УДК 636.2:591.39 doi: 10.15389/agrobiology.2022.6.1188rus

РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ПРИЖИЗНЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ООЦИТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ПОРОДЫ ТЕЛОК-ДОНОРОВ*

Р.Ю. ЧИНАРОВ[1, 2] ✉, В.А. ЛУКАНИНА[1], С.В. ПОЗЯБИН[1], Г.Н. СИНГИНА[2]

Прижизненное получение ооцитов (ovum pick-up, OPU) — важнейший элемент в системе получения эмбрионов коров in vitro (IVP). В этой связи повышение результативности OPU становится определяющим фактором для широкого внедрения IVP-технологии в разведение крупного рогатого скота. В представленной работе впервые показана возможность и эффективность получения OPU-ооцитов у коров ярославской породы. В ярославской породе по сравнению с симментальской установлена вариабельность числа фолликулов как между отдельными животными, так и между сессиями у одних и тех же животных. Мы не наблюдали статистически значимых различий в степени извлечения и качественных характеристиках ооцит-кумулюсных комплексов, что позволяет использовать стандартизированные протоколы для телок-доноров симментальской и ярославской пород. Целью настоящей работы было изучение влияния индивидуальных и породных особенностей телок-доноров симментальской и ярославской пород на результативность прижизненного получения ооцитов. Исследования проводили в ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста в 2020-2022 годах на половозрелых клинически здоровых телках (*Bos taurus taurus*) симментальской и ярославской пород в возрасте от 17 до 36 мес. Ооциты получали методом трансвагинальной сонографически-ассистированной пункции фолликулов с интервалом между сессиями 7 сут в соответствии с методическими рекомендациями с использованием системы для OPU у крупного рогатого скота Bovine OPU («Minitube GmbH», Германия). В первом эксперименте изучали влияние на результативность OPU индивидуальных особенностей телок-доноров симментальской (*n* = 7, 50 сессий) и ярославской (*n* = 5, 25 сессий) пород. Во втором эксперименте оценивали результативность OPU в зависимости от породных особенностей телок-доноров симментальской (*n* = 6, 12 сессий) и ярославской (*n* = 5, 25 сессий) пород, используя параметры проведения OPU, оптимизированные для животных симментальской породы. Критериями оценки результативности OPU были число видимых с помощью УЗИ фолликулов, число извлеченных ооцитов в составе ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), степень извлечения ОКК, доля ОКК, потенциально пригодных для использования в системе получения IVP эмбрионов, от общего количества извлеченных ОКК. Пригодными считали ОКК, у которых в ооцитах не было явных признаков аномалий цитоплазмы (дегенерация, лизис, сжатие, неправильная форма), за исключением созревших ОКК. Также к пригодным относили ооциты с гомогенной ооплазмой, лишенные полностью или частично клеток кумулюса. Мы наблюдали высокую вариабельность среднего числа УЗИ-видимых фолликулов между телками-донорами как симментальской (4,71-11,50 фолликулов; *Cv* = 47,9 %), так и ярославской пород (5,80-9,80 фолликулов, *Cv* = 32,0%), при этом различия между некоторыми донорами были высокодостоверны (p ≤ 0,001). Различия в числе УЗИ-видимых фолликулов приводили к различиям в числе получаемых ОКК между отельными донорами симментальской (2,33-5,17 ОКК) и ярославской пород (3,60-6,00 ОКК). Сравнительные исследования телок-доноров симментальской и ярославской пород не показали статистически значимых различий по среднему числу УЗИ-видимых фолликулов (7,33±0,62 и 6,96±0,45), получаемых (4,17±0,69 и 3,36±0,41) и пригодных ОКК (3,08±0,60 и 2,52±0,29), то есть технические (тип используемой аспирационной иглы и давление вакуума) и технологические параметры (кратность сессий) проведения OPU, оптимизированные для симментальской породы, могут быть использованы для ярославской породы без заметной потери результативности. Принимая во внимание высокую положительную корреляцию между числом пунктированных фолликулов и извлекаемых ОКК — *r* = 0,97 (p ≤ 0,01) и *r* = 0,72 (p ≤ 0,05) соответственно у телок-доноров симментальской и ярославской пород, для повышения результативности OPU целесообразно отбирать животных, характеризующихся большим числом УЗИ-видимых фолликулов.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, вспомогательные репродуктивные технологии, OPU, получение эмбрионов in vitro.

В настоящее время вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) — важнейший элемент генетического совершенствования различных видов сельскохозяйственных животных. Термином ВРТ описывают процедуры, предусматривающие манипуляции с половыми циклами, гаметами

* Исследования выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-316-90003) и Минобрнауки России (тема 0445-2021-0004).

или эмбрионами (1). Интерес к развитию ВРТ связан прежде всего с тем, что их использование позволяет повысить интенсивность селекции и, как следствие, ускорить генетический прогресс (2). Кроме того, ВРТ служат неотъемлемым элементом развития технологий геномного редактирования (1-3).

Особую актуальность приобретает использование ВРТ у крупного рогатого скота (КРС), который характеризуется длинным генерационным интервалом и относительно низкой плодовитостью. В разведении КРС находят применение различные ВРТ, включая искусственное осеменение (artificial insemination, AI), криоконсервацию семени и эмбрионов, синхронизацию полового цикла, множественную овуляцию и пересадку эмбрионов (multiple ovulation and embryo transfer, MOET), прижизненное получение ооцитов (ovum pick-up, OPU) и получение эмбрионов in vitro (in vitro production, IVP), определение пола спермиев и эмбрионов, пересадка ядер (nuclear transfer, NT) (1).

Первой широко используемой ВРТ у КРС стала технология AI (4), получившая массовое внедрение с открытием способности гамет сохранять жизнеспособность после криоконсервации (5). Внедрение AI сделало возможным повышение эффективности использования генетического потенциала выдающихся быков-производителей. В отношении самок эта задача первоначально была решена разработкой и внедрением технологии MOET (6). Классическая технология MOET включает проведение суперовуляции генетически лучших коров-доноров, их искусственное осеменение и последующее вымывание эмбрионов (как правило, на 6-7-е сут после осеменения). Полученные эмбрионы пересаживают реципиентам с синхронизированным половым циклом в свежем виде непосредственно после вымывания или замораживают для последующей трансплантации. Эмбрионы, полученные с использованием технологии MOET, определяют как полученные in vivo (in vitro derived, IVD). Несмотря на преимущества технологии MOET, основным лимитирующим фактором ее широкого использования остается необходимость проведения гормональной обработки для индукции суперовуляции. Отсутствие у части доноров реакции на гормональную стимуляцию, снижение результативности суперовуляции с каждой последующей гормональной обработкой, необходимость перерыва в несколько месяцев между гормональными обработками, а также высокие затраты на гормоны существенно увеличивают стоимость получаемых эмбрионов.

Альтернативой MOET стало развитие технологии IVP, суть которой заключается в получении яйцеклеток из яичников коров посредством аспирации фолликулов, созревании, оплодотворении яйцеклеток и последующем культивировании развивающихся эмбрионов in vitro до стадий поздней морулы или бластоцисты (7). В сочетании с OPU (8) технология IVP находит все большее применение в разведении КРС. О преимуществах технологии OPU/IVP по сравнению с MOET свидетельствует поступательный рост количества производимых IVP эмбрионов КРС на фоне снижения количества эмбрионов, полученных по классическим программам MOET. Так, с 2000 по 2020 год количество полученных IVD-эмбрионов в мире снизилось с 664220 до 361728 шт., в то время число IVP эмбрионов выросло с 139372 до 1156422 шт. (9, 10).

Определяющим фактором для широкого внедрения IVP-технологии стало повышение результативности OPU. В этой связи были проведены исследования по выявлению факторов, влияющих на результативность OPU и их оптимизацию. Так, установлено влияние на результативность OPU технических параметров, включая тип используемой аспирационной иглы (11-13) и давление вакуума (12, 14, 15); технологических факторов, в том числе

кратности проведения OPU (интервал между сессиями) (16, 17); наличия или отсутствия гормональной синхронизации полового цикла (18-20) и суперстимуляции (21, 22); индивидуальных особенностей доноров, включая породу (23, 24), возраст (25, 26), стадию полового цикла и индивидуальную реакцию (27); климатических условий (28, 29); алиментарных факторов; опыта оператора. На способность получаемых OPU-ооцитов к оплодотворению и дальнейшему развитию оказывают влияние условия созревания, оплодотворения и культивирования in vitro (30).

Ранее мы определили оптимальные параметры в отношении типа используемой аспирационной иглы и давления вакуума (13), а также кратности проведения сессий у телок-доноров симментальской породы (17). Однако не было изучено влияние индивидуальных особенностей телок-доноров на результативность OPU. Кроме того, необходима оценка результативности методики проведения OPU, разработанной для телок-доноров симментальской породы, на других породах КРС.

В представленной работе впервые показана возможность и эффективность получения OPU-ооцитов у коров ярославской породы. В ярославской породе по сравнению с симментальской породой, установлена вариабельность числа фолликулов как между отдельными животными, так и между сессиями у одних и тех же животных. Мы не наблюдали статистически значимых различий в степени извлечения и качественных характеристиках ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), что позволяет использовать стандартизированные протоколы для телок-доноров симментальской и ярославской пород.

Целью настоящей работы было изучение влияния индивидуальных и породных особенностей телок-доноров симментальской и ярославской пород на результативность прижизненного получения ооцитов.

Методика. Исследования проводили в ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста в 2020-2022 годах на половозрелых клинически здоровых телках (*Bos taurus taurus*) симментальской и ярославской пород в возрасте от 17 до 36 мес. Рационы животных были сбалансированы по энергии, питательным и биологически активным веществам в соответствии с нормами потребностей (31). Ооциты получали методом трансвагинальной сонографически-ассистированной пункции фолликулов в соответствии с методическими рекомендациями (32) с использованием системы для OPU у крупного рогатого скота Bovine OPU («Minitube GmbH», Германия), в комплект которой входит ультразвуковой сканер ProSound 2 («Hitachi Aloka Medical, Ltd.», Япония), ультразвуковой секторный зонд с частотой 5 МГц (Aloka UST-9111-5, 5 МГц/90°/14 мм) с держателем и вакуумный насос.

В первом эксперименте изучали влияние на результативность OPU индивидуальных особенностей телок-доноров симментальской (n = 7, 50 сессий) и ярославской (n = 5, 25 сессий) пород. Пункцию всех УЗИ-видимых фолликулов проводили с интервалом 7 сут с использованием иглы 1,2×75 мм (18G×3″, длинный срез) при давлении вакуума 80 мм рт. ст. (симментальская порода) и 90 мм рт. ст. (ярославская порода).

Во втором эксперименте оценивали результативность OPU в зависимости от породных особенностей телок-доноров симментальской (n = 6, 12 сессий) и ярославской (n = 5, 25 сессий) пород. Пункцию всех УЗИ-видимых фолликулов осуществляли в течение одного временного периода, используя параметры проведения OPU, оптимизированные для животных симментальской породы: аспирационная игла — 1,2×75 мм (18G×3″, длинный срез), давление вакуума — 90 мм рт. ст., интервал между сессиями — 7 сут.

Критериями оценки результативности OPU были число видимых с

помощью УЗИ фолликулов, число извлеченных ооцитов в составе ОКК, степень извлечения ОКК, доля ОКК, потенциально пригодных для использования в системе получения IVP эмбрионов, от общего количества извлеченных ОКК. Пригодными считали ОКК, у которых в ооцитах не было явных признаков аномалий цитоплазмы (дегенерация, лизис, сжатие, неправильная форма), за исключением созревших ОКК. Также к пригодным относили ооциты с гомогенной ооплазмой, лишенные полностью или частично клеток кумулюса.

Полученные цифровые материалы обрабатывали с использованием методов вариационной статистики в программе Microsoft Excel. В экспериментальных группах определяли среднеарифметические значения (*M*), среднеквадратические отклонения (σ), стандартные ошибки средних (±SEM). Для оценки вариабельности изучаемых показателей рассчитывали коэффициент вариации (*Cv*). Статистическую значимость различий среднеарифметических значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для сопоставления двух выборок по относительным величинам, выраженным в процентах, использовали критерий Фишера с угловым преобразованием (φ-критерий). Результаты исследований считали высокодостоверными при $p \leq 0{,}001$, достоверными — при $p \leq 0{,}01$ и $p \leq 0{,}05$.

Результаты. Были выявлены существенные различия в числе УЗИ-видимых фолликулов между отдельными телками-донорами как симментальской, так и ярославской пород (табл. 1).

1. Число УЗИ-видимых фолликулов у телок-доноров (*Bos taurus taurus*) симментальской и ярославской пород (ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 2020-2022 годы)

Порода	ID	Число сессий	Число фолликулов (*M*±SEM)	*Cv*, %
Симментальская	3501	7	$11{,}14 \pm 1{,}40^{1,\ 5}$	33,3
	3507	12	$11{,}50 \pm 1{,}55^{2,\ 6}$	46,8
	3579	6	$10{,}33 \pm 2{,}51^{4}$	59,6
	7019	6	$9{,}33 \pm 0{,}33^{3,\ 7}$	8,7
	2480	9	$7{,}78 \pm 0{,}57^{1}$	22,1
	2547	3	$5{,}67 \pm 0{,}88^{5,\ 6,\ 7}$	27,0
	2581	7	$4{,}71 \pm 0{,}46^{1,\ 2,\ 3,\ 4}$	26,6
	В среднем	50	9,08±0,61	47,9
Ярославская	451	5	$9{,}80 \pm 1{,}16^{1,\ 2,\ 3,\ 4}$	26,4
	461	5	$6{,}00 \pm 0{,}89^{1}$	33,3
	1884	5	$5{,}80 \pm 0{,}49^{2}$	18,9
	1885	5	$6{,}60 \pm 0{,}51^{3}$	17,3
	1890	5	$6{,}60 \pm 0{,}81^{4}$	27,5
	В среднем	25	6,96±0,45	32,0

Примечание. ID — индивидуальный номер телки.
Разница между телками-донорами симментальской породы, маркированными одинаковыми надстрочными цифрами, статистически значима при $^{1,\ 2,\ 3}p \leq 0{,}001$, $^{5,\ 6,\ 7}p \leq 0{,}01$, $^{4}p \leq 0{,}05$; между телками донорами ярославской породы — статистически значима при $^{1,\ 2,\ 3,\ 4}p \leq 0{,}05$.

Средние значения этого показателя у телок-доноров симментальской породы варьировали от 4,71 до 11,50 фолликулов (*Cv* = 47,9 %), различия между некоторыми донорами были высокодостоверны ($p \leq 0{,}001$). Значения коэффициента вариации для числа УЗИ-видимых фолликулов у отдельных доноров в различных сессиях составляли 8,7-59,6 %, при этом наблюдалась тенденция большей вариабельности у телок с более высоким средним значением числа УЗИ-видимых фолликулов ($r = 0{,}45$). У животных ярославской породы по сравнению с телками симментальской породы отмечалась меньшая вариабельность числа УЗИ-видимых фолликулов как между животными (5,80-9,80 фолликулов, *Cv* = 32,0 %), так и у отдельных животных между сессиями (*Cv* = 17,3-33,3 %).

Степень извлечения ОКК варьировала между животными симментальской породы от 41,2 до 51,4 %, ярославской породы — от 36,4 до 75,9 %.

Как известно, повышение давления вакуума при проведении пункции фолликулов приводит к увеличению степени извлечения ОКК (12, 13), поэтому более высокий показатель у телок ярославской породы может быть следствием использования более высокого давления вакуума (90 мм рт. ст.) по сравнению с телками симментальской породы (80 мм рт. ст.).

Отмечена высокая положительная корреляция между числом пунктируемых фолликулов и числом полученных ОКК как у телок симментальской ($r = 0,97$, $p \leq 0,01$), так и ярославской пород ($r = 0,72$, $p \leq 0,05$). Число извлекаемых ОКК от одного донора симментальской породы в среднем за сессию варьировало от 2,33 до 5,17 ОКК, при этом индивидуальные различия между донорами были статистически значимы ($p \leq 0,001$); у телок ярославской породы — от 3,60 до 6,00 ОКК (табл. 2).

2. Число ооцит-кумулюсных комплексов, полученных от телок-доноров (*Bos taurus taurus*) симментальской и ярославской пород (ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 2020-2022 годы)

Порода	ID	Число сессий	Число ОКК (M±SEM)	Пригодные ОКК, %
Симментальская	3501	7	5,00±0,76[1]	77,14
	3507	12	5,17±0,93[2]	69,35[1]
	3579	6	5,00±1,03	70,00[2]
	7019	6	4,33±0,56	92,31[1, 2, 3]
	2480	9	4,00±0,58	80,56
	2547	3	2,33±0,88	57,14[3]
	2581	7	2,57±0,30[1, 2]	83,33
Ярославская	451	5	6,00±1,67	83,33[3]
	461	5	3,60±0,75	72,22[2]
	1884	5	4,40±0,40	72,73[1]
	1885	5	4,20±0,73	95,24[1, 2, 3]
	1890	5	2,40±0,68	83,33

Примечание. ID — индивидуальный номер телки; ОКК — ооцит-кумулюсные комплексы. Разница между телками-донорами симментальской породы, маркированными одинаковыми надстрочными цифрами, по числу ОКК статистически значима при [1, 2]$p \leq 0,05$, по доле пригодных ОКК — при [1]$p \leq 0,01$, [2, 3]$p \leq 0,05$; между телками донорами ярославской породы по доле пригодных ОКК — при [1]$p \leq 0,01$, [2, 3]$p \leq 0,05$.

Сравнение числа полученных ОКК между телками двух пород в первом эксперименте не проводили, поскольку исследования осуществляли в разные временные периода. Кроме того, для аспирации фолликулов использовали разное давление вакуума, которое, как было показано в многочисленных исследованиях, влияет на степень извлечения ооцитов, а следовательно, и на число получаемых ОКК (12, 13, 15).

Высокую индивидуальную вариабельность числа УЗИ-видимых фолликулов и числа полученных ОКК отмечали в ряде работ (24, 27). У аборигенного подольского скота число фолликулов варьировало от 2,9 до 9,3, число ОКК — от 0,5 до 6,8 (24); у черно-пестрого скота число ОКК составило 1,6-9,2 (27).

Сравнительные исследования, проведенные во втором эксперименте, не показали статистически значимых различий по среднему числу УЗИ-видимых фолликулов у телок-доноров симментальской и ярославской пород (соответственно 7,33±0,62 и 6,96±0,45). Полученные нами значения этого показателя в целом согласуются с результатами других авторов. Так, у высокопродуктивных молочных коров голштинизированной черно-пестрой породы в разных исследованиях в среднем на одного донора визуализированное число фолликулов составляло 3,88 (33), 4,81 (12) и 6,10 (34). В работе на подольском скоте в среднем у одного донора выявили 5,00 фолликулов (24).

Мы также не наблюдали достоверных различий в степени извлечения ОКК между телками симментальской и ярославской пород — соответ-

ственно 67,05 и 59,20 %, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований на подольском и белорусском черно-пестром скоте: 38,3-65,0 % (24), 68,8 % (33) и 48,4-80,0 % (12).

Число полученных ооцит-кумулюсных комплексов в среднем от одного донора составило у симментальского скота 4,17±0,69, у ярославского — 3,36±0,41, что соответствует или превышает показатели, установленные другими авторами для подольского и белорусского черно-пестром скоте — 2,67 (33), 3,17 (12), 3,40 (24), 4,80 (12) и 5,00 ОКК (27). В то же время среднее число ОКК, полученное у коров черно-пестрой голштинизированной породы в работе Л.Н. Ротарь с соавт. (26), было существенно выше и составило 11,3 ОКК.

В нашем эксперименте 85,33 % ОКК от телок симментальской породы и 81,55 % ОКК от телок ярославской породы были признаны пригодными для получения эмбрионов в системе in vitro, что в большинстве случаев превышало показатели, установленные другими авторами. Так, доля жизнеспособных ОКК у коров черно-пестрой голштинизированной породы составляла 42,48 % (26). Относительно низкое качество ОКК авторы связывают с повышенной нагрузкой на организм коров, обусловленной лактацией. У аборигенного подольского скота доля пригодных ооцитов достигала 79,30 % (24), у коров абердин-ангусской породы — 67,26 % (26), у коров пород Гир и Нелоре — соответственно 71,4 и 83,9 % (26). Доля пригодных ОКК в работе В.К. Пестис с соавт. (34) при оптимальных технических характеристиках проведения OPU составляла 70,6 %. Наличие относительно большей доли пригодных ОКК в нашем опыте может быть связано с различными критериями, применяемыми для оценки качества извлекаемых ОКК. Так, в большинстве исследований ОКК, лишенные клеток кумулюса (денудирвоанные ооциты), считаются непригодными для получения эмбрионов in vitro (26, 34-36). В наших исследованиях основными критериями качества ОКК были цвет и однородность ооплазмы, в связи с чем денудированные ооциты с гомогенной ооплазмой считались условно пригодными для получения IVP эмбрионов.

В нашем эксперименте число ОКК, пригодных для получения эмбрионов in vitro, составило в среднем на одного донора симментальской породы 3,08±0,60, ярославской породы — 2,52±0,29. В работе Л.Н. Ротарь с соавт. (26) от одного донора получили 11,3 жизнеспособных ОКК у коров абердин-ангусской породы и 4,8 — у животных черно-пестрой голштинизированной породы. У аборигенного подольского скота в среднем было идентифицировано 2,70 пригодных ОКК (24), у телок абердин-ангусской породы — в среднем 6,8 жизнеспособных ОКК (37). В исследованиях на голштинизированном черно-пестром скоте число пригодных ОКК от одного донора составило 2,03 (33), 2,38 (12), 3,4 (27) и 3,90 (34).

Таким образом, мы показали высокую вариабельность результатов прижизненного получения ооцитов (OPU), оцениваемого по показателям среднего числа УЗИ-видимых фолликулов и числа получаемых ооцит-кумулюсных комплексов, между телками-донорами как симментальской, так и ярославской пород. Индивидуальные различия между донорами были статистически значимыми. Принимая во внимание высокую положительную корреляцию между числом пунктированных фолликулов и извлекаемых ОКК, для повышения результативности OPU целесообразно отбирать животных, характеризующихся большим числом УЗИ-видимых фолликулов. Сравнение результативности OPU у телок-доноров симментальской и ярославской пород не выявило достоверных различий в отношении количественных и качественных характеристик ОКК, в связи с чем технические

(тип используемой аспирационной иглы и давление вакуума) и технологические параметры (кратность сессий) проведения OPU, оптимизированные для телок-доноров симментальской породы, могут быть использованы для телок ярославской породы без заметной потери результативности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mueller M.L., Van Eenennmaan A.E. Synergistic power of genomic selection, assisted reproductive technologies, and gene editing to drive genetic improvement of cattle. *CABI Agriculture and Bioscience*, 2022, 3: 13 (doi: 10.1186/s43170-022-00080-z).
2. Зиновьева Н.А., Позябин С.В., Чинаров Р.Ю. Вспомогательные репродуктивные технологии: история становления и роль в развитии генетических технологий в скотоводстве (обзор). *Сельскохозяйственная биология*, 2020, 55(2): 225-242 (doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.225rus).
3. Van Eenennaam A.L. Application of genome editing in farm animals: cattle. *Transgenic Res.*, 2019, 28: 93-100 (doi: 10.1007/s11248-019-00141-6).
4. Милованов В.К. *Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных*. М., 1938.
5. Соколовская И.И. Может ли замороженная сперма оплодотворять и давать нормальное потомство. *Доклады ВАСХНИЛ*, 1947, 6: 21-23.
6. Smith C. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 1988, 29(1): 203-212 (doi: 10.1016/0093-691X(88)90040-4).
7. Ferré L.B., Kjelland M.E., Strøbech L.B., Hyttel P., Mermillod P., Ross P.J. Recent advances in bovine in vitro embryo production: Reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 2019, 14(5): 991-1004 (doi: 10.1017/S1751731119002775).
8. Boni R. Ovum pick-up in cattle: A 25 years retrospective analysis. *Animal Reproduction*, 2012, 9(3): 362-369.
9. *Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: World embryo industry grows despite the Pandemic (IETS Data Retrieval Committee)*. 2021 Режим доступа: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf. Дата обращения: 12.08.2022.
10. *The animal embryo transfer industry in figures (A report from the IETS Data Retrieval Committee)*. 2001 Режим доступа: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/december2001.pdf. Дата обращения: 12.08.2022.
11. Bols P.E., Van Soom A., Ysebaert M.T., Vandenheede J.M., de Kruif A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, 1996, 45(5): 1001-1014 (doi: 10.1016/0093-691x(96)00028-3).
12. Пестис В.К., Голубец Л.В., Дешко А.С., Кысса И.С., Попов М.В. Получение ооцитов коров путем трансвагинальной пункции фолликулов. *Доклады национальной академии наук Беларуси*, 2016, 60(91): 123-128.
13. Чинаров Р.Ю., Луканина В.А. Влияние технических параметров на результативность прижизненного получения ооцитов у телок симментальской породы. *Достижения науки и техники АПК*, 2022, 36(1): 46-50.
14. Bols P.E.J., Ysebaert M.T., Van Soom A., de Kruif A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, 1997, 47(6): 1221-1236 (doi: 10.1016/s0093-691x(97)00102-7).
15. Ward F.A., Lonergan P., Enright B.P., Boland M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, 2000, 54(3): 433-446 (doi: 10.1016/s0093-691x(00)00360-5).
16. Ding L.-J., Tian H.-B., Wang J.-J., Chen J., Sha H.-Y., Chen J.-Q., Cheng G.-X. Different intervals of ovum pick- up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 2008, 75: 1710-1715 (doi: 10.1002/mrd.20922).
17. Чинаров Р.Ю., Луканина В.А., Сингина Г.Н., Тарадайник Н.П. Результативность получения ооцитов коров при использовании различных временных режимов трансвагинальной пункции фолликулов. *Достижения науки и техники АПК*, 2020, 34(2): 57-60 (doi: 10.24411/0235-2451-2020-10212).
18. de Carvalho Fernandes C.A., Miyauchi T.M., Figueiredo A.C.S.D., Palhão M.P., Varago F.C., Nogueira E.S.C., Neves J.P., Miyauchi T.A. Hormonal protocols for in vitro production of Zebu and taurine embryos. *Pesq. Agropec. Bras.*, 2014, 49: 813-817 (doi: 10.1590/S0100-204X2014001000008).
19. Ongaratto F.L., Rodriguez-Villamil P., Tribulo A., By G.A. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. *Animal Reproduction*, 2015, 12: 876-883.
20. Cavalieri F.L.B., Morotti F., Seneda M.M., Colombo A.H.B., Andreazzi M.A., Emanuelli I.P., Rigolon L.P. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 2018, 117: 57-60 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.026).

21. De Roover R., Bolsb P.E.J., Genicota G., Hanzen Ch. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. *Theriogenology*, 2005, 63(7): 1902-1913 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.011).
22. Chaubal S.A., Ferre L.B., Molina J.A., Faber D.C., Bols P.E., Rezamand P., Tian X., Yang X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, 2007, 67(4): 719-728 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.07.022).
23. Pontes J.H.F., Silva K.C.F., Basso A.C., Ferreira C.R., Santos G.M.G., Sanches B.V., Porcionato J.P.F., Vieira P.H.S., Faifer F.S., Sterza F.A.M., Schenk J.L., Seneda M.M. 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).
24. Presicce G.A., 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).
25. Iwata H., Goto H., Tanaka H., Sakaguchi Y., Kimura K., Kuwayama T., Monji Y. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 2011, 23(3): 424-432 (doi: 10.1071/RD10133).
26. Ротарь Л.Н., Souza J.F. Морфологическая характеристика ооцит-кумулюсных комплексов *Bos taurus* и *Bos indicus* разного направления продуктивности. *Российская сельскохозяйственная наука*, 2019, 3: 64-67 (doi: 10.31857/S2500-26272019364-67).
27. Машталер Д.В., Голубец Л.В., Дешко А.С., Хромов Н.И. Некоторые аспекты трансвагинальной аспирации ооцитов крупного рогатого скота. *Farm News*, 2018, 1: 22-26.
28. Ferreira R.M., Ayres H., Chiaratti M.R., Ferraz M.L., Araújo A.B., Rodrigues C.A., Watanabe Y.F., Vireque A.A., Joaquim D.C., Smith L.C., Meirelles F.V., Baruselli P.S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. Dairy Sci.*, 2011, 94(5): 2383-2392 (doi: 10.3168/jds.2010-3904).
29. Ferreira R.M., Chiaratti M.R., Macabelli C.H., Rodrigues C.A., Ferraz M.L., Watanabe Y.F., Smith L.C., Meirelles F.V., Baruselli P.S. The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. *Biology of Reproduction*, 2016, 94(3): 66 (doi: 10.1095/biolreprod.115.133017).
30. Сингина Г.Н., Чинаров Р.Ю., Луканина В.А., Ворожбит Т.А. Влияние пролактина на качество ооцитов, полученных методом трансвагинальной пункции фолликулов телок. *Сельскохозяйственная биология*, 2021, 56(6): 1148-1155 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1148rus).
31. Некрасов Р.В., Головин А.В., Махаев Е.А., А.С. Аникин, Первов Н.Г., Стрекозов Н.И., Мысик А.Т., Дуборезов В.М., Чабаев М.Г., Фомичев Ю.П., Гусев И.В. *Нормы потребностей молочного скота и свиней в питательных веществах* /Под. ред. Р.В. Некрасова, А.В. Головина, Е.А. Махаева. М., 2018.
32. Чинаров Р.Ю., Позябин С.В., Тарадайник Н.П., Луканина В.А., Тарадайник Т.Е., Шумаков Н.И., Рыков Р.А., Боголюбова Н.В., Колодина Е.Н., Артемьева О.А., Гусев И.В., Сингина Г.Н. *Методическое руководство по прижизненному получению ооцитов методом трансвагинальной сонографически-ассистированной пункции фолликулов у телок-доноров симментальской породы.* Подольск, 2022.
33. Пестис В.К., Голубец Л.В., Дешко А.С., Кысса И.С., Попов М.В., Якубец Ю.А. Первый опыт получения эмбрионов крупного рогатого скота in vitro в системе трансвагинальной аспирации ооцитов (ТАО). *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*, 2015, 1: 86-91.
34. Пестис В.К., Голубец Л.В., Дешко А.С. Вспомогательные репродуктивные технологии в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*, 2019, 57(2): 192-203 (doi: 10.29235/1817-7204-2019-57-2-192-203).
35. Seneda M.M., Esper C.R., Garcia J.M., de Oliveira J.A., Vantini R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, 2001, 67(1-2): 37-43 (doi: 10.1016/s0378-4320(01)00113-0).
36. Cavalieri F.L.B., Morotti F., Seneda M.M., Colombo A.H.B., Andreazzi M.A., Emanuelli I.P., Rigolon L.P. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 2018, 117: 57-60 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.026).
37. Ротарь Л.Н. *Фенотипические и генетические маркеры, ассоциированные с количественной и качественной характеристикой ооцит-кумулюсных комплексов крупного рогатого скота. Канд. дис.* СПб, 2019.

[1]ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина,
109472 Россия, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23,
e-mail: roman_chinarov@mail.ru ✉, kristybatle@gmail.com,
vet-surgery@mgavm.ru;
[2]ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,

Поступила в редакцию 18 августа 2022 года

142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: g_singina@mail.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2022, V. 57, № 6, pp. 1188-1196

THE INFLUENCE OF INDIVIDUAL FEATURES AND THE BREED OF DONOR HEIFERS ON THE EFFICIENCY OF OOCYTE RETRIEVAL BY OVUM PICK-UP

R.Yu. Chinarov[1, 2 ✉], *V.A. Lukanina*[1], *S.V. Pozyabin*[1], *G.N. Singina*[2]

[1]*Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology*, 23, ul. Akademika K.I. Skryabina, Moscow, 109472 Russia, e-mail roman_chinarov@mail.ru (✉ corresponding author), kristybatle@gmail.com, vet-surgery@mgavm.ru;
[2]*Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry,* 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail g_singina@mail.ru
ORCID:
Chinarov R.Yu. orcid.org/0000-0001-6511-5341
Lukanina V.A. orcid.org/0000-0003-4744-7873
Pozyabin S.V. orcid.org/0000-0003-1296-2840
Singina G.N. orcid.org/0000-0003-0198-9757
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported from the Russian Foundation for Basic Research (project No. 20-316-90003) and the Ministry of Science and Higher Education of Russia (Theme 0445-2021-0004).
Received August 18, 2022 doi: 10.15389/agrobiology.2022.6.1188eng

Abstract

The oocytes' retrieval from lived cows (Ovum Pick-Up, OPU) is the most important element in the system of *in vitro* production (IVP) of cow embryos. In this regard, increasing the efficiency of OPU is a key factor for the widespread implementation of IVP technology in cattle breeding. The present work shows for the first time the possibility of obtaining IVP embryos from OPU oocytes obtained from a local breed of Yaroslavl cows. In Yaroslavl breed comparing to Simmental breed, the variability of the number of follicles was observed both between individual animals and between sessions in the same animals. We did not observe significant differences in the recovery rate and qualitative characteristics of the obtained cumulus-oocyte complexes, which allows using standardized protocols for donor heifers of both Simmental and Yaroslavl breeds. The aim of our work was to study the influence of individual features and breed characteristics of donor heifers on the efficiency of oocyte production by OPU. The studies were carried out in the laboratory of experimental embryology in 2020-2022 on mature clinically healthy heifers of the Simmental and Yaroslavl breeds aged of 17 to 36 months. Oocytes were obtained by transvaginal ultrasound-controlled puncture of follicles with an interval between sessions of 7 days according to the methodical guidelines using systems Bovine OPU (Minitube GmbH, Germany). In the first experiment, the efficiency of OPU was studied in individual donor heifers of the Simmental (n = 7; 50 sessions) and Yaroslavl breeds (n = 5; 25 sessions). In the second experiment, a comparative study of the OPU efficiency in donor heifers of the Simmental (n = 6; 12 sessions) and Yaroslavl breeds (n = 5; 25 sessions) was carried out using OPU parameters optimized for animals of the Simmental breed. The OPU efficiency was evaluated using the following criteria: the number of ultrasound-visible follicles, the number of retrieved cumulus-oocyte complexes (COCs), the degree of oocyte retrieval, the ratio of oocytes suitable for production of IVP embryos from the total number of derived oocytes. We observed high variability of the average number of ultrasound-visible follicles among individual donor heifers, both of Simmental (4.71-11.50 follicles; Cv = 47.9 %) and Yaroslavl breeds (5.80-9.80 follicles, Cv = 32.0 %), while the differences between some donors within breeds were highly significant ($p \leq 0.001$). Differences in the number of ultrasound-visible follicles led to differences in the number of derived COCs among individual donors, both of Simmental (2.33-5.17 COCs) and Yaroslavl breeds (3.60-6.00 COCs). Comparative studies of donor heifers of the Simmental and Yaroslavl breeds did not show significant differences in the average number of ultrasound-visible follicles (7.33±0.62 vs. 6.96±0.45), the number of obtained oocytes (4.17±0.69 vs. 3.36±0.41) and the number of suitable oocytes (3.08±0.60 vs. 2.52±0.29). Thus, a high variability in the average number of ultrasound-visible follicles and the number of obtained oocytes between individual donor heifers of the Simmental and Yaroslavl breeds was established. Considering the high positive correlation between the number of aspirated follicles and the number of retrieved oocytes (r = 0.97 and 0.72 for donor heifers of the Simmental and Yaroslavl breeds, respectively), it is advisable to select animals characterized by a large number of ultrasound-visible follicles to increase the efficiency of OPU. The absence of significant differences related to quantitative and qualitative characteristics of the retrieved oocytes allows us to recommend the OPU parameters optimized for donor heifers of the Simmental breed to be applied in heifers of the Yaroslavl breed without a noticeable loss of efficiency.

Keywords: cattle, assisted reproductive technologies, OPU, in vitro embryo production.