

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ, ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГАМЕТ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ЯИЧНИКОВ КОРОВ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ ЭМБРИОНОВ

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

*РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»,
г. Жодино, Республика Беларусь, 222160*

(Поступила в редакцию 31.01.2020)

Изучены цитологические показатели гамет (размер, толщина внешней оболочки ооцита, состояние и размер перивителлинового пространства, наличие и состояние первого полярного тела, гранулярность цитоплазмы, вакуолизация) в зависимости от состояния яичников коров по морфологическим признакам: 1) в лютеиновой стадии полового цикла; 2) в фолликулярной стадии; 3) персистентное желтое тело; 4) с гипофункцией; 5) лютеиновая киста; 6) фолликулярная киста. Из яичников в лютеиновой и фолликулярной стадиях с наивысшей оценкой (5 баллов) количество подробившихся клеток составило 75,0–78,9 %. В группе ооцитов, полученных из яичников с персистентным желтым телом и оцененных на 5 баллов, уровень дробления составил 59,3 %. Аналогичная тенденция наблюдалась по уровню дробления среди исследуемых групп с оценкой 4 балла: фолликулярная стадия – 74,4 %, лютеиновая стадия – 63,8, персистентное желтое тело – 47,1 % и фолликулярная киста – 37,5 %. Таким образом, яичники в состоянии гипофункции, с наличием фолликулярной и лютеиновой кист использовать для этих целей нецелесообразно.

*Определена степень влияния цитогенетических особенностей яйцеклеток крупного рогатого скота на их созревание и ранний эмбриогенез в культуре *in vitro*. Установлено, что классификация яйцеклеток по цитологическим параметрам дает возможность прогнозировать уровень дробления и выход преимплантационных эмбрионов без изготовления цитогенетических препаратов для анализа ядерного материала ооцит-кумулосных комплексов по методу Тарковского и получать 80,0–93,6 % созревших до стадии оплодотворения (метафаза II) ооцитов с уровнем дробления 63,3–81,3 % и 13,3–18,8 % пригодных для трансплантации эмбрионов.*

: яичник, ооцит, полярное тельце, цитоплазма, эмбрион.

The cytological parameters of gametes (the size, thickness of the outer shell of the oocyte, the state and size of the perivitelline space, the presence and condition of the first polar body, the granularity of the cytoplasm, vacuolization) were studied depending on the state of the ovaries of cows according to morphological characteristics: 1) in the luteal stage of the sexual cycle; 2) in the follicular stage; 3) persistent yellow body; 4) with hypofunction; 5) luteal cyst; 6) follicular cyst. Of the ovaries in the luteal and follicular stages with the highest rating (5 points), the number of detailed cells was 75.0–78.9 %. In the group of oocytes obtained from ovaries with a persistent corpus luteum and rated at 5 points, the crushing rate was 59.3 %. A similar trend was observed in the level of fragmentation among the studied groups with a score of 4 points: follicular stage – 74.4 %, luteal stage – 63.8, persistent corpus luteum – 47.1 % and follicular cyst – 37.5 %. Thus, ovaries in a state of hypofunction, with the presence of

follicular and luteal cysts, are not advisable to use for these purposes.

The degree of influence of the cytogenetic characteristics of cattle eggs on their maturation and early embryogenesis in an in vitro culture was determined. It was established that the classification of eggs by cytological parameters makes it possible to predict the level of crushing and the yield of preimplantation embryos without the manufacture of cytogenetic preparations for the analysis of the nuclear material of oocyte-cumulus complexes according to the Tarkovsky method and to obtain 80.0–93.6 % matured to the stage of fertilization (metaphase II) of oocytes with a crushing level of 63.3–81.3 % and 13.3–18.8 % of embryos suitable for transplantation.

Key words: *ovary, oocyte, polar body, cytoplasm, embryo.*

Введение. Клеточные репродуктивные технологии, применяемые в практике скотоводства, по-прежнему являются перспективным направлением исследований, позволяющим многократного увеличить интенсивность использования репродуктивного потенциала крупного рогатого скота [1].

Нарушение воспроизводительной функции у коров в условиях промышленных комплексов является одной из основных причин низкой продуктивности животных. Хозяйства недополучают молочную продукцию, а коровы-перволетки выбраковываются значительно раньше, чем окупятся средства на их выращивание. Нарушения половой цикличности коров во многом связаны со срывом адаптационных процессов [2]. При этом в крови повышается количество кортикостероидов, подавляется синтез половых гормонов, а это вызывает задержку овуляции, появление кист. В ряде случаев морфологические изменения и расстройств функций яичника позволяют выделить такие формы патологии, как гипофункция, кисты, персистентные желтые тела яичников, атрофия и склероз яичников [3].

Изучение морфологических и цитологических параметров гамет [4] во взаимосвязи с физиологическим состоянием яичников [5], их мониторинг с последующим анализом позволит увеличить выход преимплантационных эмбрионов вне организма, что по-прежнему остается актуальным вопросом в плане сохранения генофонда крупного рогатого скота.

Качество ооцита, как показатель его жизнеспособности, является важным прогностическим фактором для успешного оплодотворения, так как часто можно видеть появление ооцитов с различными повреждениями [6–9]. Морфологические показатели ооцитов коров впервые изучены коллективом авторов, что позволило разработать критерии классификации яйцеклеток коров по цитологическим параметрам [4], а так же проанализировать их связь с физиологическим состоянием яичников [5]. В данной работе мы впервые сравнили компетенцию к оплодотворению и дальнейшему развитию ооцитов, оцененных по шкале оценки, разработанной нами, и ооцитов, оцененных по методу Тарковского [10]. Данная разработка будет способствовать объектив-

ной оценке репродуктивного потенциала доноров более ускоренным методом и позволит прогнозировать результаты не только предстоящего экстракорпорального оплодотворения, но и раннего эмбрионального развития, в чем и заключается новизна исследований.

Цель работы – изучить взаимосвязь цитологических, цитогенетических показателей ооцитов с физиологическим состоянием яичников коров и жизнеспособностью полученных эмбрионов.

Основная часть. Исследования выполнены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» в 2017–2018 гг.

Яичники получали на Минском мясокомбинате и убойном цехе Государственного предприятия «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области после убоя животного. Доставляли материал в лабораторию в растворе Хенкса с добавлением 200 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина в бытовом термосе. Яичники разделяли на группы по морфологическим признакам: 1) в лютеиновой стадии полового цикла; 2) в фолликулярной стадии; 3) персистентное желтое тело; 4) с гипофункцией; 5) лютеиновая киста; 6) фолликулярная киста. После выделения ооцитов их поиск осуществляли под бинокулярным микроскопом МБС-10 при 16- и 56-кратном увеличении. Созревание клеток осуществлялось в CO₂-инкубаторе в течение 24 часов при максимальной влажности и содержании 5 % CO₂ в воздухе. Мониторинг популяции ооцитов, извлеченных из яичников убитых коров, проводили после 24 часового созревания и после удаления клеток кумулюса и лучистого венца под действием гиалуроновой кислоты или трипсина под микроскопом (максимальное увеличение ×400) по размерам, толщине внешней оболочки ооцита, состоянию и размерам перивителлинового пространства, наличию и состоянию первого полярного тела (мейотическое состояние ооцита), цитоплазматическим аномалиям – гранулярность цитоплазмы, вакуолизация и др. Согласно изученным цитологическим параметрам, были разработаны критерии классификации яйцеклеток коров по 5-балльной шкале [4]:

5 баллов – размер ооцита – 130–150 мкм; толщина оболочки – 11–13 мкм, равномерная; наличие перивителлинового пространства без включений; одинарное первое полярное тельце овальной формы; цитоплазма гомогенная с отсутствием вакуолей;

4 балла – размер ооцита – 130–150 мкм; толщина оболочки – 10–14 мкм, неравномерная; наличие перивителлинового пространства с единичным включением мелких гранул; одинарное первое полярное тельце, овальной или округлой формы; цитоплазма гомогенная с отсутствием вакуолей;

3 балла – размер ооцита – 120–160 мкм; толщина оболочки – 10–14 мкм, неравномерная; наличие перивителлинового пространства с включение мелких гранул; фрагментированное первое полярное тельце или его отсутствие; цитоплазма гранулярная с присутствием одиноких мелких вакуолей;

2 балла – размер ооцита – 90–180 мкм; толщина оболочки – 8–15 мкм, неравномерная; отсутствие или наличие перивителлинового пространства с мелкой или крупной фрагментацией; отсутствие первого полярного тельца; цитоплазма гранулярная с присутствием вакуолей.

Каждую популяцию оцененных ооцитов делили на две группы: опытную и контрольную. В контрольной группе часть клеток использовали для проведения цитогенетического анализа эффективности созревания, остальные клетки оплодотворяли, результаты представлены в таблице. Изготавливали препараты для анализа ядерного материала по методу Тарковского [10]. Ооциты помещали на 5–10 мин в теплый (37 °С) гипотонический раствор 3-замещенного цитрата натрия (0,9 % р-р в дистиллированной воде), затем механически очищали от кумулюса и переносили на сухое обезжиренное стекло. Фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3:1). Высохшие препараты окрашивали по Романовскому-Гимза (азур-эозин) в течение 5–10 минут и промывали водой, затем 70 %-ным этанолом. Под микроскопом анализировали стадии мейоза ооцитов коров. Оставшиеся после 24-часового культивирования ооциты оплодотворялись заморожено-оттаянной спермой быка. После разморозки сперму помещали в 1 мл среды для капацитации и оставляли на 1 час в CO₂-инкубаторе для проведения *swim up* процедуры, при которой наиболее активная часть сперматозоидов всплывает в верхние слои питательной среды. Данную фракцию сперматозоидов собирали, помещали в другую пробирку с питательной средой для капацитации сперматозоидов и дважды подвергали процедуре центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 минут. При втором отмывании в среду добавляли гепарин (150 ед./мл). Затем сперму дважды отмывали в среде для оплодотворения ооцитов, которая готовилась на основе среды Тироде и в количестве 1×10^6 сперматозоидов на 1 мл среды добавляли к ооцитам, находящимся в данной среде для оплодотворения на 18–20 часов. После завершения процесса оплодотворения ооциты отмывались от спермы и ставились на дальнейшее культивирование. Наблюдение за развитием зародышей проводили ежедневно в течение 7–10 суток.

Влияние морфофункционального состояния яичников коров и цитогенетических особенностей ооцитов на их созревание оценивалось по количеству созревших ооцитов, уровню дробления и выходу преимплантационных эмбрионов.

Цитологические показатели гамет в зависимости от физиологического состояния яичников коров представлены в табл. 1.

При анализе 439 ооцитов отмечалось разнообразие по их размерам. Количество ооцитов с оценкой в 5 баллов колебалось от 0 до 35,5 % в группах; 4 балла – от 0 до 39,2 %; 3 балла – от 19,5 до 77,6 %; 2 балла – от 13,3 до 62,5 %.

Таблица 1. Влияние физиологического состояния яичников на цитологические показатели ооцитов

Физиологическое состояние яичников	Оценка ооцитов после созревания			Уровень дробления	
	балл	n	%	n	%
1	2	3	4	5	6
Фолликулярная стадия	5	19	16,9	15	78,9
	4	43	38,4	32	74,4
	3	32	28,6	12	37,5
	2	18	16,1	–	–
	<i>ВСЕГО</i>	<i>112</i>	<i>100</i>	<i>59</i>	<i>52,7</i>
Лютеиновая стадия	5	12	10,0	9	75,0
	4	47	39,2	30	63,8
	3	45	37,5	12	26,7
	2	16	13,3	–	–
	<i>ВСЕГО</i>	<i>120</i>	<i>100</i>	<i>51</i>	<i>42,5</i>
Персистентное желтое тело	5	27	35,5	16	59,3
	4	17	22,4	8	47,1
	3	20	26,3	3	15,0
	2	12	15,8	–	–
	<i>ВСЕГО</i>	<i>76</i>	<i>100</i>	<i>27</i>	<i>35,5</i>
Гипофункция	5	–	–	–	–
	4	–	–	–	–
	3	45	77,6	12	26,7
	2	13	22,4	–	–
	<i>ВСЕГО</i>	<i>58</i>	<i>100</i>	<i>12</i>	<i>20,7</i>
Фолликулярная киста	5	–	–	–	–
	4	8	19,5	3	37,5
	3	13	31,7	2	15,4
	2	20	48,8	–	–
	<i>ВСЕГО</i>	<i>41</i>	<i>100</i>	<i>5</i>	<i>12,2</i>
Лютеиновая киста	5	–	–	–	–
	4	–	–	–	–
	3	12	37,5	2	16,7
	2	20	62,5	–	–
	<i>ВСЕГО</i>	<i>32</i>	<i>100</i>	<i>2</i>	<i>6,3</i>

В фолликулярной стадии полового цикла количество ооцитов пригодных к культивированию вне организма с оценкой 4 и 5 баллов составило 55,3 %; в лютеиновой – 49,2 %; из яичников с персистентным желтым телом – 57,9 %; из яичников с фолликулярной кистой – 19,5 % (только с оценкой 4 балла). От коров с гипофункцией и с лютеиновой кистой полноценных клеток не выделено.

Из яичников фолликулярной стадии полового цикла извлечено 28,6 % ооцитов с фрагментированным первым полярным тельцем или его отсутствием и гранулярной цитоплазмой с присутствием одиночных мелких вакуолей; из яичников лютеиновой стадии – 37,5 %; из группы яичников с персистентным желтым телом – 26,3 %; с наличием фолликулярной кисты – 31,7 %, лютеиновой – 37,5 %.

Больше всего клеток с аналогичными нарушениями выделено из яичников с гипофункцией – 77,6 %. Доля ооцитов с отсутствием перивителлинового пространства или его наличием с мелкой или крупной фрагментацией, отсутствием первого полярного тельца и гранулярной цитоплазмой с присутствием вакуолей составила от 13,3 до 62,5 % от всей популяции ОКК. Из яичников в лютеиновой стадии было получено таких ооцитов – 13,3 %, в фолликулярной стадии и с персистентным желтым телом – 16,1 и 15,8 %, а при наличии фолликулярной и лютеиновой кист этот показатель увеличивался до 48,8 и 62,5 % соответственно.

Уровень дробления по всем исследуемым группам колебался от 6,3 % при использовании яичников с лютеиновой кистой до 52,7 % из яичников в фолликулярной стадии.

Наилучший уровень дробления был отмечен при культивировании ооцитов из яичников коров в лютеиновой и фолликулярной стадиях с наивысшей оценкой (5 баллов) 75,0–78,9 %. В группе ооцитов полученных из яичников с персистентным желтым телом и оцененных на 5 баллов уровень дробления составил 59,3 %. Аналогичная тенденция наблюдалась по уровню дробления среди исследуемых групп с оценкой 4 балла: фолликулярная стадия – 74,4 %, лютеиновая стадия – 63,8, персистентное желтое тело – 47,1 % и фолликулярная киста – 37,5 %.

Таким образом, установлено, что из яичников в фолликулярной, лютеиновой стадиях полового цикла и с персистентным желтым телом можно получить 47,1–78,9 % зигот, пригодных к культивированию до преимплантационных стадий и проведению других манипуляций вне организма. Яичники в состоянии гипофункции, с наличием фолликулярной и лютеиновой кист использовать для этих целей не целесообразно.

Определена степень влияния цитогенетических особенностей яйцеклеток крупного рогатого скота на их созревание и ранний эмбриогенез в культуре *in vitro*. Одним из основных факторов, определяющих эти особенности, является стадия развития ядерного материала ооцита перед оплодотворением. Готовность ооцитов к оплодотворению определяется достижением стадии метафазы II мейоза, а эффективность всех мероприятий вне организма по количеству клеток созревших до этой стадии и уровню дробления.

Проведен анализ 318 ооцитов (табл. 2), часть ооцитов оценивались по разработанной нами балльной шкале, часть – путем изготовления цитогенетических препаратов по методу Тарковского.

Таблица 2. Влияние цитогенетических особенностей яйцеклеток на их созревание и ранний эмбриогенез в культуре *in vitro*

Оценка ооцита, балл	Поставлено на созревание, n	Созрело до метафаза II, n-%	Оплодотворено, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
5	31	29–93,6	29	25–80,7	5–16,1
контроль*	32	29–90,6	29	26–81,3	6–18,8
ВСЕГО	63	58–92,1	58	51–81,0	11–17,5
4	42	34–81,0	34	27–64,3	6–14,3
контроль*	30	24–80,0	24	19–63,3	4–13,3
ВСЕГО	72	58–80,6	58	46–63,9	10–13,9
3	44	21–47,7	21	19–43,2	2–4,6
контроль*	52	25–48,1	25	21–40,4	3–5,8
ВСЕГО	96	46–48,0	46	40–41,7	5–5,2
2	43	7–16,3	7	1–2,3	–
контроль*	44	6–13,6	6	2–4,6	–
ВСЕГО	87	13–14,9	13	3–3,5	–
ИТОГО	318	175–55,0	175	140–44,0	26–8,2

* – анализ ядерного материала ооцит-кумулусных комплексов по методу Тарковского.

Уровень созревания ооцитов до стадии метафаза II в группе с оценкой 5 баллов составил 93,6 %, а с оценкой по методу Тарковского – 90,6 %. При этом подробилось 80,7 % и 81,3 % эмбрионов, развилось до преимплантационных стадий 16,1 % и 18,8 % соответственно. По группе ооцитов с оценкой 4 балла были получены результаты незначительно ниже, но в целом наблюдалась аналогичная картина. Так, созрело до метафазы II 81,0 % в подгруппе с оценкой по цитологическим параметрам и 80,0 % с оценкой по методу Тарковского. При оплодотворении 34 ооцитов, оцененных по цитологическим параметрам, было

получено 64,3 % дробящихся эмбрионов, а выход морул-бластоцист составил 14,3 %. В подгруппе, оцененной по методу Тарковского, уровень дробления составил 63,3 %, а выход жизнеспособных эмбрионов на стадии морула-бластоциста – 13,3 %. Всего в группах с оценками 4 и 5 баллов созрело до метафазы II 116 ооцитов или в среднем 85,9 % при уровне дробления 71,9 %, и выходе преимплантационных эмбрионов – 15,6 %. Значительно ниже по всем показателям наблюдались результаты в группе с оценкой 3 балла. Так, уровень созревания до стадии оплодотворения составлял 47,7 % в подгруппе с балльной оценкой и 48,1 % в подгруппе с оценкой по методу Тарковского. При этом в среднем по группе уровень дробления клеток достигал 41,7 %, а выход жизнеспособных эмбрионов – 5,2 %. В группе с оценкой в 2 балла всего до стадии метафаза II созрело 14,9 % клеток, уровень дробления составил 3,5 %, а преимплантационных эмбрионов не было получено вообще. По результатам всей серии опытов было получено 26 (8,2 %) эмбрионов на преимплантационных стадиях, средний уровень дробления составил 44,0 %, а до стадии метафаза II созрело 55,0 % (175) поставленных на культивирование ооцит-кумулусных комплексов.

Таким образом, при определении степени влияния цитогенетических особенностей яйцеклеток на выход жизнеспособных эмбрионов крупного рогатого скота установлено, что классификация яйцеклеток по цитологическим параметрам дает возможность прогнозировать уровень дробления и выход преимплантационных эмбрионов без изготовления цитогенетических препаратов для анализа ядерного материала ооцит-кумулусных комплексов по методу Тарковского и получить 80,0–93,6 % созревших до стадии оплодотворения (метафаза II) ооцитов с уровнем дробления 63,3–81,3 %, при этом можно получить 13,3–18,8 % пригодных для трансплантации эмбрионов.

Заключение. Наилучший уровень дробления отмечен при культивировании ооцитов из яичников в лютеиновой и фолликулярной стадиях с наивысшей оценкой (5 баллов) 75,0–78,9 %. В группе ооцитов, полученных из яичников с персистентным желтым телом и оцененных на 5 баллов, уровень дробления составил 59,3 %. Аналогичная тенденция наблюдалась по уровню дробления среди исследуемых групп с оценкой 4 балла: фолликулярная стадия – 74,4 %, лютеиновая стадия – 63,8, персистентное желтое тело – 47,1 % и фолликулярная киста – 37,5 %. Таким образом, из яичников в фолликулярной, лютеиновой стадиях полового цикла и с персистентным желтым телом можно получить 47,1–78,9 % зигот, пригодных к культивированию до преим-

плантационных стадий. Яичники в состоянии гипофункции, с наличием фолликулярной и лютеиновой кист использовать для этих целей нецелесообразно.

Изучено влияние цитогенетических особенностей ооцитов коров на их созревание и ранний эмбриогенез в культуре *in vitro*. Установлено, что классификация яйцеклеток по цитологическим параметрам дает возможность прогнозировать уровень дробления и выход преимплантационных эмбрионов без изготовления цитогенетических препаратов для анализа ядерного материала ооцит-кумулюсных комплексов по методу Тарковского и получать 80,0–93,6 % созревших до стадии оплодотворения (метафаза II) ооцитов с уровнем дробления 63,3–81,3 % и 13,3–18,8 % пригодных для трансплантации эмбрионов. Результаты исследований могут быть использованы в технологии получения ранних эмбрионов крупного рогатого скота вне организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Состояние и перспективы направлений исследований в области клеточных репродуктивных технологий / А. И. Ганджа [и др.] // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сб. науч. статей по материалам XIX Междунар. науч.-практ. конф. (Гродно, 19, 13 мая 2016 года). – Гродно, 2016. – Ветеринария. Зоотехния. – С. 133–134.
2. Ebner T, Moser M, Sommergruber M et al. Occurance and developmental consequences of valvules throughout preimplantation development. *Fertil Steril* 2005; 83: 1635–40.
3. Levi M, Kaplan-Kraicer R, Shalgi R. Regulation of division in mammalian oocytes: implications for polar body formation. *Mol Hum Reprod* 2011; 17 (5): 328–34.
4. Морфологическое состояние извлеченных ооцитов коров и критерии их классификации / В. П. Симоненко [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. – Горки : БГСХА, 2019. – Вып. 22, ч. 1. – С. 3–8.
5. Цитологические особенности ооцитов коров в связи с физиологическим состоянием яичников / А. И. Ганджа [и др.] // Научное обеспечение животноводства Сибири: материалы III Международной научно-практической конференции (г. Красноярск, 16–17 мая 2019 г.). – Красноярск, 2019. – С. 108–112.
6. Conner SJ, Lefievre L, Hughes DC et al. Cracking the eggs: increased complexity in the zona pellucida. *Hum Reprod* 2005; 20: 1148–52.
7. Kaji K, Kudo A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 2004; 127: 423–9.
8. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 263–70.
9. Ebner T, Shebl O, Moser M et al. Developmental fate of ovoid oocytes. *Hum Reprod* 2008; 23 (1): 62–6.
10. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs. *Cytogenetic*. 1966. vol. 1 p. 394–400.