено ооцитов	15	17	23	27
	в т. ч. отличных, n/%	4/26,7	5/29,4	7/30,4	8/29,6
	хороших, n/%	6/40,0	7/41,2	9/39,1	10/37,0
	удовлетворительных, n/%	3/20,0	3/17,6	5/21,7	7/25,9
	Итого: пригодных, n/%	13/86,7	15/88,2	21/91,3	25/92,6
непригодных, n/%	2/13,3	2/11,8	2/8,7	2/7,4	

Выход ооцитов отличного качества увеличивался на 8,8 п. п. при величине вакуума 90 mmHg и на 9,1 п. п. при величине вакуума 100 mmHg. Выход ооцитов хорошего качества увеличивался на 8,6 и 6,0 п. п. при вакууме 90 и 100 mmHg соответственно. По выходу удовлетворительных какой-либо закономерности не отмечено, а выход нежизнеспособных клеток сокращался на 11,4–19,0 п. п. по всем позициям за исключением величины вакуума 80 mmHg. Что касается использования при аспирации ооцитов иглы диаметром 17G, то здесь следует отметить то, что выход жизнеспособных клеток увеличивался с 86,7 % при вакууме 70 mmHg до 92,6 % при вакууме 100 mmHg. По выходу отличных, хороших и удовлетворительных каких-либо определенных закономерностей не отмечено. Количество непригодных ооцитов уменьшалось с 13,3 % при вакууме 70 mmHg до 7,4 % при вакууме 100 mmHg. При вакууме 70 mmHg и использовании иглы диаметром 17G выход непригодных ооцитов находился на уровне использования иглы диаметром 20G. При вакууме 90 и 100 mmHg на уровне результатов при использовании иглы диаметром 18G. Что касается вопроса влияния диаметра иглы в целом, то при использовании иглы диаметром 20G выход жизнеспособных ооцитов снижался на 10,5–12,0 п. п. Что касается вакуума, не зависимо от диаметра иглы, выход жизнеспособных клеток находился примерно на одном уровне и колебался в пределах 85,9–89,1 %.

Таким образом, наиболее приемлемой для аспирации является игла диаметром 17G независимо от уровня вакуума. При ее использовании выход жизнеспособных ооцитов с хорошим и отличным качеством превышал аналогичный показатель при использовании игл диаметром 18G и 20G на 13,7 и 24,0 п. п. соответственно.

Как видно из табл. 2, не из всех аспирированных фолликулов можно получить ооциты. Так, из 375 фолликулов получено всего 247 ооцитов, что в итоге составило 65,9 %.

В связи с вышесказанным с целью выявления влияния системы игла–трубка на извлекаемость ооцитов, мы провели дополнительный опыт, в котором участвовали две группы клеток. В опытную входили ооциты, заведомо подсчитанные и помещенные в пробирку Ependorf, из которой и проводилась их аспирация. Во вторую, контрольную, входили ооциты, полученные при визуальном контроле процесса аспирации фолликулов, имеющих на яичниках, доставленных с мясокомбината.

Как показывает анализ данных табл. 2, хотя потери клеток и сокращались значительно, в первом случае (опытная группа) они составили 8,3 %, а во втором (контрольная) – 16,5 %, но тем не менее имели место, что говорит о неизбежности их потерь при трансвагинальной аспирации по пути игла–трубка–пробирка.

Т а б л и ц а 2. Влияние аспирации на потери ооцитов в системе ТАО

Группа ооцитов	Показатель			
	Аспирировано фолликулов, <i>n</i>	Получено ооцитов, <i>n</i> / <i>%</i>	Аспирировано ооцитов, <i>n</i>	Получено ооцитов, <i>n</i> / <i>%</i>
Контроль-1	375	247/65,9	–	–
Контроль-2	121	101/83,5	–	–
Опыт	–	–	121	111/91,7

По данным ряда исследователей отличительной особенностью ооцитов, полученных путем трансвагинальной аспирации, является то, что, во-первых, их количество ограничено, а во-вторых – отсутствие, за редким исключением, многослойного кумулюса [10–12]. Эти данные подтверждаются и нашими исследованиями.

В табл. 3 показан опыт получения ооцитов из яичников животных, убитых на мясокомбинате (контроль, *n* = 50), и путем аспирации с использованием ультразвуковой системы Aloka SSD 500 (опыт, *n* = 50).

Т а б л и ц а 3. Влияние аспирации на качество ооцитов

Группа животных	Использовано яичников	Получено ооцитов, всего	В том числе <i>n</i> / <i>%</i>			
			отличных	хороших	удовлетв.	неудовлетв.
Ооциты из яичников после убоя животного (контроль)	50	357	127/35,6	178/49,8	135/37,8	52/14,6
Ооциты, полученные путем аспирации (опыт)	50	177	39/22,0	70/39,7	34/19,2	34/19,2

При изучении морфофункциональных особенностей клеток было установлено, что в опытной группе 22 % ооцит-кумулюсных комплексов имели многослойный, плотный кумулюс, темную мелкозернистую, гомогенную, равномерно заполняющую периветелиновое пространство ооплазму и имели отличное качество; 39,7 % были отнесены к хорошему качеству, т. е. имели многослойный, плотный или рыхлый кумулюс, темную мелкозернистую, но с отдельными участками фрагментации ооплазму; 19,2 % ооцитов были отнесены к удовлетворительному качеству, поскольку их кумулюс насчитывал менее трех слоев клеток, в некоторых случаях был частично отслоившийся от зоны пеллюцида, имел рыхлую консистенцию, ооплазма имела участки гранулярной конденсации, неравномерно заполняла периветелиновое пространство и 19,2 % не имели кумулюсных клеток (так называемые голые ооциты) и были отнесены к неудовлетворительному качеству.

Таким образом, при трансвагинальной аспирации выход ооцитов отличного качества по сравнению с контролем снижался на 13,6 п. п., хорошего на 10,1 п. п., удовлетворительного на 18,6 п. п. Количество неудовлетворительных ооцит-кумулюсных комплексов увеличивалось на 4,6 п. п.

Еще одним фактором, способным оказать влияние на эффективность аспирации ооцитов, является фаза полового цикла. Как показывает анализ данных, приведенных в табл. 4, количество аспирированных фолликулов на донора, находящегося в фолликулярной фазе, превышало аналогичный показатель доноров в лютеиновой фазе на 41,7 %, а выход ооцитов на одну аспирацию в 1,7 раза.

Т а б л и ц а 4. Влияние фазы полового цикла на эффективность получения ооцитов

Группа животных	Количество аспираций	Аспирировано фолликулов		Получено ооцитов	
		всего	на аспирацию	всего	на аспирацию
Лютеиновая фаза	17	82	4,8 ± 0,37	43/52,4	2,5 ± 0,48
Фолликулярная фаза	17	115	6,8 ± 0,50***	73/63,4	4,3 ± 0,56*

Одним из наиболее дискуссионных вопросов трансвагинальной системы получения ооцитов является вопрос стимуляции яичников перед аспирацией. По данной проблеме имеются разные мнения [13–15].

Что касается наших исследований, результаты которых представлены в табл. 5, наибольшее количество аспирированных фолликулов (6,2 и 8,0) и полученных ооцитов (4,0 и 5,5) отмечено при использовании для стимуляции фолликулостимулирующего гормона Плюсет в дозе 750 И. Е. как без, так и с использованием в схеме стимуляции прогестагенного препарата Crestar. В контрольной группе данные показатели составили 4,5 и 2,3 соответственно.

Т а б л и ц а 5. Влияние гормональной стимуляции на эффективность аспирации ооцитов

Группа животных		Кол-во аспираций	Аспирировано фолликулов		Получено ооцитов	
			всего	на аспирацию	всего	на аспирацию
Контрольная		17	77	4,5 ± 0,31	40/51,9	2,3 ± 0,36
Стимуляция: Плюсет, И. Е. (опытная 1)	500	17	79	4,6 ± 0,37	44/55,7	2,6 ± 0,46
	750	17	106	6,2 ± 0,41**	69/65,1	4,0 ± 0,44**
	1000	17	95	5,6 ± 0,38	55/57,8	3,2 ± 0,41
Стимуляция: Плюсет, И. Е. + Crestar (опытная 2)	500	17	75	4,4 ± 0,26	40/53,3	2,3 ± 0,31
	750	17	136	8,0 ± 0,48***	93/68,4	5,5 ± 0,41**
	1000	17	99	5,8 ± 0,29	59/59,6	3,5 ± 0,34

Закключение. Впервые в Республике Беларусь начаты исследования по разработке метода получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов, открывающие новые перспективы и расширяющие возможности технологии *in vitro* в рамках ускоренного создания и качественного обновления племенных стад.

По результатам исследований установлено, что:

Уровень извлекаемости ооцит-кумулюсных комплексов от числа проаспирированных фолликулов составляет 68,7 %. Выход ооцитов на одну аспирацию – 2,7, в том числе на одну положительную по извлечению – 3,3.

Выход ооцитов отличного качества колебался в пределах 19–22 %, хороших – 38,0–39,5 %, удовлетворительных – 18,7–19,2 %, нежизнеспособных – 19,2–23,9 %.

Наиболее приемлемой для аспирации является игла диаметром 17G независимо от уровня вакуума. При ее использовании выход жизнеспособных ооцитов с хорошим и отличным качеством превышал аналогичный показатель при использовании игл диаметром 18G и 20G на 13,7 и 24,0 % соответственно.

При трансвагинальной аспирации выход ооцитов отличного качества по сравнению с контролем снижался на 13,6 п. п., хорошего на 10,1 п. п., удовлетворительного на 18,6 п. п. Количество неудовлетворительных ооцит-кумулюсных комплексов увеличивалось на 4,6 п. п.

Количество аспирированных фолликулов у доноров, находящихся в фолликулярной фазе, превышало аналогичный показатель доноров в лютеиновой фазе на 41,7 %, а выход ооцитов на одну аспирацию в 1,7 раза.

Наибольшее количество аспирированных фолликулов (6,2 и 8,0) и полученных ооцитов (4,0 и 5,5) отмечено при использовании для стимуляции фолликулостимулирующего гормона Плюсет в дозе 750 И. Е. как без, так и с использованием в схеме стимуляции прогестагенного препарата Crestar.

Список использованной литературы

1. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes / M. C. Pieterse [et al.] // *Theriogenology*. – 1991. – Vol. 35. – P. 19–24.
2. 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.
3. Bols, P. Gebruik van de transvaginale Ovum Pick-Up (OPU) techniek : geboorte van de eerste OPU kalveren in België. (Use of transvaginal oocyte pick-up: first OPU calves born in Belgium) / P. Bols, A. Soom Van, A. de Kruif // *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. – 1996. – Vol. 65. – P. 86–91.
4. Potential use of Ovum Pick-Up for embryo production and breeding in cattle / T. Kruip [et al.] // *Theriogenology*. – 1994. – Vol. 42. – P. 675–683.
5. Boni, R. Impact of Ovum Pick-Up (OPU) technique for research and animal breeding / R. Boni, L. Zicarelli, T. Kruip // *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy*. – Amsterdam, 1995. – P. 211–221.
6. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows submitted to repeated follicular puncture / R. Boni [et al.] // *Theriogenology*. – 1997. – Vol. 48. – P. 277–289.
7. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving result / J. F. Hasler [et al.] // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – P. 141–152.
8. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation and culture *in vitro* / P. Lonergan [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 1994. – Vol. 37. – P. 48–53.
9. Effect of the frequency of ovum pick-up intervals on follicle number, oocyte recovery and embryo production rates in cattle / K. Imai [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53. – P. 359.
10. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows / M. C. Pieterse [et al.] // *Theriogenology*. – 1992. – Vol. 37. – P. 273.
11. Stubbings, R. B. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows / R. B. Stubbings, J. S. Walton // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – P. 705–712.
12. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology / F. A. Ward [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 54. – P. 433–446.
13. De Ruigh, L. The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield / L. De Ruigh, E. Mullaart, A. M. van Wagtenonck-de Leeuw // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53. – P. 349.
14. Gonadotropin stimulation of cattle donors at estrus for transvaginal oocyte collection / J. B. Paul [et al.] // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – P. 294.
15. Van Soom, A. Improved results in IVF-treatment of sterility patients by careful selection of bulls and by stimulation of cows with FSH before slaughter / A. Van Soom, P. E. J. Bols, A. de Kruif // *Reprod. Dom. Anim.* – 1995. – Suppl. 3. – P. 67.

Поступило в редакцию 27.07.2015