

Животноводство и кормопроизводство. 2024. Т. 107, № 4. С. 283-294.
Animal Husbandry and Fodder Production. 2024. Vol. 107, no 4. P. 283-294.

Научная статья
УДК 591.391.1:591.158.1
doi:10.33284/2658-3135-107-4-283

Результаты выделения ооцитов и получения IVP эмбрионов у тёлочек истобенской породы в зависимости от режима проведения ОПУ

Галина Николаевна Сингина¹, Роман Юрьевич Чинаров², Екатерина Николаевна Шедова³, Виктория Александровна Луканина⁴, Анастасия Сергеевна Жукова⁵

^{1,2,3,4,5}Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская область, п. Дубровицы, Россия
¹g_singina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0198-9757>
²roman_chinarov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6511-5341>
³shedvek@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9642-2384>
⁴kristybatle@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4744-7873>
⁵anastasia.s.belyaeva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1155-014X>

Аннотация. Получение эмбрионов *in vitro* (*in vitro embryo production, IVP*) с использованием ооцитов, выделенных посредством трансвагинальной пункции фолликулов (*ovum pick up, OPU*) является эффективным методом разведения и сохранения пород крупного рогатого скота (КРС). Цель исследования заключалась в оценке влияния индивидуального фактора донора на показатели результативности ОПУ/IVP-технологии у истобенской породы КРС и зависимости такого влияния от режима проведения ОПУ. Процедуру выполняли на половозрелых тёлках (n=7) в режиме 2 (2W) и 1 (1W) раз в неделю. Всего для каждого донора в рамках сравниваемых режимов было проведено 8-9 последовательных сеансов ОПУ. Индивидуальный фактор донора влиял на количество аспирированных фолликулов и выделенных ооцитов на одну сессию ОПУ (которые варьировали от 4,8 до 13 фолликулов и от 1,7 до 8,4 ооцита соответственно), а также на способность полученных половых клеток к эмбриональному развитию в условиях *in vitro*. Максимальное значение доли развития бластоцист составило 32 %, минимальное – 5,3 %. Количество бластоцист на одну сессию ОПУ находилось в диапазоне от 0,1 до 1,9 эмбриона. Влияние режима ОПУ в рамках отдельных доноров наблюдалось на количество аспирированных фолликулов (у двух тёлочек) в пользу 2W и на качество выделенных ооцитов (у одной тёлочки) в пользу 1W. Существенных различий между режимами по количеству выделенных ооцитов, а также по их способности развиваться после экстракорпорального оплодотворения до стадии бластоцисты выявлено не было.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, истобенская порода, ovum pick up, ооциты, получение эмбрионов *in vitro*

Благодарности: работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста (№ FGGN-2023-0004).

Для цитирования: Результаты выделения ооцитов и получения IVP эмбрионов у тёлочек истобенской породы в зависимости от режима проведения ОПУ / Г.Н. Сингина, Р.Ю. Чинаров, Е.Н. Шедова, В.А. Луканина, А.С. Жукова // Животноводство и кормопроизводство. 2024. Т. 107, № 4. С. 283-294. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-107-4-283>

Original article

Results of oocyte isolation and obtaining IVP embryos from heifers of Istoben breed depending on OPU regimen

Galina N Singina¹, Roman Yu Chinarov², Ekaterina N Shedova³, Victoria A Lukanina⁴, Anastasia S Zhukova⁵

^{1,2,3,4,5} Federal Research Center for Animal Husbandry – VIJ named after Academy Member L.K. Ernst, Moscow region, Dubrovitsy, Russia

¹g_singina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0198-9757>

²roman_chinarov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6511-5341>

³shedvek@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9642-2384>

⁴kristybatle@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4744-7873>

⁵anastasia.s.belyaeva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1155-014X>

Abstract. In vitro embryo production (IVP) using oocytes obtained through transvaginal follicular aspiration (ovum pick up, OPU) is a widely recognized tool for breeding and preserving cattle breeds. The aim of this study was to assess the influence of individual donor factors on the efficiency of the OPU/IVP technique in the Istoben breed of cattle and the dependency of this influence on the OPU frequency. The procedure was performed on mature heifers (n=7) in the regimen of 2 (2W) and 1 (1W) times per week. Each donor underwent 8-9 consecutive OPU sessions for each compared frequency. The individual donor factor influenced the number of aspirated follicles and retrieved oocytes per OPU session (ranging from 4.8 to 13 follicles and 1.7 to 8.4 oocytes, respectively), as well as the ability of the retrieved germ cells to embryonic development in vitro. The maximum value of the blastocyst development share was 32%; the minimum was 5.3%. The number of blastocysts per OPU session ranged from 0.1 to 1.9 embryos. The effect of the OPU regimen within individual donors was observed on the number of aspirated follicles (in two heifers) in favor of 2W and on the quality of retrieved oocytes (in one heifer) in favor of 1W. No significant differences between the regimens were found in the number of retrieved oocytes or their ability to develop after in vitro fertilization to the blastocyst stage.

Keywords: cattle, Istoben breed, ovum pick up, oocytes, obtaining embryos in vitro

Acknowledgments: the work was performed in accordance to the plan of research works of the FGBNU FRC VIZh named after academician L.K. Ernst (No FGGN-2023-0004).

For citation: Singina GN, Chinarov RYu, Shedova EN, Lukanina VA, Zhukova AS. Results of oocyte isolation and obtaining IVP embryos from heifers of Istoben breed depending on OPU regimen. *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2024;107(4):283-294. (In Russ.). <https://doi.org/10.33284/2658-3135-107-4-283>

Введение.

Репродуктивная биотехнология, направленная на получение эмбрионов *in vitro* (*in vitro embryo production, IVP*), как и метод *in vivo* (Бабенков В.Ю. и др., 2023) является эффективным способом разведения и сохранения генетических ресурсов у крупного рогатого скота (КРС), так как позволяет получать большее количество потомства от ценных и уникальных матерей. Данная технология подразумевает извлечение половых клеток (ооцитов) из фолликулов яичников самок, их созревание и оплодотворение *in vitro*, а также последующее культивирование зигот до стадии, пригодной для трансплантации или заморозки (Ferré LB et al., 2020) При этом основным способом выделения ооцитов является трансвагинальная аспирация фолликулов (*ovum pick up, OPU*). В силу ряда особенностей, к которым можно отнести отсутствие необходимости в гормональной стимуляции яичников, возможность получать половые клетки от доноров с нарушенным половым циклом и животных, имеющих патологии яйцевода, а также тех, кто не реагирует на гормональную стимуляцию (Чинаров Р.Ю., 2024), использование OPU особенно актуально при работе по получению эмбрионов у пород, имеющих ограниченное число чистопородных доноров.

В настоящее время наблюдается критическое сокращение популяции истобенской породы – чёрно-пёстрого скота молочного типа, которая характеризуется неприхотливостью к условиям содержания, устойчивостью к инфекциям и долгим сроком жизни (Мокерова Е.В., 2024). Численность популяции, по данным на 2022 год, составляла около 800 голов (Abdelmanova AS et al., 2022), что указывает на возможность утери её ценных биологических и хозяйственных признаков, а также необходимость в разработке мероприятий по сохранению данной популяции, в том числе с использованием OPU/IVP технологии.

Известно, что эффективность OPU/IVP-технологии зависит от ряда технологических и биотехнологических факторов (Baruselli PS et al., 2022), которые зачастую опосредованы индивидуальными особенностями доноров (Monteiro FM et al., 2017; Watanabe YF et al., 2017) и их породной принадлежностью (Pontes JHF et al., 2010). То есть применение OPU/IVP-технологии в программах сохранения отдельных пород, особенно таких, как истобенская, для которых мероприятия по получению *in vitro* эмбрионов ранее не проводились, требует предварительных исследований, направленных на оптимизацию её отдельных этапов и выявлению факторов, влияющих на эффективность данной репродуктивной биотехнологии.

Цель исследования.

Изучить влияние индивидуальных особенностей животных-доноров на эффективность OPU/IVP-технологии у истобенской породы крупного рогатого скота и зависимость такого влияния от режима проведения трансвагинальной аспирации фолликулов (один или два раза в неделю). Оценить действие тестируемых факторов как на количество и качество, выделенных ооцитов, так и на их компетенцию к созреванию и последующему эмбриональному развитию в условиях *in vitro*.

Материалы и методы исследования.

Объект исследования. Половозрелые тёлки-доноры истобенской породы КРС (*Bos taurus taurus*), полученные от доноров методом OPU ооциты, а также развившиеся из них IVP эмбрионы.

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями и рекомендациями российских нормативных актов, протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009). При проведении исследований были предприняты меры для обеспечения минимума страданий животных и уменьшения количества исследуемых опытных образцов.

Схема эксперимента. Исследования по OPU, получению ооцитов и IVP -эмбрионов проводили в ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста (<https://www.vij.ru/>) в ноябре-декабре 2023 года и феврале-марте 2024 года. В ноябре-декабре OPU выполняли два раза в неделю (в понедельник и четверг, 2W) с интервалом в 3 или 4 дня. В феврале-марте – один раз в неделю по понедельникам (1W). Всего в эксперименте участвовало 7 тёлочек-доноров, на которых в рамках каждого режима было проведено по 8-9 последовательных сеансов OPU. Рационы животных были сбалансированы по энергии, питательным и биологически активным веществам в соответствии с нормами потребностей.

Процедуру OPU проводили в соответствии с разработанным протоколом, используя систему для OPU у крупного рогатого скота (Чинаров Р.Ю. и др., 2023). В рамках одной сессии OPU аспирировали все видимые фолликулы. В качестве аспирационного раствора использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ), с добавлением фетальной бычьей сыворотки (ФБС), гепарина и антибиотика (Сингина Г.Н. и др., 2023). Аспираты от каждого донора (1 сессия OPU) пропускали индивидуально через фильтр, промывали с использованием ФСБ, дополненного 1 % ФБС, после чего осуществляли поиск и морфологическую оценку качества ооцитов как описано ранее (Сингина Г.Н. и др., 2023). Для дальнейшей работы отбирали ооциты с гомогенной или умеренно гетерогенной цитоплазмой, окруженные одним и более слоев кумулюсных клеток (КК) или частично окруженные КК. Ооциты, имеющие неоднородную цитоплазму с признаками грануляции или лизиса, голые клетки, а также созревшие считались непригодными для получения IVP эмбрионов и

выбраковывались. Результативность каждой сессии OPU оценивали по количеству аспирированных фолликулов и выделенных ооцитов на одну сессию OPU, доле извлечения ооцитов, а также количеству и проценту ооцитов категорий качества пригодных для культивирования.

Отобранные ооциты культивировали (от каждого донора индивидуально) с целью их созревания *in vitro* (*in vitro maturation, IVM*) в среде TC-199 с добавлением фетальной бычьей сыворотки (10 %), пирувата натрия (0,5 мМ), фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов (по 10 мкг/мл), эпидермального фактора роста (20 нг/мл) и гентамицина (50 мкг/мл). Затем созревшие ооциты подвергали процедуре экстракорпорального оплодотворения (*in vitro fertilization, IVF*) (Сингина Г.Н. и др., 2023).

Для IVF использовали размороженную сперму 2 быков истобенской породы, которую предварительно подвергали процедуре *swim up*, как описано ранее (Сингина Г.Н. и др., 2016). Сперматозоиды вносили в среду оплодотворения BO-IVF от фирмы «IVF Bioscience», с предварительно перенесенными туда ОКК до конечной концентрации $1,5 \times 10^6$ сперматозоидов на 1 мл.

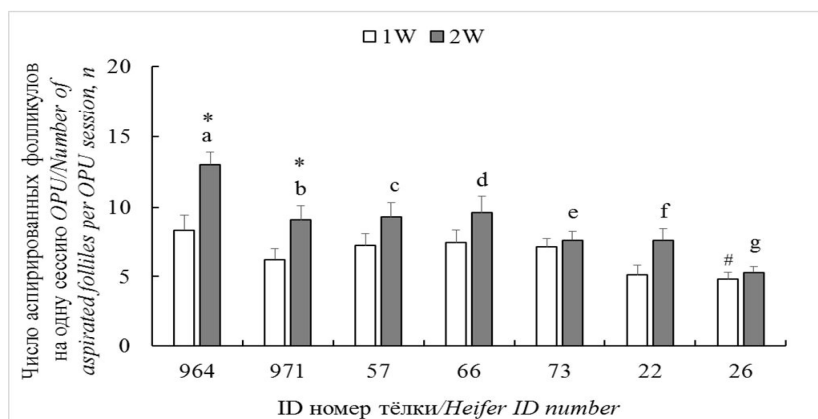
Половые клетки совместно культивировали в течение 10-11 ч, затем ооциты освобождали от клеток кумулюса и налипших сперматозоидов и проводили морфологическую оценку изолированных ооцитов, оценивая количество яйцеклеток с направительными тельцами и, определяя процент созревания. Предполагаемые зиготы переносили в среду эмбрионального развития. Через 3-е суток после оплодотворения ооцитов проводили смену среды и морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-е сутки культивирования оценивали число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты.

Оборудование и технические средства. В комплект системы OPU входил ультразвуковой сканер Versana 1104 Active с конвекциональным широкополосным зондом (частота 5 МГц) и держателем зонда («GE HealthCare», США), а также вакуумный насос («Minitube», Германия). Культивирование ооцитов с целью их созревания и оплодотворения осуществлялось в инкубаторе MCO-18AIC (Sanyo, Япония), поддерживающем 5 % CO₂ в воздухе, культивирование зигот до стадии бластоцисты в инкубаторе MCO-50M-PE (Sanyo, Япония) в присутствии 5 % CO₂, 5 % O₂ и 90 % N₂ в атмосфере. Манипуляции с ооцитами и эмбрионами вне инкубаторов проводили под стереомикроскопом (Nikon, Япония), оснащённого нагревательным столиком.

Статистическая обработка. Статистическая обработка данных производилась с использованием программы «SPSS Statistic Version 21» (IBM Corporation, США). Анализ показателей при сравнении режимов OPU (1W/2W) для каждого донора осуществлялся с применением t-критерия Стьюдента для зависимых выборок. Выявление индивидуальных особенностей доноров рассчитывалось с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими парными сравнениями с применением критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при уровне $P \leq 0,05$.

Результаты исследования.

Результаты трансвагинальной аспирации фолликулов у отдельных доноров представлены на рисунке 1. Выявлена зависимость количества аспирированных фолликулов как от индивидуальных особенностей опытных животных, так и от временных параметров проведения OPU. В случае выполнения этой процедуры в режиме 2 раза в неделю (2W) у тёлки с идентификационным номером 964 среднее количество аспирированных фолликулов на 1 сессию OPU имело наибольшее значение ($13,0 \pm 0,9$ фолликулов) и было выше (от $P \leq 0,05$ до $P \leq 0,001$), чем у других 7 доноров. Минимальное количество фолликулов ($5,3 \pm 0,4$) пунктировано у тёлки № 26, которое было ниже не только по сравнению с тёлкой № 964 ($P \leq 0,001$), но и в сравнении с некоторыми другими донорами ($P \leq 0,05$). Когда OPU проводилось раз в неделю (1W) по данному показателю различия между отдельными животными были менее выражены, его максимальное ($8,3 \pm 1,2$ фолликула) и минимальное ($4,8 \pm 0,5$ фолликула) значение сохранялось за теми же телками (№ 964 и 26 соответственно) что и при 2W, и только между ними установлены достоверные отличия ($P \leq 0,05$). У двух (№ 964 и 971) из 7 доноров при режиме 2W показатель количества аспирированных фолликулов на одну сессию OPU был существенно выше, чем при режиме 1W ($P \leq 0,05$).



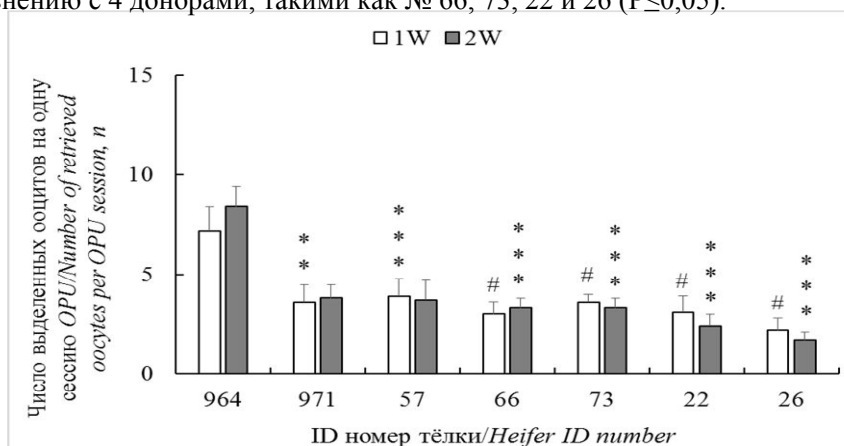
Примечания: – достоверные различия между донорами для 2W: a-f,g – $P \leq 0,001$; a-b,c,d,e – $P \leq 0,05$; g-b,c,d – $P \leq 0,05$; – достоверные различия между донорами для 1W: # – $P \leq 0,05$; – достоверные различия для индивидуальных доноров при сравнении с режимом проведения ОПУ 1 раз в неделю (1W): * – $P \leq 0,05$

Note: – significant differences between donors for 2W: a-f,g – $P \leq 0,001$; a-b,c,d,e – $P \leq 0,05$; g-b,c,d – $P \leq 0,05$; – significant differences for individual donors when compared with the OPU procedure conducted once a week (1W): * – $P \leq 0,05$

Рисунок 1. Результаты аспирации фолликулов у тёлочек истобенской породы при проведении ОПУ в режиме 1 (1W) и 2 раза в неделю (2W)

Figure 1. The results of follicle aspiration in Istoben heifers during OPU procedures conducted once (1W) and twice a week (2W)

Результаты выделения ооцитов из фолликулов яичников представлены на рисунке 2. Количество полученных ооцитов на 1 сессию ОПУ не зависело от режима её проведения (1 раз в неделю или 2 раза в неделю). В то же время между отдельными донорами имелись существенные различия. В случае проведения трансвагинальной аспирации фолликулов 2 раза в неделю наименьшее значение данного показателя наблюдалось у тёлки № 26 ($2,2 \pm 0,6$ ооцита), наибольшее – у тёлки № 964 ($7,2 \pm 1,2$ ооцита), которое в свою очередь было существенно выше чем у всех других доноров (в сравнении с № 971 $P \leq 0,01$, со всеми остальными $P \leq 0,001$). При режиме 1W наименьшее количество выделенных ооцитов на 1 сессию ОПУ было у того же животного ($1,7 \pm 0,4$ ооцита), равно как и наибольшее ($8,4 \pm 1,0$ ооцита), но в отличие от 2W его максимальное значение было выше только по сравнению с 4 донорами, такими как № 66, 73, 22 и 26 ($P \leq 0,05$).



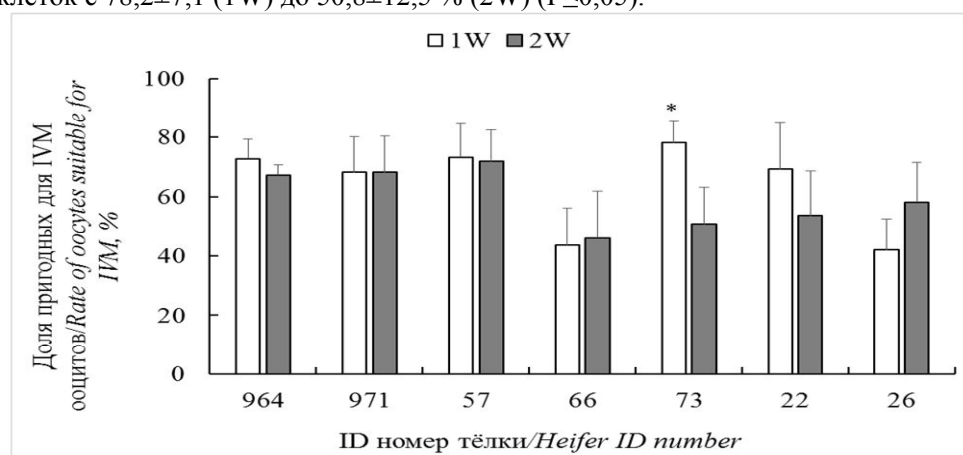
Примечания: – достоверные различия при сравнении с донором № 964 для режима 2W: *** – $P \leq 0,001$; ** – $P \leq 0,01$; – достоверные различия в сравнении с донором № 964 при режиме 1W: # – $P \leq 0,05$

Note: – significant differences compared to donor No. 964 for the 2W regimen: *** – $P \leq 0,001$; ** – $P \leq 0,01$; – significant differences compared to donor No. 964 under the 1W regimen: # – $P \leq 0,05$

Рисунок 2. Результаты выделения ооцитов у тёлочек-доноров истобенской породы при проведении ОПУ в режиме 1 (1W) и 2 раза в неделю (2W)

Figure 2. Results of oocyte isolation from donor heifers of the Istoben breed with OPU conducted once a week (1W) and twice a week (2W)

Оценка качества выделенных ооцитов представлена на рисунке 3. Когда интервал между сеансами OPU составлял 7 дней, доля отобранных для IVM ооцитов от общего числа выделенных клеток на 1 сессию OPU, достоверно не различалась между отдельными донорами: более низкие значения данного показателя были у тёлоч № 66 и 26 ($43,5 \pm 12,6$ и $41,9 \pm 10,7$ % соответственно), у остальных животных исследуемая доля варьировала от $69,3 \pm 15,6$ (тёлочка № 22) до $78,2 \pm 7,1$ % (тёлочка № 73). С изменением режима на 2W отсутствие значимых различий между опытными животными по данному показателю сохранялось. Кроме того, его значения у 6 из 7 доноров не отличались от таковых при 1W. Влияние режима OPU наблюдалось только у донора № 73, в его случае при более частых сессиях происходило ухудшение качества выделенных ооцитов: снижение доли пригодных для IVM клеток с $78,2 \pm 7,1$ (1W) до $50,8 \pm 12,5$ % (2W) ($P < 0,05$).



Примечание: * – $P < 0,05$ при сравнении с режимом 2W

Note: * – $P < 0.05$ compared to the 2W regimen

Рисунок 3. Оценка качества выделенных ооцитов у тёлоч истобенской породы при проведении OPU в режиме 1 (1W) и 2 раза в неделю (2W)

Figure 3. Assessment of obtained oocyte quality in Istoben heifers under 1W (once a week) and 2W (twice a week) OPU regimens

В дальнейшем пригодные для культивирования ооциты были использованы для получения IVP эмбрионов. Компетентность ооцитов к развитию оценивали по уровню созревания и дробления, а также выходу эмбрионов на стадии бластоцисты (табл. 1).

Таблица 1. Созревание и эмбриональное развитие в условиях *in vitro* ооцитов, полученных от тёлоч истобенской породы КРС при различных режимах проведения OPU

Table 1. *In vitro* maturation and embryonic development of oocytes obtained from heifers of Istoben breed under different OPU frequency regimes

ID тёлки/ Heifer ID number	Число ооцитов/ Number of oocytes, n	*Доля созревших ооцитов, %/*Maturation rate, %	*Доля раздробив- шихся ооцитов, %/ *Cleavage rate, %	*Доля ооцитов раз- вившихся до стадии бластоцисты, %/ *Blastocyst rate, %
1	2	3	4	5
Интервал между сессиями OPU в 7 дней (1 раз в неделю) / The interval between OPU sessions is 7 days (1 time per week)				
964	65	$89,3 \pm 4,07$	$75,9 \pm 7,91$	$28,2 \pm 8,56$
73	32	$94,1 \pm 4,07$	$84,4 \pm 6,19^a$	$30,4 \pm 11,4$

Продолжение таблицы 1				
1	2	3	4	5
22	25	93,3±6,70	69,2±15,2	30,8±15,2
26	20	100±0,00	78,6±14,9	14,3±14,3
971	32	80,8±22,6	68,6±7,90	11,9±6,50
57	35	84,4±12,4	57,1±13,1	26,7±8,90
66	27	73,8±14,5	45,2±17,3 ^b	28,6±18,4
Интервал между сессиями OPU в 3-4 дня (2 раза в неделю) / The interval between OPU sessions is 3-4 days (2 times a week) /				
964	76	85,3±4,20	65,6±5,70	29,3±5,90 ^a
73	26	87,5±8,5	70,8±16,4	29,2±13,6 ^a
22	22	92,5±4,8	72,5±16,0	24,2±15,8 ^{ab}
26	15	85,7±14,3	71,4±18,4	33,3±17,8 ^a
971	34	88,8±7,4	61,3±12,7	5,6±3,70 ^b
57	33	91,3±6,4	62,2±12,7	6,3±6,30 ^b
66	28	76,7±14,5	76,7±14,5	32,0±13,3 ^a

Примечания: * – рассчитывалась, исходя из процентов в одной сессии OPU; – значения в столбце с разными индексами достоверно различаются при $P \leq 0.05$

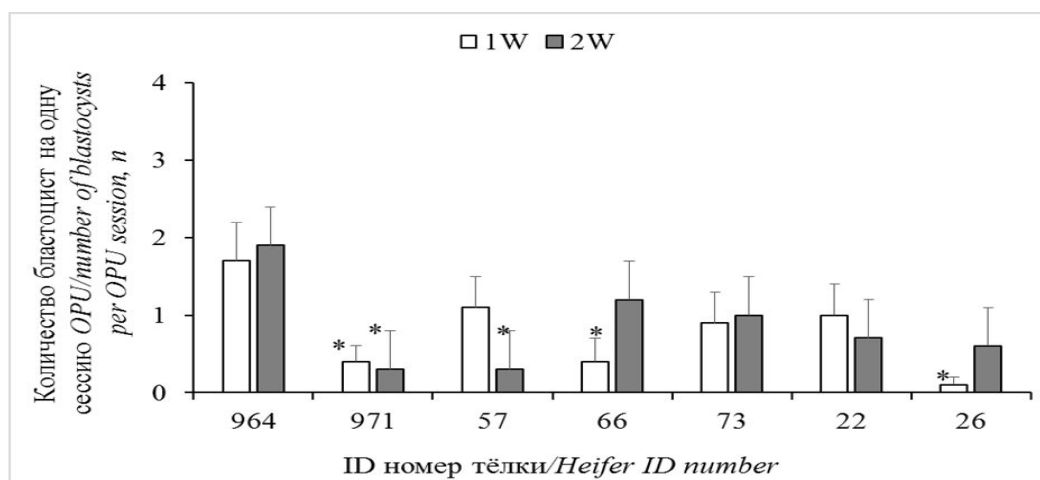
Note: * – calculated based on average OPU per session; – values in a column with different indexes are significantly different at $P \leq 0.05$

Созревание ооцитов *in vitro* не зависело от индивидуальных особенностей животных. Доля созревших ооцитов, а именно отношение ооцитов с полярными тельцами к исходному количеству отобранных для IVF клеток была высокой и в случае использования режима 1w варьировала от 73 (тёлка № 66) до 100 % (тёлка № 26). Не изменялся данный показатель у отдельных животных и в случае перехода с режима OPU 2 раз в неделю на 1 раз в неделю.

Отсутствие достоверных различий между донорами также наблюдалось и по уровню дробления созревших ооцитов после их экстракорпорального оплодотворения (табл. 1), когда OPU проводилось 2 раза в неделю: минимальное значение данного показателя было у тёлки № 971 (61 %), максимальное – у тёлки № 66 (76 %). При более редком режиме наибольшая доля дробления была на уровне 84 % (тёлка № 73), наименьшая составила 45 % (тёлка № 66), и они значимо отличались друг от друга ($P \leq 0,05$).

Полученные от отдельных доноров ооциты, в основном обладали сходной компетентностью к развитию до стадии бластоцисты: стадии, на которой эмбрионы могут быть пересажены животным-реципиентам или заморожены (табл. 1). Тем не менее, в случае проведения OPU 2 раза в неделю у животных с номерами 971 и 57 доля развития бластоцист была ниже ($P \leq 0,05$), чем у доноров с номерами 964, 73, 26 и 66 ($P \leq 0,05$). Кроме того, у тёлки № 57 данный показатель был меньше, чем при режиме 1W ($P \leq 0,05$).

Итоговую эффективность OPU/IVF технологии оценивали по количеству бластоцист на одну сессию OPU. Результаты представлены на рисунке 4. Наибольшее количество (1,9) бластоцист было получено у тёлки № 964 при режиме 2W, которое было сходно с таковым при 1W (1,7 бластоцисты). Существенно более низкие значения данного показателя по сравнению с этой тёлкой в рамках 2-кратного режима наблюдались у доноров с номерами 971 и 57 ($P \leq 0,05$), в случае однократного – у животных с номерами 971, 57, 66 и 26 ($P \leq 0,05$). Между другими донорами различий выявлено не было, равно как и зависимости для каждого животного эффективности OPU/IVF технологии от режима проведения трансвагинальной аспирации фолликулов.



Примечание: – достоверные различия в сравнении с донором № 964 в рамках режимов 1W и 2W: * – $P \leq 0,05$

Note: – significant differences compared to donor No. 964 within the 1W and 2W regime: * – $P \leq 0.05$.

Рисунок 4. Результативность OPU/IVP технологии у телок истобенской породы при проведении OPU в режиме 1 (1W) и 2 раза в неделю (2W)

Figure 4. The efficiency of OPU/IVP technology in Istoben heifers with OPU conducted once per week (1W) and twice per week (2W)

Обсуждение полученных результатов.

Получение эмбрионов *in vitro* с использованием OPU ооцитов является в настоящее время лидирующей технологией производства эмбрионов у крупного рогатого скота (Viana JHM, 2022). В тоже время её эффективность сильно варьирует между породами, а также опосредована физиологическими и биотехнологическими факторами, включая индивидуальные особенности доноров и условия проведения OPU (Sartori R et al., 2016; Ferré LB et al., 2020; Baruselli PS et al., 2022).

Согласно данным литературы, между отдельными донорами наблюдаются существенные различия в паттерне фолликулярного развития, количестве получаемых ооцитов, а также их компетенции к эмбриональному развитию в системе *in vitro*, что обуславливает различия в числе получаемых IVP-эмбрионов (Monteiro FM et al., 2017; Watanabe YF et al., 2017; Baruselli PS et al., 2022). Истобенская порода в этом контексте не стала исключением. По нашим результатам из 7 тёлко-доноров выделяется одно животное (№ 964) с высоким показателем результативности OPU/IVP технологии и одно (№ 971) – с очень низким.

Популярным графиком OPU у КРС считается сбор ооцитов 2 раза в неделю, который по результатам ряда работ (Baruselli PS et al., 2016) даёт большее количество жизнеспособных ооцитов и развившихся из них *in vitro* эмбрионов, чем другой распространённый режим – один раз в неделю. Тем не менее, по некоторым данным, часто повторяющиеся пункции, могут приводить к снижению эффективности OPU/IVP-технологии (Choi BH et al., 2018), в том числе с точки зрения соотношения эмбрионы/ооциты (Presicce GA et al., 2020). В данной работе OPU проводили 1 или 2 раза в неделю. Отличие между вариантами наблюдалось в паттерне фолликулярного развития, оценённого по количеству аспирированных фолликулов на одну сессию OPU в пользу 2-кратного режима (тёлки с номерами 964 и 971) и качеству выделенных ооцитов – в пользу режима меньшей интенсивности (тёлка № 73). Существенных различий между сравниваемыми режимами как в рамках отдельных доноров по количеству выделенных ооцитов, так и по их способности развиваться после экстракорпорального оплодотворения до стадии бластоцисты, выявлено не было. Возможно, что обнаруженное в нашем исследовании увеличение УЗИ-видимых фолликулов связано с стимулированием более частым OPU фолликулярного роста, а снижение доли пригодных для IVM ооци-

тов, с тем, что при этом в некоторых случаях может снижаться качество ооцитов (Baruselli PS et al., 2016; Oliveira CS et al., 2023).

Заключение.

У тёлочек истобенской породы КРС индивидуальный фактор донора может серьёзно повлиять на результаты выделения OPU-ооцитов и их компетенцию к эмбриональному развитию в условиях *in vitro*. Кроме того, от выбора режима проведения процедуры OPU (1 или 2 раза в неделю) в отдельных случаях зависит паттерн фолликулярного развития, а также количество и качество выделенных ооцитов.

Список источников

1. Мокерова Е.В. Породы мира Истобенская // Молочное и мясное скотоводство. 2024. № 2. С. 21. [Mokerova EV. Breeds of the world Istobenskaya. Dairy and Beef Cattle Farming. 2024;2:21. (In Russ.)].
2. Получение эмбрионов *in vitro* методом межвидового оплодотворения яйцеклеток коров (*Bos taurus*) семенем зубра (*Bison bonasus*) / Г.Н. Сингина, В.А. Багиров, С.С. Данч, Т.Е. Тарадайник, А.В. Доцев, Н.А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 6. С. 824-829. [Singina GN, Bagirov VA, Danch SS, Taradainik TE, Dotsev AV, Zinovieva NA. In vitro production of interspecies hybrid embryos of cattle (*Bos taurus*) and wisent (*Bison bonasus*). Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. 2016;51(6):824-829. (In Russ.)]. doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.824rus doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.824eng
3. Роль репродуктивных биотехнологий в воспроизводстве и сохранении генофонда редких и исчезающих пород крупного рогатого скота / В.Ю. Бабенков, Н.В. Чимидова, А.И. Хахлинов, А.В. Убушиева, В.И. Манжиев // Животноводство и кормопроизводство. 2023. Т. 106. № 1. С. 67-76. [Babenkov VYu, Chimidova NV, Khakhlinov AI, Ubushieva AV, Manjiev VI. Animal Husbandry and Fodder Production. 2023;106(1):67-76. (In Russ.)]. doi: 10.33284/2658-3135-106-1-67
4. Сингина Г.Н., Чинаров Р.Ю., Шедова Е.Н. Влияние количества повторяющихся процедур OPU на эффективность получения *in vitro* эмбрионов у ярославской породы крупного рогатого скота // Достижения науки и техники АПК. 2023. Т. 37. №. 11. Р. 59-64. [Singina GN, Chinarov RY, Shedova EN. Effect of the number of repeated OPU procedures on the efficiency of *in vitro* embryo production in Yaroslavl breed of cattle. Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex. 2023;37(11):59-64. (In Russ.)]. doi: 10.53859/02352451_2023_37_11_59
5. Чинаров Р.Ю. Развитие технологии прижизненного получения ооцитов у коров: современное состояние и направления исследований (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2024. Т. 59, № 2. С. 194-220. [Chinarov RYu. Developing the Ovum Pick-Up technology in cattle: state-of-the-art and research directions (review). Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. 2024;59(2):194-220. (In Russ.)]. doi: 10.15389/agrobiology.2024.2.194rus doi: 10.15389/agrobiology.2024.2.194eng
6. Чинаров Р.Ю., Луканина В.А., Сингина Г.Н. Влияние различной интенсивности сессий трансвагинальной пункции фолликулов яичников на прижизненное получение ооцитов у коров // Молочное и мясное скотоводство. 2023. №. 3. С. 33-37. [Chinarov RYu, Lukanina VA, Singina GN. The effect of different intensity of sessions on the oocytes retrieval from lived cows. Dairy and Beef Cattle Farming. 2023;3:33-37. (In Russ.)]. doi: 10.33943/MMS.2023.15.29.006
7. Abdelmanova AS, Sermyagin AA, Dotsev AV, Rodionov AN, Stolpovsky YuA, Zinovieva NA. Whole-genomic studies of the population structure of russian local black-pied breeds. Russ J Genet. 2022;58:804-813. doi: 10.1134/S102279542207002X
8. Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Ferreira RM, Guerreiro BG, Bayeux BM, Sales JNS, Souza AH, Gimenes LU. Factors that interfere with oocyte quality for *in vitro* production of

cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Anim Reprod.* 2016;13(3):264-272. doi: 10.21451/1984-3143-AR861

9. Baruselli PS, Rodrigues CA, Ferreira RM, Sales JNS, Elliff FM, Silva LG, Viziack MP., Factor L, D'Occhio MJ. Impact of oocyte donor age and breed on in vitro embryo production in cattle, and relationship of dairy and beef embryo recipients on pregnancy and the subsequent performance of offspring: A review. *Reproduction Fertility and Development.* 2022;34(2):36-51. doi: 10.1071/RD21285

10. Choi BH, Song SH, Park BY, Kong R, Son SH, Park CS, Shin NH, Cheon HY, Lee SH, Jin JI, Lee JG, Kong IK. Effect of OPU session periods on the efficiency of in vitro embryo production in elite Korean native cow. *Journal of Embryo Transfer.* 2018;33(4):265-270. doi: 10.12750/JET.2018.33.4.265

11. Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal.* 2020;14(5):991-1004. doi: 10.1017/S1751731119002775

12. Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology.* 2017;90:54-58. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.002

13. Oliveira CS, Rosa PMDS, Camargo AJDR, Feres LF, Saraiva NZ, Oliveira LZ, Camargo LSA. Outstanding gir oocyte donors: How does individual factor affect in vitro embryo production efficiency? *Anim Sci J.* 2023;94(1):e13862. doi: 10.1111/asj.13862

14. Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology.* 2010;74(8):1349-1355. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.004

15. Presicce GA, Neglia G, Salzano A, Padalino B, Longobardi V, Vecchio D, De Carlo E, Gasparrini B. Efficacy of repeated ovum pick-up in Podolic cattle for preservation strategies: a pilot study. *Italian Journal of Animal Science.* 2020;19(1):31-40. doi: 10.1080/1828051X.2019.1684213

16. Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PL Jr, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology.* 2016;86(1):32-40. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.016

17. Viana JHM. A new milestone has been reached: transfers of IVP embryos were over one million worldwide. *Embryo Technology Newsletter.* 2022;40(4):22-40.

18. Watanabe YF, de Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A, Watanabe O, Meirelles FV, Nogueira MFG, Ferraz JBS. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim Reprod. (AR).* 2017;14(3):635-644. doi: 10.21451/1984-3143-AR1008

References

1. Mokerova EV. Breeds of the world Istobenskaya. *Dairy and Beef Cattle Farming.* 2024;2:21.

2. Singina GN, Bagirov VA, Danch SS, Taradainik TE, Dotsev AV, Zinovieva NA. In vitro production of interspecies hybrid embryos of cattle (*Bos taurus*) and wisent (*Bison bonasus*). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology].* 2016;51(6):824-829. doi: 10.15389/agrobiol.2016.6.824eng

3. Babenkov VYu, Chimidova NV, Khakhlinov AI, Ubushieva AV, Manjiev VI. *Animal Husbandry and Fodder Production.* 2023;106(1):67-76. doi: 10.33284/2658-3135-106-1-67

4. Singina GN, Chinarov RY, Shedova EN. Effect of the number of repeated OPU procedures on the efficiency of in vitro embryo production in Yaroslavl breed of cattle. *Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex.* 2023;37(11):59-64. doi: 10.53859/02352451_2023_37_11_59

5. Chinarov RYu. Developing the Ovum Pick-Up technology in cattle: state-of-the-art and research directions (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. 2024;59(2):194-220. doi: 10.15389/agrobiology.2024.2.194eng
6. Chinarov RYu, Lukanina VA, Singina GN. The effect of different intensity of sessions on the oocytes retrieval from lived cows. *Dairy and Beef Cattle Farming*. 2023;3:33-37. doi: 10.33943/MMS.2023.15.29.006
7. Abdelmanova AS, Sermyagin AA, Dotsev AV, Rodionov AN, Stolpovsky YuA, Zinovieva NA. Whole-genomic studies of the population structure of russian local black-pied breeds. *Russ J Genet*. 2022;58:804-813. doi: 10.1134/S102279542207002X
8. Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Ferreira RM, Guerreiro BG, Bayeux BM, Sales JNS, Souza AH, Gimenes LU. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Anim Reprod*. 2016;13(3):264-272. doi: 10.21451/1984-3143-AR861
9. Baruselli PS, Rodrigues CA, Ferreira RM, Sales JNS, Elliff FM, Silva LG, Viziack MP., Factor L, D'Occhio MJ. Impact of oocyte donor age and breed on in vitro embryo production in cattle, and relationship of dairy and beef embryo recipients on pregnancy and the subsequent performance of offspring: A review. *Reproduction Fertility and Development*. 2022;34(2):36-51. doi: 10.1071/RD21285
10. Choi BH, Song SH, Park BY, Kong R, Son SH, Park CS, Shin NH, Cheon HY, Lee SH, Jin JI, Lee JG, Kong IK. Effect of OPU session periods on the efficiency of in vitro embryo production in elite Korean native cow. *Journal of Embryo Transfer*. 2018;33(4):265-270. doi: 10.12750/JET.2018.33.4.265
11. Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*. 2020;14(5):991-1004. doi: 10.1017/S1751731119002775
12. Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*. 2017;90:54-58. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.002
13. Oliveira CS, Rosa PMDS, Camargo AJDR, Feres LF, Saraiva NZ, Oliveira LZ, Camargo LSA. Outstanding gir oocyte donors: How does individual factor affect in vitro embryo production efficiency? *Anim Sci J*. 2023;94(1):e13862. doi: 10.1111/asj.13862
14. Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*. 2010;74(8):1349-1355. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.004
15. Presicce GA, Neglia G, Salzano A, Padalino B, Longobardi V, Vecchio D, De Carlo E, Gasparrini B. Efficacy of repeated ovum pick-up in Podolic cattle for preservation strategies: a pilot study. *Italian Journal of Animal Science*. 2020;19(1):31-40. doi: 10.1080/1828051X.2019.1684213
16. Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PL Jr, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*. 2016;86(1):32-40. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.016
17. Viana JHM. A new milestone has been reached: transfers of IVP embryos were over one million worldwide. *Embryo Technology Newsletter*. 2022;40(4):22-40.
18. Watanabe YF, de Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A, Watanabe O, Meirelles FV, Nogueira MFG, Ferraz JBS. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim Reprod. (AR)*. 2017;14(3):635-644. doi: 10.21451/1984-3143-AR1008

Информация об авторах:

Галина Николаевна Сингина, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной эмбриологии, Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы 60, сот: 8-9851434552.

Роман Юрьевич Чинаров, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной эмбриологии, Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы 60, сот: 8-9153899065.

Екатерина Николаевна Шедова, научный сотрудник, лаборатории экспериментальной эмбриологии, Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы 60, сот: 8-9167117673.

Виктория Александровна Луканина, младший научный сотрудник, лаборатории экспериментальной эмбриологии, Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы 60, сот: 8-9165954695.

Анастасия Сергеевна Жукова, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной эмбриологии, Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 142132, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы 60, сот: 8-9165740148.

Information about the authors:

Galina N Singina, Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Experimental Embryology, Federal Research Center for Animal Husbandry — All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, 60 Dubrovitsy settlement, Moscow Region, Podolsk, 142132, mobile: 8-9851434552.

Roman Yu Chinarov, Cand. Sci. (Veterinary), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Embryology, Federal Research Center for Animal Husbandry — All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, 60 Dubrovitsy settlement, Moscow Region, Podolsk, 142132, mobile: 8-9153899065.

Ekaterina N Shedova, Researcher, Laboratory of Experimental Embryology, Federal Research Center for Animal Husbandry — All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, 60 Dubrovitsy settlement, Moscow Region, Podolsk, 142132, mobile: 8-9167117673.

Victoria A Lukanina, Junior Researcher, Laboratory of Experimental Embryology, Federal Research Center for Animal Husbandry — All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, 60 Dubrovitsy settlement, Moscow Region, Podolsk, 142132, mobile: 8-9165954695.

Anastasia S Zhukova, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Laboratory of Experimental Embryology, Federal Research Center for Animal Husbandry — All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, 60 Dubrovitsy settlement, Moscow Region, Podolsk, 142132, mobile: 8-9165740148.

Статья поступила в редакцию 07.11.2024; одобрена после рецензирования 05.12.2024; принята к публикации 16.12.2024.

The article was submitted 07.11.2024; approved after reviewing 05.12.2024; accepted for publication 16.12.2024.