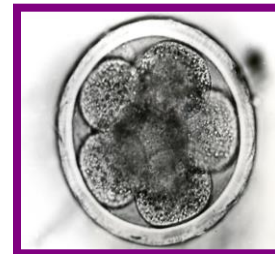
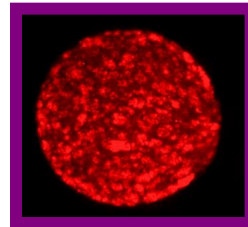
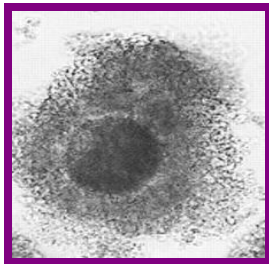


Качество донорского ооцита животных: проблемы и их решения

© *КУЗЬМИНА Т.И.*



от

ооцита

к

эмбриону

Санкт-Петербург-Пушкин, 2023



Клеточные репродуктивные и ДНК-технологии

- Искусственное осеменение
- Получение эмбрионов *in vivo* (суперовуляция)
- Трансплантация эмбрионов
- OPU – technology (трансвагинальная аспирация ооцитов)
- Криоконсервация ооцитов и эмбрионов
- Получение эмбрионов *In-vitro* (созревание ооцитов, оплодотворение, культивирование эмбрионов)
- Клонирование (деление эмбрионов, перенос бластомеров, соматическое клонирование)
- Трансгенез (CRISPR-Cas9)
- Определение пола эмбрионов
- Сортирование спермы

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ IN VITRO



крупная белая



Разработанные системы дозревания ооцитов коров и свиней in vitro позволяют получать до 90% созревших яйцеклеток, выход эмбрионов на завершающих стадиях доимплантационного развития составляет от 25 до 41%%.



АКАДЕМИК

ЭРНСТ ЛЕВ КОНСТАНТИНОВИЧ

**Present stage of embryo transfer
and the International Embryo Transfer Society (I.E.T.S.)**

W.W. LAMPETER

*Institut für Tierzucht und Tierhygiene der L.M.U.,
8000 München 22, Federal Republic of Germany*

The *International Embryo Transfer Society* (I.E.T.S.) has 560 members from 26 countries (Jan. 1982) and is serving its members with information related to E.T. This service includes abstracts, literature reviews and summaries, published in a newsletter. It holds a yearly meeting and publishes all reports presented at the meeting in « Theriogenology ».

About 35 000 calves were produced worldwide by E.T. techniques in 1981. Embryo collection and transfer of bovine embryos is done worldwide mostly non-surgically. The most widely used farm animal for E.T. is the cow.

Cow embryo culture *in vitro*

**L.K. ERNST, A.K. GOLUBEV, Z.N. MAKAROVA, R.S. MAMLEEV
and T.I. KUZMINA**

All-Union Research Institute of Farm Animal Breeding and Genetics, Leningrad, U.S.S.R.

Fertilization of the cow oocytes matured *in vitro* to the metaphase II stage resulted in the cleavage of the oocytes. The percentage of cleaving oocytes averaged 13.9. In some experiments it amounted to 33.7 p. 100. The cleaving embryos developed to the morula and even blastocyst stage. The mechanisms of the cleavage of cow oocytes are discussed.

Факторы, влияющие на результаты технологии получения эмбрионов in vitro

Биологические аспекты

Сезон года, уровень метаболизма, стадия эстрального цикла, размер фолликула, морфология ооцит-кумулюсного комплекса



Технологические аспекты

Состав сред для созревания ооцитов и культивирования эмбрионов, газовый и температурный режимы, уровень профессионализма эмбриотехнолога.



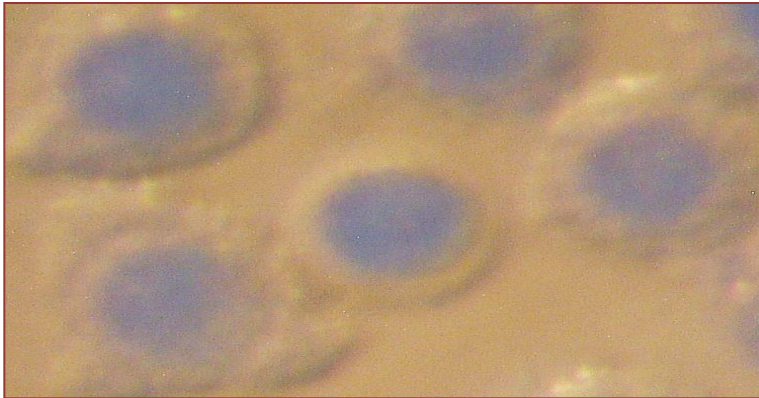
Потери ооцитов в результате мейотических процессов

ВИД	МАКСИМАЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ООЦИТОВ	ЧИСЛО ООЦИТОВ ПРИ РОЖДЕНИИ	ПОТЕРИ ООЦИТОВ(%)
Грызуны	50000-75000	10000-15000	80
Овца	900000	82000	91
Свинья	1200000	500000	58
Корова	2700000	135000	95
Человек	7000000	700000	90

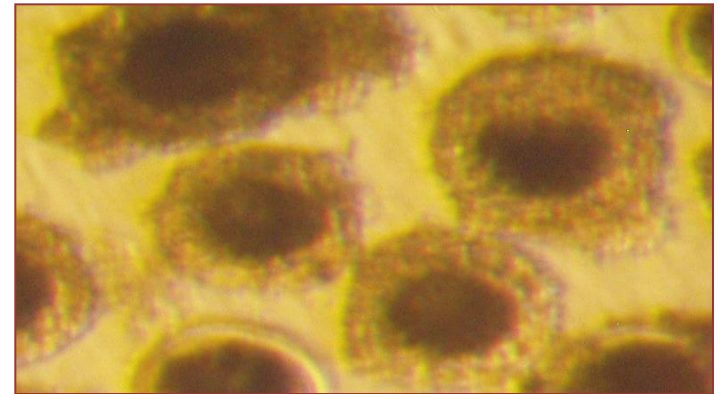


Окраска ооцитов ВСВ и их классификация

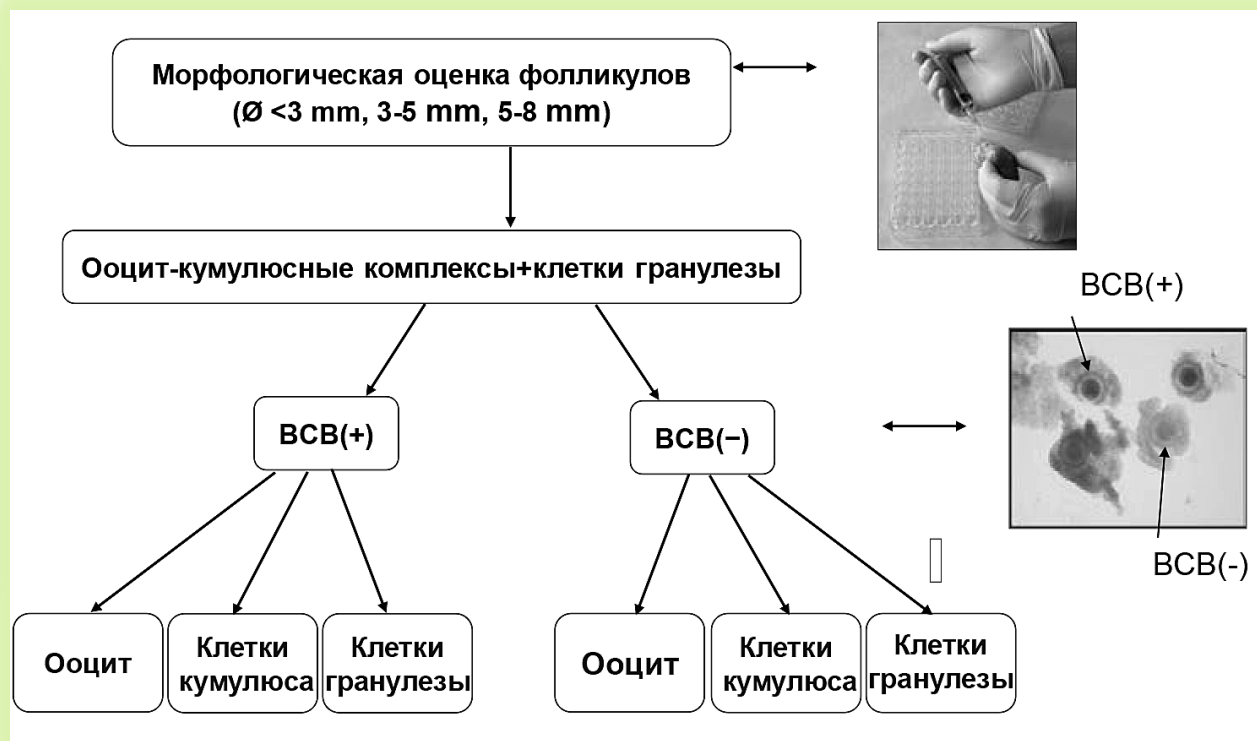
ВСВ(+) ооциты
(цитоплазма окрашена
в синий цвет)



ВСВ(-) ооцита
(цитоплазма не окрашена)



Оценка хроматина соматических клеток овариальных фолликулов коров — индикатор функционального статуса ооцита

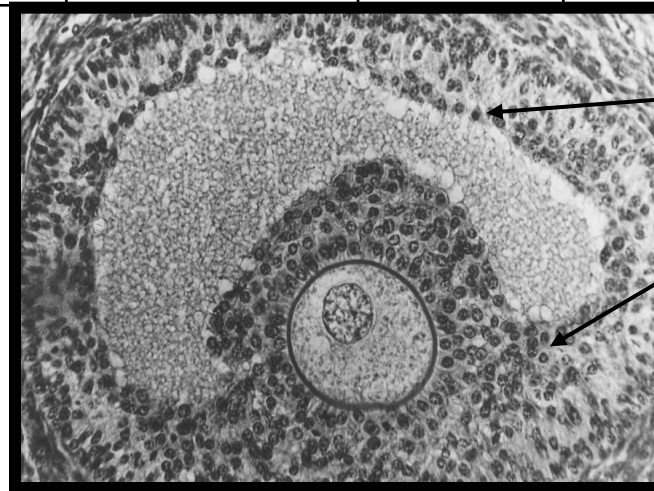


Этапы морфофункциональной оценки соматических и половых клеток овариальных фолликулов

Уровень пикнозов в клетках гранулезы коров из фолликулов разного диаметра, содержащих растущие и завершившие фазу роста ооциты

Диаметр фолликула	<3 n = 58		3-5 n = 63		6-8 n = 48	
	BCB(+) n = 32	BCB(-) n = 26	BCB(+) n = 49	BCB(-) n = 14	BCB(+) n = 38	BCB(-) n = 10
Всего клеток	3200	2600	4900	1400	3800	1000
Число нормальных клеток, n (%)	2944(92)	2470(95)	4361(89)	1316(94)	3334(88)	930(93)
Число клеток с пикнотическими ядрами, n (%)	256(8) ^A	130(5) ^B	539(11) ^C	84(6) ^D	456(12) ^E	70(7) ^H
Доля митотических клеток от общего числа с нормальным хроматином, n (%)	206(7) ^a	222(9) ^b	262(6) ^c	118(9) ^d	100(3) ^e	56(6) ^h

A:B; A: C; A:E; B:H; C:D; E: H p < 0,05
a:b; a:e; b:h; c:d; c:e; d:h; e:h p < 0,05



Клетки
гранулезы

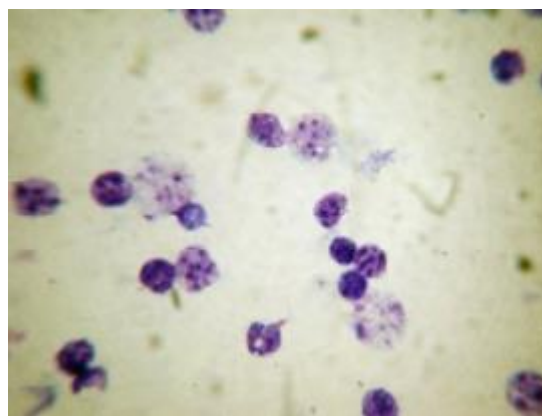
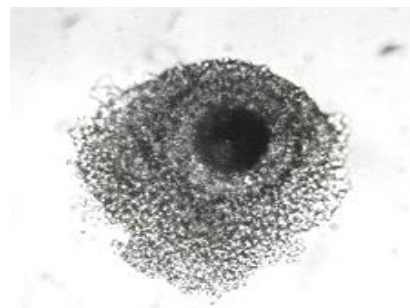


Уровень пикнозов в клетках кумулюса коров из фолликулов разного диаметра, содержащих растущие и завершившие фазу роста ооциты

Диаметр фолликула	<3 n = 58		3-5 n = 63		6-8 n = 48	
	BCB(+) n = 32	BCB(-) n = 26	BCB(+) n = 49	BCB(-) n = 14	BCB(+) n = 38	BCB(-) n = 10
Всего клеток	3200	2600	4900	1400	3800	1000
Число нормальных клеток, n (%)	3137(98)	2522(97)	4753 (97)	1358(97)	3610(95)	960(96)
Число клеток с пикнотическими ядрами, n (%)	63(2) ^A	78(3) ^B	147(3) ^C	42(3) ^D	190(5) ^E	40(4) ^F
Доля митотических клеток от общего числа с нормальным хроматином, n (%)	94(3) ^a	151(6) ^b	143(3) ^c	81(6) ^d	36(1) ^e	19(2) ^f

A:B; A: C; A:E; C:E P < 0,05

a:b; a:e; b:h; c:d; c:e; d:h; e:h P < 0,05



Уровень пикнозов в клетках гранулезы свиней из фолликулов разного диаметра, содержащих растущие и завершившие фазу роста ооциты

Диаметр фолликула	<3 n = 58		3-5 n = 63		6-8 n = 48	
	BCB(+) n = 32	BCB(-) n = 26	BCB(+) n = 49	BCB(-) n = 14	BCB(+) n = 38	BCB(-) n = 10
Всего клеток	3200	2600	4900	1400	3800	1000
Число нормальных клеток, n (%)	3008(94)	2418(93)	4214(86)	1288(92)	3116 (82)	900(90)
Число клеток с пикнотическими ядрами, n (%)	192(6) ^A	182(7) ^B	686(14) ^C	112(8) ^D	684(18) ^E	100(10) ^F
Доля митотических клеток от общего числа с нормальным хроматином, n (%)	211(7) ^a	145(6) ^b	126(3) ^c	52(4) ^d	31(1) ^e	27(3) ^f

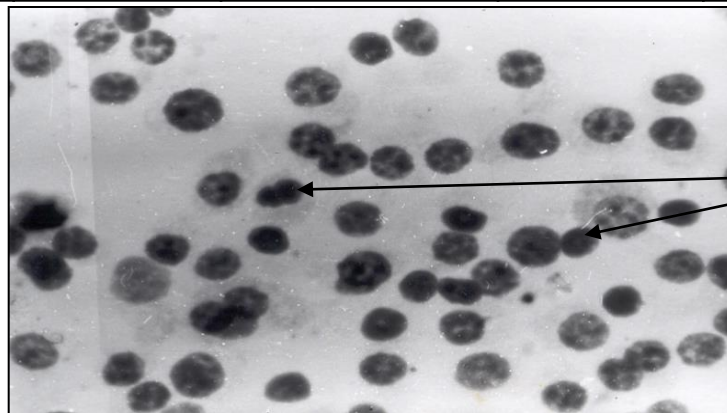
A:C, A:E, B:F, C:D, C:E, E:F P<0,05.



Уровень пикнозов в клетках кумюлюса свиней из фолликулов разного диаметра, содержащих растущие и завершившие фазу роста ооциты

Диаметр фолликула	<3 n = 58		3-5 n = 63		6-8 n = 48	
	BCB(+) n = 32	BCB(-) n = 26	BCB(+) n = 49	BCB(-) n = 14	BCB(+) n = 38	BCB(-) n = 10
Всего клеток	3200	2600	4900	1400	3800	1000
Число нормальных клеток, n (%)	3136(98)	2522(97)	4459(91)	1288 (92)	3420(90)	910(91)
Число клеток с пикнотическими ядрами, n (%)	64(2) ^G	78(3) ^H	441(9) ^I	112(8) ^J	380(10) к	90(9) ^L
Доля митотических клеток от общего числа с нормальным хроматином, n (%)	125(4) ^g	126(5) ^h	89(2) ⁱ	52(4) ^j	34(1) ^k	27(3) ^l

G:I, G:J, G:L, G:K, H:J, H:L P<0,05
g:k, h:l, h:l, i:j, i:k, k:l P<0,05



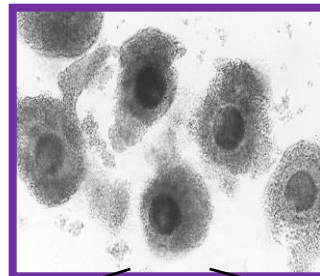
Кумюлюсные клетки
с пикнотическими ядрами



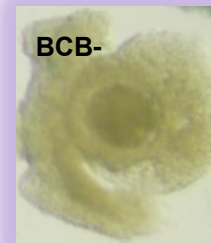
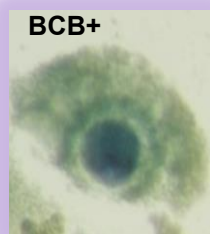
Функциональная активность митохондрий



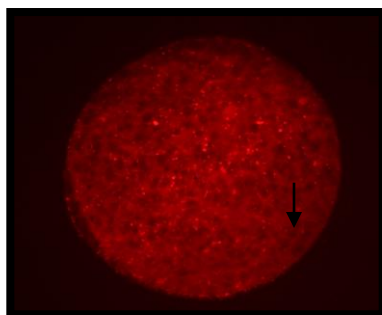
Визуальная морфологическая оценка качества ооцит-кумулюсных комплексов коров



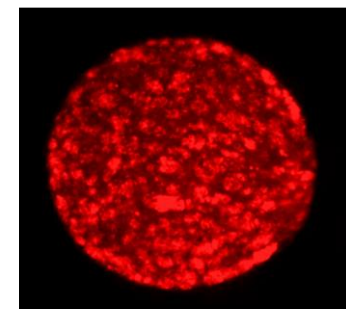
Фотометр для определения митохондриальной активности,



Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos (μA) в BCB(+) и BCB(-) ооцитах коров ($n = 90$)



Интенсивность флуоресценции в митохондриях BCB(+) ооцитов до созревания *in vitro* (зонд MitoTraker M 7510)



Интенсивность флуоресценции в митохондриях BCB(-) ооцитов до созревания *in vitro* (зонд MitoTraker M 7510)

BCB тест	Число ооцитов (n)	Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos (μA) в ооцитах
+	49	$370 \pm 23,7^a$
-	41	$482 \pm 24,27^b$

Уровень интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos в BCB(-) ооцитах превышает таковой в ооцитах, маркированных, как BCB(+) (до культивирования)

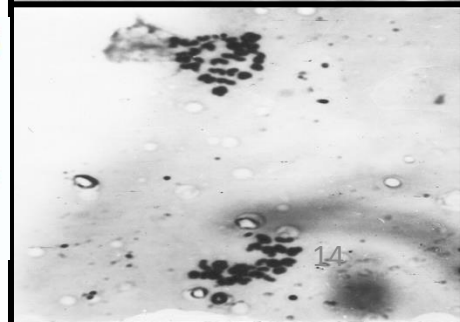
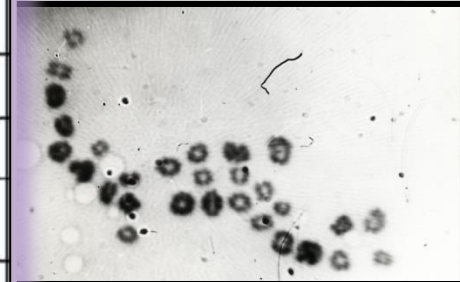
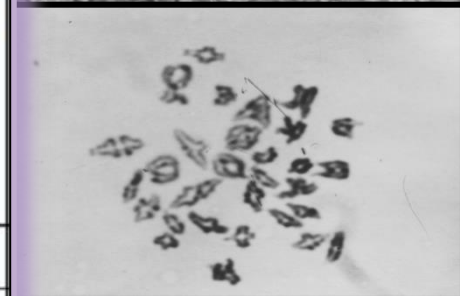
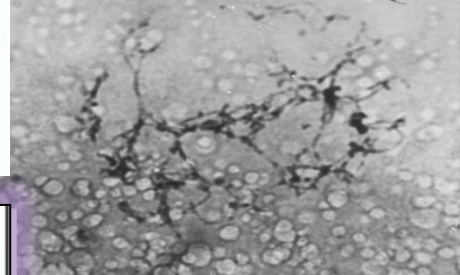
(Критерий Стьюдента) a:b P<0,01

Созревание in vitro ВСВ-тестированных ооцитов коров,

выделенных из яичников на разных стадиях овариального цикла

(время культивирования 24 часа, n ооцитов - 1106)

Тип яичника	ВСВ-тест	Число ооцитов (n)	% (n) созревших ооцитов	% (n) на стадиях диплотены-телофазы
Свежая овуляция	ВСВ(+)	182	77(140/182) ^a	23(42/182) ^k
	ВСВ(-)	143	63(90/143) ^b	37(53/143) ^l
Желтое тело	ВСВ(+)	134	79(106 /134) ^c	21(28/134) ^m
	ВСВ(-)	111	65(72/111) ^d	35(39/111) ⁿ
Стадия фолликулярного роста	ВСВ(+)	161	80(129/161) ^e	20(32/161) ^o
	ВСВ(-)	103	67(69/103) ^f	33(34 /103) ^p
Не определялась	ВСВ(+)	153	81(123/153) ^g	19(30/153) ^q
	ВСВ(-)	119	68(81/119) ^h	32(38/119) ^r



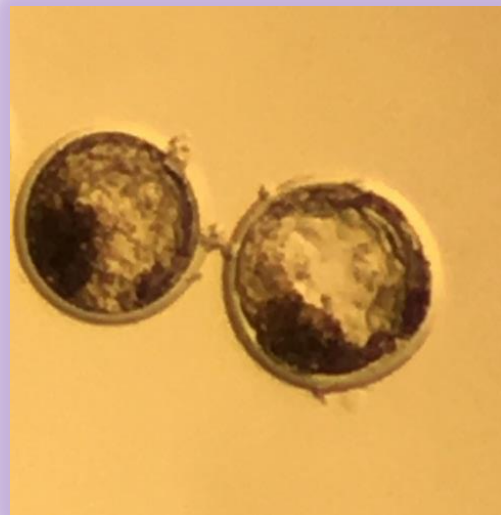
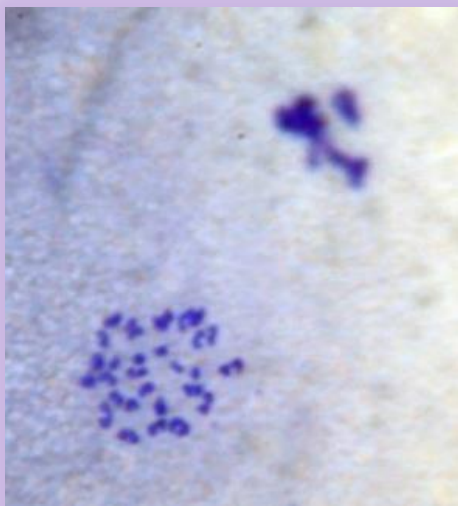
Среда созревания: ТС199+10%фетальной бычьей сыворотки + 10⁶ клеток/мл гранулезы+50 нг/мл ПРЛ

Достоверность различия сравниваемых значений (критерий χ^2 -квадрат): a:b; c:d; e:f;g:h;k;l;m:n;o:p;q;r;s;z;u:v;u;z;w;z;y;z. P<0,05

Развитие эмбрионов коров из завершивших фазу роста *in vivo* ооцитов, выделенных из фолликулов разного диаметра (число повторностей -3, число ооцитов – 229)

Диаметр фолликулов	Число ооцитов (n)	n/% созревших ооцитов	n/% дробления	n/% бластоцист	n/% дегенерированных эмбрионов (морфология, цитоанализ)
< 3 мм	69	56(81)	43(62)	21(31)	8/43(19)
3-5 мм	89	77(87)	63(71)	35(39)	9/63(14)
6-8 мм	71	60(85)	49(69)	22 (31)	7/49(14)

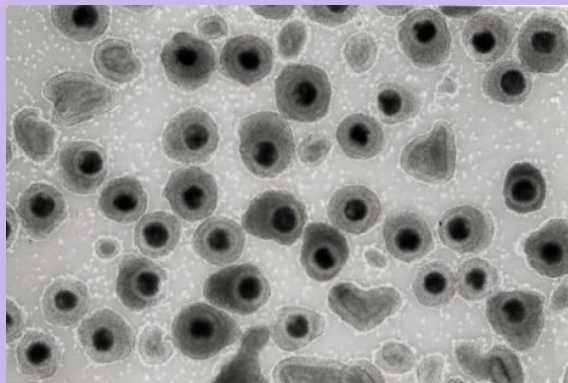
Среда культивирования: ТС-199+10%фетальной бычьей сыворотки + 10^6 клеток/мл гранулезы+10 нг/мл соматотропина



**Интенсивность флуоресценции комплекса хлортетрациклин+мембрана во
внутриклеточных депо ооцитов свиней после ВСВ-диагностики (у.е.)**

Диаметр фолликула	п ооцитов	ВСВ⁻ ооциты (у.е.)	ВСВ⁺ооциты (у.е.)
< 3мм	181	0,60 ± 0,038^a	0,79 ± 0,032^b
3-5мм	82	0,67 ± 0,049^d	0,86 ± 0,063^e
> 5мм	59	0,65 ± 0,033^g	1,06 ± 0,065^h

Достоверность различия сравниваемых значений: a,b; g,h; b,h P < 0,001; e,h. P < 0,01; d,e; P < 0,05 (Критерий Стьюдента)



Спасибо за внимание



«Omne vivum ex ovo»