

РАЗВЕДЕНИЕ, СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

УДК 636.2.034:612.02

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗВЛЕЧЕННЫХ ООЦИТОВ КОРОВ И КРИТЕРИИ ИХ КЛАССИФИКАЦИИ

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

*РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук по животноводству»,
г. Жодино, Республика Беларусь, 222160*

(Поступила в печать 29.01.2019 г.)

Проведен мониторинг и разработана шкала оценки яйцеклеток коров по цитологическим параметрам: размер ооцита, состояние оболочки, перивителлинового пространства, первого полярного тельца, цитоплазмы, вакуолей.

Ключевые слова: ооцит, оболочка, цитоплазма, полярное тельце, вакуоль.

Monitoring and assessment of assessment scale for cow oocytes was carried out using cytological parameters: size of oocytes, state of the shell, perivitelline space, first polar body, cytoplasm and vacuoles.

Keywords: oocyte, envelope, cytoplasm, polar body, vacuole.

Введение. Успешное развитие клеточных репродуктивных технологий предполагает не только совершенствование технологических этапов, но и глубокое изучение морфологических и цитологических параметров гамет, их мониторинг с последующим анализом. Это позволит увеличить выход преимплантационных эмбрионов вне организма, что по-прежнему остается актуальным вопросом в плане сохранения генофонда крупного рогатого скота.

Анализ источников. Для оплодотворения и развития эмбриона существенное значение имеет качество женских половых клеток. Качество ооцита является важным прогностическим фактором, так как ядерная и цитоплазматическая зрелость клетки напрямую связаны с эффективностью экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Однако часто наблюдается появление ооцитов с различными повреждениями. Аномалии ооцита можно условно разделить на две группы: экстрацитоплазматические и цитоплазматические. К экстрацитоплазматическим аномалиям относят нарушение строения и формы зоны пеллюци-

да, дебрис в перивителлиновом пространстве и его резкое увеличение, аномалии первого полярного тела (увеличение в размере, дегенерация, мультифрагментация), а также нарушение симметрии оолеммы ооцита [1–5]. К цитоплазматическим аномалиям относят гранулярность цитоплазмы, агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулула, рефрактерные тела, вакуоли, нарушение вязкости цитоплазмы [6–8].

Мониторинг перечисленных цитологических параметров извлеченных ооцитов коров до созревания и после 24 часов культивирования способствует объективной оценке репродуктивного потенциала доноров и позволяет прогнозировать результаты предстоящего экстракорпорального оплодотворения на начальном этапе.

Цель работы – изучить морфологическое состояние извлеченных ооцитов коров после убоя и культивирования, разработать критерии их классификации и шкалу оценки.

Материал и методика исследований. 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. После выделения ооцитов их поиск осуществляли под бинокулярным микроскопом МБС-10 при 16- и 56-кратном увеличении. Созревание клеток осуществлялось в CO_2 -инкубаторе в течение 24 часов при максимальной влажности и содержании 5 % CO_2 в воздухе.

Мониторинг популяции ооцитов, извлеченных из яичников убитых коров, проводили после удаления клеток кумулюса и лучистого венца под действием гиалуроновой кислоты или трипсина с помощью микроскопа (максимальное увеличение $\times 400$) 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. Эти же показатели изучали у популяции ооцитов после 24-часового созревания. Согласно изученным цитологическим параметрам разработаны критерии классификации яйцеклеток коров по 5-балльной шкале.

Результаты исследований и их обсуждение. Проведен мониторинг популяции ооцитов, извлеченных из яичников убитых коров, по особенностям их строения. Так, при анализе свежевыделенных ооцитов (табл. 1) отмечалось разнообразие их размеров. Минимальный размер ооцита составил 116,33 мкм, а максимальный 164,09 мкм при

среднем показателе 140,39 мкм. У 25,5 % свежевыделенных ооцитов отмечалось наличие зародышевого пузырька. Перивителлиновое пространство обнаружено у двух клеток, у одной из которых оно было с мелкими гранулами, а у другой с крупными фрагментами, но в обоих клетках отсутствовало первое полярное тельце.

Таблица 1. Свежевыделенные ооциты

Показатели		Значения	
		п	%
Размер ооцита, мкм	максимальный	164,09	
	средний	140,39	
	минимальный	116,33	
Толщина оболочки, мкм	максимальная	16,98	
	средняя	12,52	
	минимальная	7,45	
Наличие зародышевого пузырька		25	25,5
Перивителлиновое пространство	наличие	2	2,04
	мелкие гранулы	1	1,02
	крупные фрагменты	1	1,02
Первое полярное тельце	одиночное	–	–
	фрагментированное	–	–
Цитоплазма	гомогенная	38	38,8
	гранулярная	60	61,2
Вакуолизация цитоплазмы	отсутствует	24	24,5
	1 большая вакуоль	12	12,2
	много мелких вакуолей	45	45,9
	одиночные мелкие вакуоли	29	29,6

По структуре цитоплазмы клетки были разделены на гомогенную и гранулярную. Так, гомогенную структуру цитоплазмы имели 38,8 % ооцитов, а гранулярную – 61,2 %.

Вакуолизация цитоплазмы отсутствовала у 24,5 % ооцитов, 12,2 % клеток имели в своей структуре одну большую вакуоль, 45,9 % – много мелких и 29,6 % – единичные мелкие. Однако 12 ооцитов из 98 в своей структуре имели наряду с одной крупной много мелких либо единичные мелкие вакуоли.

При анализе ооцитов после 24-часового созревания (табл. 2) установлено, что средний размер клетки составил 139,90 мкм и практически не отличался от свежевыделенных клеток (140,39). Максимальный размер клетки увеличился после созревания на 35,11 мкм, а минимальный – уменьшился на 1,81 мкм в среднем по всей популяции ооцитов.

Наличие зародышевого пузырька отмечалось у 10,8 % ооцитов, это на 14,7 % меньше по сравнению с незрелыми клетками, что говорит о их развитии и подготовке к стадии оплодотворения.

После 24-часового созревания 92,2 % ооцитов имеют перивителлиновое пространство, однако 60,6 % из них имеют гранулярность в своей структуре. Первое полярное тельце одинарное, овальной формы

обнаружено только у 17 ооцитов, что составило 16,7 % от числа всей популяции ооцитов.

Таблица 2. Ооциты после созревания

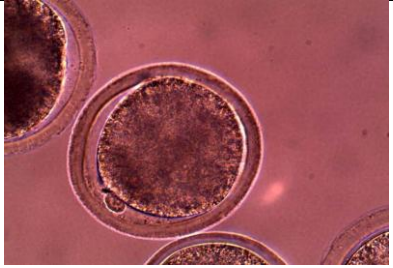
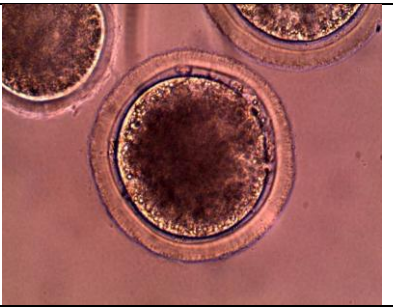
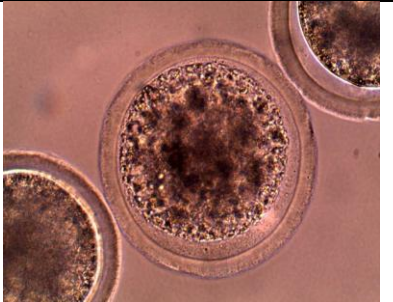
Показатели		Значения	
		п	%
Размер ооцита, мкм	максимальный	199,20	
	средний	139,90	
	минимальный	114,52	
Толщина оболочки, мкм	максимальная	16,77	
	средняя	12,01	
	минимальная	7,74	
Наличие зародышевого пузырька		11	10,8
Перивителлиновое пространство	наличие	94	92,2
	мелкие гранулы	53	52,0
	крупные фрагменты	4	3,9
Первое полярное тельце	одиночное	17	16,7
	фрагментированное	12	11,8
Цитоплазма	гомогенная	67	65,7
	гранулярная	35	34,3
Вакуолизация цитоплазмы	отсутствует	42	41,2
	1 большая вакуоль	4	3,9
	много мелких вакуолей	32	31,4
	одиночные мелкие вакуоли	27	26,5

Гомогенная цитоплазма отмечалась у 65,7 % созревших ооцитов, что на 26,9 % больше чем у ооцитов до созревания. За время созревания гранулярность цитоплазмы уменьшилась с 61,2 % до 34,3 % клеток с отсутствием вакуолей в цитоплазме через 24 часа увеличилось с 24,5 % до 41,2 %, т. е. на 16,7 %.

Таким образом, популяция ооцитов, выделенных из яичников выбракованных высокопродуктивных коров, по особенностям их строения имеет следующие характеристики: до созревания – средний размер ооцита составляет 140,39 мкм, средняя толщина оболочки – 12,52 мкм, 10,8 % клеток имеют зародышевый пузырек, 38,8 % с гомогенной цитоплазмой и 24,5 % клеток с отсутствием вакуолизации в цитоплазме; после созревания – средний размер ооцита составляет 139,90 мкм, средняя толщина оболочки – 12,01 мкм, 92,2 % клеток имеют перивителлиновое пространство, 16,7 % ооцитов имеют одиночное первое полярное тельце, гомогенная цитоплазма отмечена у 65,7 % клеток, а вакуолизация цитоплазмы отсутствует у 41,2 % ооцитов.

По результатам исследований разработана 5-балльная шкала оценки яйцеклеток коров (n=291) перед оплодотворением по цитологическим параметрам. В основу разработанной шкалы вошли такие критерии, как размер ооцита, равномерность по толщине оболочки, наличие или отсутствие перивителлинового пространства и в нем включений, наличие или отсутствие первого полярного тельца, его форма и структура, состояние цитоплазмы, наличие в ней вакуолей (табл. 3) .

Таблица 3. Шкала оценки ооцитов

Балл	Характеристика ооцита	рисунок
5	размер ооцита – 130–150 мкм; толщина оболочки – 11–13 мкм, равномерная; наличие перивителлинового пространства без включений; одинарное первое полярное тельце, овальной формы; цитоплазма однородная с отсут- ствием вакуолей.	
4	размер ооцита – 130–150 мкм; толщина оболочки – 10–14 мкм, неравномерная; наличие перивителлинового про- странства с единичным включе- нием мелких гранул; одинарное первое полярное тельце, овальной или округлой формы; цитоплазма однородная с отсут- ствием вакуолей	
3	размер ооцита – 120–160 мкм; толщина оболочки – 10–14 мкм, неравномерная; наличие перивителлинового пространства с включение мел- ких гранул; фрагментированное первое по- лярное тельце или его отсутст- вие; цитоплазма гранулярная с при- сутствием одиночных мелких вакуолей	
4	размер ооцита – 90–180 мкм; толщина оболочки – 8–15 мкм, неравномерная; отсутствие или наличие периви- теллинового пространства с мелкой или крупной фрагмента- цией; отсутствие первого полярного тельца; цитоплазма гранулярная с при- сутствием вакуолей	

По результатам проведенного анализа 31 ооцит (10,7 %) имел оценку 5 баллов, 34 ооцита (11,7 %) – оценку 4 балла, 117 ооцитов (40,2 %) оценку 3 балла и 109 клеток (37,5 %) – 2 балла.

Заключение. Проведен мониторинг популяции ооцитов, извлеченных из яичников убитых коров по особенностям их строения. Установлено, что клетки имеют следующие характеристики: до созревания – средний размер ооцита составляет 140,39 мкм, средняя толщина оболочки – 12,52 мкм, 10,8 % клеток имеют зародышевый пузырек, 38,8 % с гомогенной цитоплазмой и 24,5 % клеток с отсутствием вакуолизации в цитоплазме; после созревания – средний размер ооцита составляет 139,90 мкм, средняя толщина оболочки – 12,01 мкм, 92,2 % клеток имеют перивителлиное пространство, 16,7 % ооцитов имеют одиночное первое полярное тельце, гомогенная цитоплазма отмечена у 65,7 % клеток, а вакуолизация цитоплазмы отсутствует у 41,2 % ооцитов.

Разработаны критерии классификации яйцеклеток коров по цитологическим параметрам. В основу разработанной 5-балльной шкалы оценки вошли такие критерии как размер ооцита, равномерность по толщине оболочки, наличие или отсутствие перивителлинового пространства и в нем включений, наличие или отсутствие первого полярного тельца, его форма и структура, состояние цитоплазмы, наличие в ней вакуолей. При классификации яйцеклеток по 5-балльной шкале оценки, выявлено 37,5% клеток (109) с оценкой 2 балла, 40,2 % (117) – 3 балла, 11,7 % (34) – 4 балла, 10,7 % (31) – 5 баллов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ebner T, Moser M, Sommergruber M et al. Occurance and developmental consequences of valvules throughout preimplantation development. *Fertil Steril* 2005; 83: 1635–40.
2. 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.
3. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D et al. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13 (12): 3425–30.
4. Conner SJ, Lefievre L, Hughes DC et al. Cracking the eggs: increased complexity in the zona pellucida. *Hum Reprod* 2005; 20: 1148–52.
5. Kaji K, Kudo A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 2004; 127: 423–9.
6. Bluhm BA, Brey T, Klages M et al. Occurrence of the autofluorescent pigment, lipofuscin, in polar crustacean and its potential as an age marker. *Polar Biol* 2001; 24: 642–9.
7. 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.
8. Ebner T, Shebl O, Moser M et al. Developmental fate of ovoid oocytes. *Hum Reprod* 2008; 23 (1): 62–6.