

УДК 619:636.2

ЕДН WRPIJW



ВЛИЯНИЕ МОРФОЛОГИИ ЯИЧНИКОВ НА ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫЙ КОМПЛЕКС КОРОВ

Зубова Татьяна Владимировна, доктор биологических наук, профессор¹

Семечкова Анна Вячеславовна, аспирант¹

¹Кузбасский государственный аграрный университет имени В.Н. Полецкого, г. Кемерово, Россия

Аннотация. Приведены результаты исследования о влиянии морфологии яичников коров на качество ооцит-кумулусного комплекса (ОКК). Ооцит-кумулусный комплекс представляет собой ооцит, окружённый клетками кумулюса.

Воспроизведение и сохранение качественных ооцитов и жизнеспособных эмбрионов – наиболее актуальная задача репродуктивной медицины. В яичнике млекопитающих яйцеклетка и соседние соматические клетки взаимозависимы и участвуют в развитии фолликулов и овуляции. Каждый примордиальный фолликул содержит ооцит и несколько слоев клеток лучистого венца яичника, которые его окружают. В процессе роста и развития фолликула его структура меняется. Сначала ооцит постепенно увеличивается в размерах, в то время как окружающие клетки лучистого венца растут в геометрической прогрессии: от первоначального монослоя уплощенных предгранулезных клеток до многослойных столбчатых клеток. В то же время они делятся на кумулусные клетки (КК) и гранулезные клетки внутренней оболочки (КВО). На первичном фолликуле во внутриклеточной оболочке выделяются гликопротеины, образуя зону пеллюцида (ЗП), которая отделяет ооцит от тел соседних клеток кумулюса. На протяжении всего этого процесса кумулусные клетки остаются рядом с ооцитом, и вместе они называются ооцит-кумулусными комплексами (ОКК). Многочисленные связи, которые возникают в ОКК, поддерживают его рост и фолликулярный гемостаз.

По результатам исследования сделан вывод, что морфофункциональное состояние яичников не влияет на жизнеспособность ОКК коров голштинизированной черно-пестрой породы. Не установлено достоверных различий по количеству ОКК, полученных на один яичник с желтым телом

($8,56 \pm 0,12$) и без такового ($6,75 \pm 0,55$). При неодинаковом морфофункциональном состоянии яичников наблюдается та же тенденция по числу жизнеспособных ОКК $3,08 \pm 0,58$ против $3,56 \pm 0,55$.

Ключевые слова: ооцит-кумулюсный комплекс, яичник, фолликулогенез, созревание in vitro (IVM), яйцеклетка.

THE INFLUENCE OF THE MORPHOLOGY OF THE OVARIES ON THE OOCYTE-CUMULUS COMPLEX OF COWS

Zubova Tatyana V., Doctor of Biological Sciences, Professor¹

Semechkova Anna V., Postgraduate¹

¹Kuzbass State Agrarian University named after V.N. Poletskov, Kemerovo, Russia

Abstract. The results of a study on the influence of the morphology of the ovaries of cows on the quality of the oocyte-cumulus complex (OCC) are presented. The oocyte-cumulus complex is an oocyte surrounded by cumulus cells.

Reproduction and preservation of high-quality oocytes and viable embryos is the most urgent task of reproductive medicine. In the mammalian ovary, the egg and neighboring somatic cells are interdependent and involved in follicle development and ovulation. Each primordial follicle contains an oocyte and several layers of cells of the radiant crown of the ovary that surround it. During the growth and development of the follicle, its structure changes. At first, the oocyte gradually increases in size, while the surrounding cells of the radiant crown grow exponentially: from the initial monolayer of flattened pregranular cells to multilayered columnar cells. At the same time, they are divided into cumulus cells (CC) and granulosa cells of the inner shell (CVO). Glycoproteins are released on the primary follicle in the intracellular membrane, forming a pellucid zone (PO), which separates the oocyte from the bodies of neighboring cumulus cells. Throughout this process, cumulus cells remain next to the oocyte, and together they are called oocyte-cumulus complexes (OCCs). The numerous connections that arise in the OCC support its growth and follicular hemostasis.

According to the results of the study, it was concluded that the morphofunctional state of the ovaries does not affect the viability of the OCC of Holstein black-and-white cows. There were no significant differences in the number of OCCs obtained per ovary with a corpus luteum (8.56 ± 0.12) and without one (6.75 ± 0.55). With unequal

morphofunctional state of the ovaries, the same trend is observed in the number of viable OCCs 3.08 ± 0.58 versus 3.56 ± 0.55 .

Keywords: oocyte-cumulus complex, ovary, folliculogenesis, in vitro maturation (IVM), ovum.

Введение

Разработка технологии выращивания и созревания ооцитов из фолликулов достаточно привлекательна для клинической практики, технологий животноводства и научных исследований. Однако, несмотря на большое внимание, уделяемое исследованиям, оказалось трудным вырастить фолликулы от ранней стадии до зрелой стадии *in vitro*, поскольку мало что известно о биологии ооцита. Очевидно, что в течение всего периода развития ооцита *in vivo* поддержка клеток фолликула необходима для обеспечения репродуктивных клеток питательными веществами и регуляторами роста, чтобы обеспечить прохождение длительной стадии роста [1]. Увеличение продолжительности нормального роста фолликула от начальной стадии до стадии Граафового пузырька, а также изменения в потребностях клеток в питании, клеточных взаимодействиях, морфогенезе и значительное увеличение объема при образовании молока создают серьезные проблемы для технологии культивирования фолликулов [2]. Эти наблюдения могут объяснить, почему метод, который успешно использовался для культивирования изолированных фолликулов грызунов, не может поддерживать рост более крупных фолликулов человека и жвачных животных *in vitro* и не совместим с требованиями для активации роста первичных фолликулов [3]. В настоящее время наилучшим доступным вариантом для полноценного роста и созревания яйцеклеток *in vitro* является разработка расширенной многоступенчатой стратегии культивирования, которая обеспечит сложную систему поддержки, очень похожую на яичники *in vivo*.

Созревание *in vitro* (IVM) является сложной задачей, поскольку возникновение фолликула – это длительный процесс, который включает в себя множество сложных клеточных изменений в яйцеклетке и окружающих фолликул клетках [4].

На протяжении всего этого процесса клетки кумулюса остаются близко к ооциту, и вместе они называются ооцит-кумулюсным комплексом (ОКК). Многочисленные взаимосвязи, происходящие в ОКК, поддерживают рост ооцита и фолликулярный гемостаз [5]. Целостность зоны пеллюцида имеет решающее значение для межклеточных коммуникаций, которые в основном

происходят там [6]. Достижения в этой области помогут нам лучше понять механизмы фолликулогенеза и патогенез репродуктивных заболеваний, а также определить будущие подходы к совершенствованию методов вспомогательной репродукции.

Разработка технологий выращивания и созревания яйцеклеток из распространенных примордиальных фолликулов является достаточно привлекательной для клинической практики, технологий животноводства и научных исследований.

Увеличение продолжительности нормального роста фолликулов от примордиальной до граафовой стадии фолликула и изменения трофических требований клеток, клеточных взаимодействий, морфогенеза и явное увеличение объема по мере формирования антрального отдела представляют собой серьезные проблемы для технологии культивирования фолликулов [7].

Следовательно, чтобы стадия культивирования ооцитов прошла успешно, необходимо оценить морфофункциональное состояние яичников и их связь с выходом ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) [8]. Фолликулы в яичнике проходят несколько стадий роста, из-за чего они существенно отличаются по диаметру. Оптимальным является размер антральных фолликулов – от 3 до 8 мм.

Разработано много методик получения ооцитов, одна из которых – это из боенских яичников [9].

Из вышесказанного следует, что тема влияния морфологии яичников на ооцит-кумулясный комплекс коров является актуальной задачей.

Цель исследований – определить влияние морфологического состояния яичников на ооцит-кумулясный комплекс коров.

Задачи:

- 1) установить количественный состав ОКК при наличии желтого тела и без желтого тела в яичнике;
- 2) определить число ОКК на один яичник при различном морфофункциональном состоянии.

Материалы и методы

Метод трансвагинальной аспирации ооцитов позволяет получить эмбрионы без необходимости хирургического вмешательства и минимизирует риск для животного.

Для проведения эксперимента были отобраны ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) у доноров крупного рогатого скота. Доноры прошли этап стимуляции с помощью гормональных препаратов. При успешной стимуляции яичников проводилось обследование яичников для определения наличия фолликулов, содержащих ооциты. После локализации фолликулов проводится процедура на основе технологии *ovum pick-up (OPU)*. Процедура заключается в извлечении ооцитов из яичников. Это позволяет увеличить количество ооцитов, которые будут доступны для аспирации. Для этого используется специальная игла, которая вводится в яичник под контролем ультразвукового сканера LOGIQ V2 с помощью микроконвексного широкополосного зонда 8C-RS 6.0-10.0 МНг. Ооциты, находящиеся в фолликулах, извлекались в пробирку и доставлялись в лабораторию при температуре 37,7°C.

Транспортировка материала длилась 20–25 минут в специализированном транспортировочном инкубаторе с поддержанием постоянной температуры в среде *OPU*, которая состоит из раствора Дюльбекко (450 мл) с добавлением BSA (4 мг), гепарина (2,5 мл) и гентамицина (200 мкл). После аспирации фолликулов для выделения ооцит-кумулюсных комплексов содержимое переносили в чашки Петри со средой TC-199с 5 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

Результаты

Было выделено 296 ОКК при исследовании 40 яичников, пригодных для культивирования – 42,7% (n=253). Характеристика ОКК, выделенных из яичников с желтым телом и без него, представлена на рисунке 1.

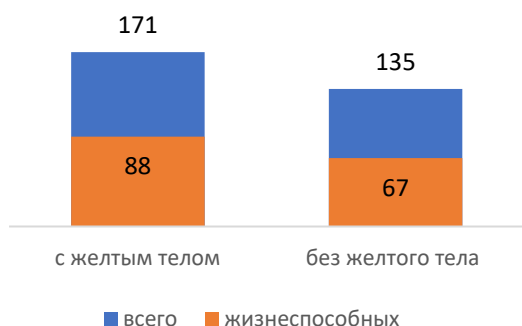


Рис. 1. Выход ооцит-кумулюсных комплексов в зависимости от морфофункционального состояния яичников коров, в ед.



Рис. 2. Доля ооцит-кумулюсных комплексов на одну корову при различном морфофункциональном состоянии, в %

По результатам исследований (рис. 2) нами не установлено достоверных различий по количеству ОКК, полученных в процентном соотношении на один яичник с желтым телом ($8,56 \pm 0,12$) и без такового ($6,75 \pm 0,55$).

При разном морфофункциональном статусе яичников наблюдается та же тенденция по числу жизнеспособных ОКК – $3,08 \pm 0,58$ против $3,56 \pm 0,55$.

Заключение

1. Количество ОКК с присутствием желтого тела и без желтого тела при исследовании 40 яичников составило 296 единиц. Из них доля жизнеспособных – 42,7% ($n=253$).

2. Не установлено достоверных различий по количеству ОКК, полученных в среднем на один яичник с желтым телом ($8,56 \pm 0,12$) и без такового ($6,75 \pm 0,55$). При разном морфофункциональном статусе яичников наблюдается та же тенденция по числу жизнеспособных ОКК – $3,08 \pm 0,58$ против $3,56 \pm 0,55$.

Список источников

1. Эбзеева М. В., Калинина Е. А., Кузьмичев Л. Н. Современные подходы к стимуляции суперовуляции в программах ВРТ // Проблемы репродукции. 2009. № 4. С. 47–49.
2. Chronowska E. High-throughput analysis of ovarian granulosa cell transcriptome // Biomed Research International. 2014. № 1. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2014/213570> (дата обращения 15.09.2024).
3. Блашкив Т.В., Шепель А.А., Вознесенская Т.Ю. Экспрессия генов клетками кумулюсного окружения ооцита в период овуляции и оплодотворения (обзор литературы) // Проблемы репродукции. 2014. № 1. С. 55–58.
4. The role of insulin-like growth factor 2 mRNA binding proteins in female reproductive pathophysiology / X. Xu, H. R. Shen, J. R. Zhang, X. L. Li // Reproductive Biology and Endocrinology. 2022. № 20 (89). URL: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-022-00960-z> (дата обращения 15.09.2024).
5. Scott R., Zhang M., Seli E. Metabolism of the oocyte and the preimplantation embryo: Implications for assisted reproduction // Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. 2018. № 30(3). P. 163–170. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000455

6. Impact of oocyte-secreted factors on its developmental competence in buffalo / S. Gupta, S. Pandey, M. S. Parmar, A. Somal et al. // Zygote. 2017. № 25 (3). P. 313–320.
7. Influence of mouse defective zona pellucida in folliculogenesis on apoptosis of granulosa cells and developmental competence of oocytes / Y. Wang, C. Lv, H. L. Huang, M.-H. Zeng et al. // Biology of Reproduction. 2019. Vol. 0, № 0. URL: <https://www.sci-hub.ru/10.1093/biolre/ioz093> (дата обращения 15.09.2024).
8. Overview: The role of follicle-stimulating hormone in preantral folliculogenesis of domestic animals: what can we learn from model species and what should we do next? / A.J. Morton, J.I. Candelaria, S.P. McDonnell, D.P. Zgodzai, A.K. Denikol // Animal. 2023. Vol. 17-1. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751731123000393?via%3Dihub> (дата обращения 15.09.2024).
9. Роль метаболитических гормонов в регуляции функции яичников у коров / В. А. Лебедев, И. Ю. Лебедева, Т. И. Кузьмина, И. Ш. Шапиев // Сельскохозяйственная биология. 2005. № 2. С. 14–20.