

УДК 636.2.082.4

В. К. ПЕСТИС, Л. В. ГОЛУБЕЦ, А. С. ДЕШКО, И. С. КЫССА, М. В. ПОПОВ, Ю. А. ЯКУБЕЦ

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА IN VITRO В СИСТЕМЕ ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ АСПИРАЦИИ ООЦИТОВ (ТАО)

Гродненский государственный аграрный университет,
Республика Беларусь, e-mail: ggaubio@mail.ru

(Поступила в редакцию 23.09.2014)

Введение. Основой разработки технологии получения эмбрионов вне организма матери, или *in vitro*, послужило становление того факта, что ооциты, извлеченные из фолликула и помещенные в соответствующие условия, возобновляют мейоз, созревают до стадии оплодотворения, а полученные после оплодотворения зародыши способны развиваться до предимплантационных стадий. 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 альтернативой, то сильным конкурентом обычной трансплантации эмбрионов, в отличие от которой может успешно использоваться независимо от физиологического и репродуктивного статуса донора. Например, ооциты могут извлекаться до двух раз в неделю независимо от стадии полового цикла, их можно получать у стельных (до 3 мес) 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 пересчете на месячную эмбриопродуктивность давать большее количество зародышей по сравнению с трансплантацией эмбрионов.

Получение компетентных к развитию ооцитов является одним из критических факторов, обуславливающих успех метода. На начальных этапах основным источником ооцитов являлись 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. Решить эту проблему могло только получение ооцитов при жизни животного.

Впервые трансвагинальная аспирация ооцитов (ТАО), по международной классификации ОРУ (Ovum Pick-Up), у крупного рогатого скота была проведена командой датских исследователей во главе с Callesen Н. в 1987 г., по результатам которой после пункции 38 фолликулов у 7 суперовулировавших (стимулированных на суперовуляцию) телок было получено 16 ооцитов [1].

Прижизненная пункция фолликулов у животных открыла новые перспективы в технологии *in vitro*, поскольку, с одной стороны, предоставила возможность получения ооцитов у одних и тех же животных на протяжении длительного времени, а с другой стороны, появилась возможность получения ооцитов, вовлеченных в половой цикл и в фолликулярную волну роста, а значит имеющих большую компетенцию к качественному росту и развитию.

В связи с тем, что технология *in vitro* является достаточно сложной и многофакторной системой, ее эффективность зависит от множества слагаемых, носящих как механический, так и биологический характер. К механическим составляющим системы, обуславливающим извлекаемость ооцитов и их качество (в основном целостность кумулюса) в первую очередь можно отнести

величину вакуума, диаметр и остроту иглы. Величина вакуума на кончике иглы во многом зависит от конструкции помпы, диаметра иглы, длины и диаметра соединительных трубок. При оценке влияния данных факторов на количество и качество получаемых ОКК группой ученых в главе с P. Vols установлено, что уровень извлекаемости был наивысшим при достаточно большом диаметре иглы (18G) и высоком вакууме, однако процент интактных клеток (75 %) был выше при более низком вакууме (36 мл/мин). С увеличением вакуума количество интактных ооцитов снижалось, а количество ооцитов без кумулюса увеличивалось [2]. В последующем это было подтверждено работами F. Ward et al. Влияние процедуры аспирации на извлекаемость ооцитов была дополнительно проверена путем аспирации *in vitro* ранее полученных ооцит кумулюсных комплексов, при этом на выходе было получено 80 % ооцитов от числа забранных, т. е. 20 % ооцитов, или каждый пятый терялся в самой системе «игла–трубка». Кроме этого от 10 до 20 % клеток в процессе аспирации и по пути в пробирку получали микроповреждения кумулюса [3].

Другим аспектом оптимизации ТАО и повышения ее эффективности является частота аспираций. Переход от одноразовой аспирации в неделю к двухразовой сопровождалось значительным увеличением ее эффективности [4]. Более детальное сравнение этих двух подходов к получению ОКК подтвердило, что двукратная аспирация достоверно повышала как выход ооцитов, так и выход качественных эмбрионов, что связано, по всей видимости, с тем, что 2-кратная в неделю аспирация стимулирует и синхронизирует новые волны роста фолликулов [5]. Более частые аспирации (каждые два дня) снижали как количество аспирированных фолликулов, так и количество полученных ооцитов [6]. И, тем не менее, многие специалисты предпочитают проводить аспирации с интервалом в 7 дней [7].

Еще одним вопросом, потребовавшим своего решения, стал вопрос гормональной стимуляции яичников перед ТАО с целью вызывания роста большого количества фолликулов. В этом контексте ряд исследователей отмечает положительное влияние ФСГ на количество фолликулов, в особенности диаметром свыше 6 мм, и выход бластоцист [8, 9]. J. Paul с соавт. обращают внимание на взаимосвязь эффективности гормональной стимуляции с фазой полового цикла [10]. В то же время R. Stubings et al. не установили никаких различий ни по количеству фолликулов, ни по выходу ооцитов между донорами без стимуляции при режиме аспирации два раза в неделю и донорами, стимулированными при аспирации раз в неделю [11]. Однако главным в этом плане, по всей видимости, являются индивидуальные особенности доноров и непредсказуемость их реакции на гормон, что характерно и для обычной трансплантации эмбрионов. Подтверждением правомочности этого тезиса может служить то, что даже у одних и тех же специалистов получают противоречивые результаты. Так, по итогам своих первых исследований M. Pieterse et al. установили, что выход ооцитов был выше у стимулированных доноров нежели у интактных, однако уже в 1991 г. он отмечает, что ТАО можно и нужно проводить у нестимулированных доноров, поскольку фолликулы диаметром более 2 мм присутствуют в яичниках всегда и в любой момент времени, а небольшая гормональная стимуляция необходима только для небольшого числа доноров с недостаточной активностью яичников. Но уже в 1992 г. они же отмечают, что хотя количество фолликулов у стимулированных доноров было больше, но выход ооцитов оказался меньше [12–14].

L. Ruigh отметил, что сочетание гормональной стимуляции яичников перед ТАО с последующей аспирацией один раз в две недели дает более высокий результат в пересчете на одну процедуру по сравнению с аспирацией два раза в неделю без стимуляции. Однако при таком режиме работы ооциты можно получать один раз в две недели, в то время как у доноров без стимуляции мы за это же время можем провести 4 аспирации и в целом получается, что общее количество эмбрионов, полученных за двухнедельный период во втором случае (4 аспирации без стимуляции) оказывается выше по сравнению с первым (1 аспирация в две недели в сочетании со стимуляцией) [15].

Интересным является и вопрос влияния многократных ТАО на последующее здоровье и репродуктивные способности доноров. M. Pieterse, проведя 36 операций и пункцию 197 фолликулов у 10 доноров, не установил негативного влияния многократных аспираций у одних и тех же

животных на их репродуктивную активность. Этой же командой ученых был проведен опыт по еженедельной аспирации ооцитов у одних и тех же доноров в течение 3 и 6 мес а также в начале, середине и в конце полового цикла в течение 3 мес, по результатам которого также не было установлено влияния аспираций на проявление и течение полового цикла [12, 13]. Как отмечают Т. Kruip и R. Boni, двукратная аспирация в неделю, с одной стороны, увеличивает частоту фолликулярных волн, а с другой приостанавливает течение полового цикла, блокируя созревание фолликулов и их овуляцию. Животные, используемые в таком режиме, входят в так называемое парафизиологическое состояние, при котором фолликулярная волна отделяется от полового цикла, что приводит к некоторой ацикличности животных. При этом животные изредка показывали некоторые признаки охоты и развитие структур, похожих на желтое тело, развивающихся на месте аспирированных фолликулов, что подтверждалось профилем прогестерона в сыворотке крови. Однако уже через 6 дней после прекращения ТАО у коров наступала овуляция и половой цикл приходил в норму, в связи с чем авторы заключают, что ТАО не оказывает значительного влияния на яичниковые структуры и их функциональную активность [16–18].

Кроме того, что ТАО не оказывает негативного влияния на репродуктивную систему, она может быть использована при получении эмбрионов у животных с нарушенной воспроизводительной функцией и у тех, которые не дают эмбрионов при трансплантации. Так, P. Bols et al. получил от таких доноров 56 эмбрионов и 12 стельностей [4]. J. Hasler et al. провели аспирацию у 155 доноров голштинской породы, которых не смогли осеменить. В результате на каждую аспирацию было получено по 4,1 жизнеспособному ооциту, проведено 2268 эмбриопересадок и получено 1220 стельностей (53,8 %) [19].

При обычной трансплантации донор может быть использован примерно 4 раза в год и дать в итоге 20 качественных эмбрионов. Использование ТАО позволяет проводить аспирацию два раза в неделю и при этом получать по 2 эмбриона, или 8 эмбрионов за месяц, или 96 эмбрионов за год, что в 4–5 раз больше количества эмбрионов, полученных от донора за год при обычной трансплантации [18].

Таким образом, к настоящему времени трансвагинальная аспирация ооцитов превратилась в хорошо зарекомендовавший себя метод получения высокоценного генетического материала в виде ооцитов и эмбрионов. Однако, несмотря на явные успехи и множество исследований, проведенных с целью повышения эффективности метода, количество получаемых ооцитов по-прежнему остается ограниченным и не превышает в среднем 5–7 на одну аспирацию, по-прежнему значительное число клеток повреждается и теряется в процессе самой аспирации и во время прохождения по системе «игла–трубка». Небольшое количество (а иногда и единичные) получаемых ооцитов оставляет открытыми многие вопросы условий их созревания, поскольку достоверно установлено, что культивирование ооцитов в группах проходит значительно эффективней, а выход эмбрионов на предимплантационных стадиях после оплодотворения достоверно выше. Поэтому исследования, направленные на повышение эффективности метода и его еще более широкое внедрение в производство, продолжаются.

Учитывая вышеизложенное, нами впервые в Республике Беларусь на базе учебно-практического центра биотехнологий (УПЦ) ОАО «Почапово» Пинского района Брестской области начата разработка метода получения племенного молодняка в системе трансвагинальной аспирации ооцитов (ТАО) с целью повышения интенсивности использования репродуктивного и генетического потенциала коров-доноров.

Материалы и методы исследования. Для решения поставленной задачи в 2012–2013 гг. на базе биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет» и в УПЦ биотехнологий ОАО «Почапово» Пинского района Брестской области была проведена серия опытов.

В качестве доноров ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) использовали 18 постоянных (выбраванных) коров-доноров живой массой 650–800 кг в возрасте от 4 до 8 лет с удоем по наивысшей лактации 10,0–12,5 тыс. кг молока жирностью 3,8 % и более.

Пункцию фолликулов проводили с использованием ультразвуковой системы AlokaSSD 500, включающей в себя ультразвуковой сканер AlokaProsound 2, ультразвуковой излучатель с частотой

7,5 MHz, вакуумную помпу Craft suction unit, держатель ультразвукового излучателя, иглы длиной 55 см и диаметром 18G. Скорость аспирации фолликулярной жидкости составляла 25 мл/мин. 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-кратным увеличением соответственно. Дозревание ооцитов, капацитация спермы, оплодотворение и культивирование ранних зародышей проходило по ранее разработанным нами методикам с некоторыми модификациями. В качестве основной среды созревания использовали 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 оценивали 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 пеллюциды. Неудовлетворительные ооциты – это ооциты без кумулюса.

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

Результаты и их обсуждение. Результаты изучения эффективности трансвагинальной аспирации ооцитов представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Эффективность аспирации ооцит-кумулюсных комплексов, n

Показатель	Номер аспирации					Итого на одного донора (в среднем на одну аспирацию)
	1 ($n = 18$)	2 ($n = 17$)	3 ($n = 16$)	4 ($n = 11$)	5 ($n = 4$)	
Аспирировано фолликулов всего	46	70	58	54	28	256
Аспирировано фолликулов в среднем на одного донора	2,56±0,372	4,12±0,606	3,63±0,706	4,91±1,631	9,00±3,027	14,2 (3,88±0,418)
Получено ОКК всего	28	49	42	38	19	176
Получено ОКК в среднем на одного донора	1,56±0,364	2,88±0,587	2,63±0,561	3,45±1,436	4,75±2,839	9,8 (2,67±0,368)
Получено пригодных ОКК всего	24	40	34	28	8	134
Получено пригодных ОКК в среднем на одного донора	1,33±0,371	2,35±0,514	2,13±0,446	2,55±1,115	2,00±1,225	7,4 (2,03±0,277)

Всего было проведено 66 аспираций, или 3,7 на одного донора. Из 66 аспираций положительных по извлечению оказалось 53 (80,3 %). Всего аспирировано 256 фолликулов (14,2 на одного донора, или 3,9 на одну аспирацию), получено 176 ооцитов (9,8 на донора, 2,7 на одну аспирацию, в том числе 3,3 на одну аспирацию положительную по извлечению). Как видно из полученных результатов, извлекаемость при этом составила 68,7 %.

Из 176 полученных ооцитов 134, или 76,1 % (7,4 на донора, 2,0 на одну аспирацию, в том числе 2,5 на одну положительную по извлечению), оказались пригодными для культивирования.

Что касается выхода и качества полученных ооцитов в разрезе доноров в зависимости от количества аспираций и ее порядкового номера, здесь какой-то определенной закономерности не отмечено.

Изучение влияния кратности аспираций на выход и качество ооцитов (табл. 2) показало, что среди жизнеспособных ооцит кумулюсных комплексов ооциты отличного качества занимают 19 % (34 ОКК), хорошие – 38 % (67 ОКК), удовлетворительные – 18,7 % (33 ОКК), неудовлетворительных оказалось 23,9 % (42 ОКК). При этом на одну аспирацию получено: отличных – 0,52; хороших – 1,02; удовлетворительных – 0,50; неудовлетворительных – 0,64, в том числе на одну аспирацию, положительную по извлечению, – 0,64; 1,26; 0,62 и 0,79 соответственно.

Т а б л и ц а 2. Влияние кратности аспираций на выход и качество ооцитов

Порядковый номер аспирации	Значение	Порядковый номер аспирации	Значение
<i>Отличное</i>		<i>Удовлетворительное</i>	
1	0,22±0,101	1	0,22±0,129
2	1,00±0,411	2	0,47±0,194
3	0,81±0,245	3	0,38±0,202
4	1,20±0,152	4	0,56±0,242
5	1,09±0,406	5	2,00±1,378
Итого	1,89±0,471	Итого	1,94±0,609
<i>Хорошее</i>		<i>Неудовлетворительное</i>	
1	0,89±0,370	1	0,22±0,101
2	0,88±0,301	2	0,53±0,212
3	0,94±0,281	3	0,50±0,183
4	1,67±1,247	4	1,00±0,441
5	1,20±0,970	5	2,40±0,503
Итого	3,72±0,928	Итого	2,33±0,566

Из 101 ооцита, оплодотворенного после созревания, дробление отмечено у 42 (41,6 %). Выход эмбрионов на стадии бластоциста составил 8,9 % от числа клеток, поставленных на созревание, или 21,4 % от числа дробящихся зародышей. Исследования продолжаются.

Заключение. 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. Получены первые положительные результаты. Так, на одну аспирацию получено 2,7 ооцит-кумулюсных комплекса (ОКК), в том числе 3,3 ОКК на одну положительную по извлечению. Выход жизнеспособных ооцитов на одну аспирацию в целом составил 2,0, а на одну положительную по извлечению – 2,5. При этом уровень извлекаемости ооцит-кумулюсных комплексов составила 68,7 %, выход эмбрионов на стадии бластоциста от числа клеток, поставленных на созревание, – 8,9 %, а от числа дробящихся зародышей – 21,4 %.

Литература

1. Callesen, H. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes / H. Callesen, T. Greve, F. Christensen // *Theriogenology*. – 1987. – Vol. 27. – P. 217.
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. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pickup technology / F. A. Ward [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 54. – P. 433–446.
4. 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.
5. Boni, R. Impact of Ovum Pick-Up (OPU) technique for research and animal breeding / R. Boni, L. Zicarelli, TAM. Kruip // *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy / AETE*. – Amsterdam: Elsevier, 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. 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.
8. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro* / P. Lonergan [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 1994. – Vol. 37. – P. 48–53.
9. 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.
10. Gonadotropin stimulation of cattle donors at estrus for transvaginal oocyte collection // J. B. Paul [et al.] // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – P. 294.
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. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries / M. C. Pieterse [et al.] // *Theriogenology*. – 1988. – Vol. 30. – P. 751–762.

13. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes / M. C. Pieterse [et al.] // *Theriogenology*. – 1991. – Vol. 35. – P. 19–24.
14. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows / M. C. Pieterse [et al.] // *Theriogenology*. – 1992. – Vol. 37. – P. 273.
15. *De Ruigh, L.* The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield / L. De Ruigh, E. Mul-laart, A.M. van Wagtendonk-de Leeuw // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53. – P. 349.
16. Ovum Pick-Up and embryo production in vitro: an established procedure in cattle / R. Boni [et al.] // In: Proceedings of the VIII Congress. European Embryo Transfer Association / AETE. – France. Lyon, 1992. – P. 128.
17. Health and some blood parameters in cows punctured twice weekly during three months to collect immature oocytes / R. Boni [et al.] // In: Proceedings of the IX Congress. European Embryo Transfer Association / AETE. – France. Lyon, 1993. – P. 136.
18. Potential use of Ovum Pick-Up for embryo production and breeding in cattle // T. Kruip [et al.] // *Theriogenology*. – 1994. – Vol. 42. – P. 675–683.
19. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results / J. F. Hasler [et al.] // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – P. 141–152.

V. K. PESTIS, L. V. GOLUBETS, A. S. DESHKO, I. S. KYSSA, M. V. POPOV, YU. A. YAKUBETS

**THE FIRST EXPERIENCE OF *IN VITRO* CATTLE EMBRYO PRODUCTION
IN THE SYSTEM OF TRANSVAGINAL OOCYTE ASPIRATION (TOA)**

Summary

The results of the first experience of in vitro cattle embryo production in the system of transvaginal oocyte aspiration (TOA) are represented in this article. It's established that the method of transvaginal oocyte aspiration allows getting 2,7 oocytes per session and 3,3 oocytes per operation. The output of oocytes per session is 2,0 in general. The output of oocytes at blastocyst stage is 8,9 % of the number of matured cells and 21,4 % of the number of divided embryos.