

УДК 636.2.034:612.02

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

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ВЫБРАКОВАННЫХ КОРОВ В ТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO*

Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству

(Поступила в редакцию 26.03.2008)

Введение. С переходом на интенсивные технологии ведения животноводства возрастают продуктивные нагрузки на животных, в связи с чем высокоценные коровы преждевременно отбиваются на мясокомбинат [1]. В то время как за продуктивную жизнь эти животные приносят 2–4 телят, потенциальный запас ооцитов в яичниках составляет несколько сот тысяч. В течение жизни коровы огромная часть ооцитов подвергается атрезии и в воспроизводстве не участвует. Суперовуляцией можно лишь частично повысить реализацию генетического потенциала. Еще одним способом использования нереализованного запаса яйцеклеток является культивирование и оплодотворение ооцитов вне организма. Успешное культивирование ооцитов зависит от многих факторов, прежде всего от морфофункционального состояния репродуктивных органов [2]. Гипофункция яичников, лютеиновые и фолликулярные кисты, эндометриты ведут к нарушениям фолликулярного роста, задержке оогенеза, снижению оплодотворяемости [3–6], в связи с чем выход эмбрионов на преимплантационных стадиях развития остается крайне низким. Основная причина этого – несоответствие условий созревания клеток *in vitro* естественным условиям материнского организма [7, 8]. Кроме того, ооциты, извлеченные из фолликулов, находятся на разных стадиях развития.

Цель работы – изучение возможности использования репродуктивного потенциала выбракованных коров в технологии *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных Научно-практического центра НАН Беларуси по животноводству. Объектом исследований служили яичники, ооциты крупного рогатого скота и эмбрионы на ранних преимплантационных стадиях 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 экспериментальной базы «Жодино». Изучали морфологические характеристики ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) в зависимости от морфофункционального состояния яичников и их связь с оплодотворяемостью вне организма. Яичники разделили на группы: I – в лютеиновой стадии полового цикла; II – в фолликулярной стадии; III – без крупного фолликула и желтого тела; IV – от стельных коров; V – телочек в 12 мес; VI – с гипофункцией; VII – со свежей овуляцией. Количество извлеченных ооцитов из каждого яичника учитывали индивидуально.

Результаты и их обсуждение. Анализ морфологического состояния яичников выбракованных коров (табл. 1) показал, что нарушения овариальной функции наблюдались у 60,9% коров: от этих животных получено в среднем 17,3–24,1 ооцита на яичник. Из яичников в фолликулярной и лютеиновой стадии полового цикла извлечено в среднем 28,7 и 27,4 ооцита на яичник. Всего в среднем на один яичник получено 23,3 ооцита.

В каждом яичнике фолликулы находятся на различных стадиях фолликулярного роста, визуально отличающиеся размерами. В технологии получения ранних зародышей вне организма

Т а б л и ц а 1. Физиологическое состояние яичников

Фаза полового цикла или патологии яичника	Количество яичников, <i>n</i>	Количество ооцитов в среднем на 1 яичник, <i>n</i>
Фолликулярная	13	28,7±4,5
Лютеиновая	14	27,4±4,0
Киста	12	17,3±3,2
Гипофункция	23	24,1±7,8
Персистентное желтое тело	7	19,1±4,0
Итого	69	23,3±4,6

оптимальным является диаметр антральных фолликулов 3–6 мм. 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. В каждой группе визуально учитывали три стадии развития антральных фолликулов в зависимости от их диаметра: >10; 3–6; < 3 мм. В количественном отношении больше всего фолликулов насчитывалось в яичниках стельных коров 31,8, однако диаметр их был менее 3 мм – 98,7% фолликулов, почти такое же количество указанных фолликулов (97,5%) отмечено в яичниках телочек до 12 мес. Меньше всего фолликулов на один яичник (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 и 37,4% 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 [9]. Количество ОКК с оценкой в 5 баллов в группах колебалось от 0 до 35,1%; 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 ооцит-кумулясных комплексов, из них 4,2 – отличных; 8,3 – хороших; 8,6 – удовлетворительных; 3,1 – неудовлетворительных.

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

Зависимость оплодотворяемости ооцитов вне организма от морфологического состояния выделенных ОКК отражена в табл. 2. Анализировались ОКК от яичников, разделенных на три группы: *A* – ОКК (*n* = 5), при культивировании которых получены эмбрионы на стадии Мо – VI; *B* – ОКК (*n* = 12), после оплодотворения которых получены дробящиеся клетки, не достигшие стадии ранней Мо; *C* – ОКК (*n* = 4), от которых не получено дробящихся клеток. В ходе эксперимента не учитывались клетки, снятые с опыта в результате пророста питательной среды.

В группе *A* получено 15,5% эмбрионов, пригодных для трансплантации, от числа 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 группы ОКК с оценкой в 5 баллов было больше на 20,5% ($P < 0,01$), чем в группе *B*, что составило в среднем 5,5 ооцитов на яичник, а с оценкой 4 балла – меньше на 14,9%. Оплодотворяемость ооцитов групп *A* и *B* была достоверно выше по сравнению с группой *C* и составила 22,0% ($P < 0,001$) и 28,5% ($P < 0,001$) соответственно. Уровень дробления в группе *A* составил 50,9%; в группе *B* – 24,0%. В группу *B* вошли яичники в фолликулярной и лютеиновой стадиях полового цикла. В группе *C* получены только ОКК с оценкой в 3 и 2 балла.

Таким образом, в качестве пригодных к культивированию вне организма ооцит-кумулясных комплексов рекомендуется использовать яичники в фолликулярной и лютеиновой стадиях полового цикла, а также со следами свежей овуляции.

Цитогенетический анализ ооцитов свидетельствует об их разнородности и различной компетентности к развитию *in vitro*. Среди выделенных из яичников в лютеиновой стадии клеток 80%

Т а б л и ц а 2. Зависимость оплодотворяемости ооцитов вне организма от состояния ооцит-кумулясных комплексов

Группа яичников	Состояние ОКК, баллы	Количество ооцитов		Оплодотворено, $M \pm m$	Уровень дробления, $n - \%$	Выход морул-бластоцист, $n - \%$
		$n - \%$	в среднем на один яичник, $M \pm m$			
А, $n = 5$	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				
В, $n = 12$	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				
С, $n = 4$	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				

** $P \leq 0,01$.

*** $P \leq 0,001$.

находились в стадии диплотены мейоза, в фолликулярной – 78,7%, со следами свежей овуляции и в яичниках от стельных коров – 75,0% клеток. В яичниках с гипофункцией количество ооцитов, обладающих потенцией к развитию, составило 30,0%, в этой же группе больше всего дегенерированных клеток – 20,0%. Во всех группах наблюдался небольшой процент ооцитов, достигших стадии метафаза II – от 1,3 до 10,0%. В среднем из 260 ооцитов на стадии диплотены 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%. Через 24 ч культивирования больше всего ооцитов, способных 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 коров, находящиеся в фолликулярной или лютеиновой стадии полового цикла, или яичники с овулировавшим фолликулом.

Изучено влияние сезонов года на результативность получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. Установлено, что зимние месяцы являются наименее благоприятными для получения ранних эмбрионов вне организма – 5,4–9,8%, хотя количество дробящихся клеток составило в среднем 40,9% (28,6–47,4%). По-видимому, на результативности метода сказываются сезонные метаболические изменения в организме животных. Процент оплодотворяемости ооцитов в марте-апреле составил 48,6–50,0%, а в мае снизился на 20,5% по сравнению с апрелем, что связано с процессом адаптации при переводе животных на пастбищное содержание. Однако выход морул-бластоцист составил 20,9% от количества делящихся клеток, что больше на 4,7% по сравнению с мартом и меньше на 1,9%, чем в апреле. В среднем выход зародышей, пригодных к пересадке, в весенние месяцы составил 19,6%, что на 12,1% превышает аналогичный показатель зимнего триместра, в летние месяцы уровень дробления клеток – 37,5–49,2%. Больше всего клеток на преимплантационных стадиях получено в июне – 36,6%, в июле этот показатель составил 16,6%, а в августе таких клеток не получено. В осенние месяцы оплодотворяемость и дробление ооцитов колебались в пределах 39,2–52,4%, выход морул-бластоцист – 16,3–29,3%, в том числе

по месяцам: в сентябре – 27,8, в октябре – 29,3, в ноябре – 16,3%. Достаточно высокий выход преимплантационных зародышей в первые осенние месяцы свидетельствует о нормализации метаболических процессов и гормонального баланса в организме животных. В среднем за год получено 42,9% дробящихся клеток и 17,4% морул-бластоцист.

Таким образом, осенний и весенний периоды наиболее благоприятны для проведения работ по культивированию ооцитов от выбракованных высокопродуктивных коров и получению от них ранних зародышей.

В результате исследований влияния индивидуальных особенностей доноров яичников на эффективность получения эмбрионов вне организма установлено, что уровень дробления колебался в широких пределах – 16,7–90,9%: выход морул составил 0–27,3%, а бластоцист – 0–31,8%. Средние показатели выглядят следующим образом: выход ооцитов на одно животное составил 23,2%, уровень дробления – 44,8; выход морул 6,9; выход бластоцист – 8,6; всего морул-бластоцист – 15,5%. Заслуживает внимания тот факт, что уровень трансформации морул в бластоцисты составляет 55,6%, в то время как 44,4% клеток на стадии морулы прекращают свое развитие и дегенерируют, что свидетельствует о существовании критического периода в развитии эмбрионов не только на стадии 8–16 клеток, но и на стадии перехода морулы в бластоцисту.

Таким образом, выход эмбрионов на преимплантационных стадиях развития зависит от индивидуальных особенностей состояния репродуктивных органов животных и может колебаться от 0 до 27,3%.

При культивировании ооцитов вне организма решающую роль играют ряд физических факторов. Нами изучено влияние осмолярности и водородного показателя (рН) питательных сред на созревание ооцитов. Установлено, что созревание ооцит-кумулюсных комплексов и развитие ранних зародышей происходит в средах при широком интервале осмотического давления – 280–330 мОсм/кг и не оказывает влияния на показатели культивирования. Ооциты и ранние эмбрионы более зависимы по сравнению с осмолярностью от водородного показателя (рН) среды. Оптимальным является рН среды 7,2–7,4, что поддерживается газовым режимом CO₂-инкубатора при температуре 38,5°C и постоянной влажности под слоем минерального масла. Резкое закисление среды в течение 24–48 ч способствует росту патогенной и условно-патогенной микрофлоры в питательной среде и невозможности дальнейшего проведения эксперимента.

Выводы

1. Яичники 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 яичники коров, находящиеся на фолликулярной или лютеиновой стадии полового цикла, или яичники с овулировавшим фолликулом. Стадии метафаза II достигают 62,2; 50,0 и 60,0% ооцитов соответственно. В среднем 47,1% ооцитов достигают метафазы II через 24 ч культивирования вне организма.

3. Работы по культивированию ооцитов от выбракованных высокопродуктивных коров и получению ранних зародышей от них наиболее благоприятны в осенний и весенний период – 29,5–52,4% дробящихся клеток, из них – 16,3–29,3% морул-бластоцист. В летний период выход преимплантационных зародышей составляет 16,6–36,6%, а в зимний – 5,4–9,8%.

Литература

1. В а л у ш к и н К. Д. Актуальные вопросы воспроизводства крупного рогатого скота // Ученые записки: Сб. науч. тр. Витебск, 2004. С. 105–107.
2. Б у г р о в А. Д., Т к а ч е в а И. В. Зависимость выхода и качества ооцитов от типоразмеров яичников коров // Зоотехния. 1999. № 6. С. 30–32.
3. З а в е р т я е в Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. Л.: Агрпромпиздат, 1989.

4. Кузьмич Р. Г. Основные этиологические факторы акушерской и гинекологической патологии у коров // Ветеринарная наука производству: Материалы Междунар. науч.-практ. конф. Минск, 2005. Вып. 38. С. 309–311.
5. Лебедев В. А., Лебедева И. Ю., Кузьмина Т. И. Роль метаболитических гормонов в регуляции функции яичников у коров // С.-х. биология. 2005. № 2. С. 14–20.
6. Розен В. Б. Основы эндокринологии. М.: Высш. шк., 1984.
7. Ахмолдаева А. М., Сергеев Н. И., Порфирьев И. А. Созревание и оплодотворение *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота при действии биологически активных веществ // С.-х. биология. 2003. № 6. С. 58–65.
8. Дегай В. Эндокринные аспекты физиологии и патологии размножения крупного рогатого скота. Владивосток, 1994.
9. Голубец Л. В. Биотехнологические аспекты репродукции животных. Барановичи, 2001.

A. I. GANDJA, L. L. LETKEVITCH, E. D. RAKOVICH, I. V. KOSTIKOVA, O. V. GRISHKINA

**POSSIBILITY OF USING THE REPRODUCTIVE POTENTIAL OF CULLED COWS WITH
IN VITRO TECHNOLOGY**

Summary

The influence of the physiological condition of the ovaries, the year time and individual traits of animals on the fertilization of oocytes is stated. The ovaries at the follicular and lutein stages of the sex cycle as well as with the signs of fresh ovulation contain 60.0–54.5% of oocyte-cumulus complexes suitable for cultivation out of the organism. This enables getting 50.9–24.0% of splitting cells and 15.55 of morul-blastocysts.