

Л.В. ГОЛУБЕЦ, А.С. ДЕШКО, И.С. КЫССА, Ю.А. ЯКУБЕЦ,
В.И. БЕЛЕВИЧ, А.А. СЕХИН, В.Н. СУРМАЧ, Д.В. МАШТАЛЕР

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ Фолликулогенеза НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ АСПИРАЦИИ ООЦИТОВ

*Гродненский государственный аграрный университет,
г. Гродно, Республика Беларусь*

В работе представлены результаты исследований по изучению влияния регуляции фолликулогенеза на эффективность аспирации ооцитов. Как показывает анализ полученных данных, удаление фолликулов диаметром свыше 8 мм не оказывает влияния на эффективность аспирации ооцитов. Количественные и качественные показатели в опытной группе не отличались от контрольной. Удаление доминантного фолликула за 72 часа до начала аспирации позволило увеличить, в расчёте на одну аспирацию по сравнению с контролем, количество аспирированных фолликулов на 41 %, выход ооцитов – на 22,9%, в том числе ооцитов пригодных для культивирования – на 30,8 %. Стимуляции яичников препаратом «ФСГ-супер» увеличивала количество аспирированных фолликулов на 19,2-39,8 %, выход ооцитов – на 32,8-45,9 %, в том числе пригодных для постановки дозревания – на 39,6-43,7 %. Использование препарата «Плюсет» увеличивало количество аспирированных фолликулов на 35,9 %, выход ооцитов – на 35,3 %, в том числе пригодных на 43,9%.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, эмбрионы, реципиенты, *in vivo*, трансплантация эмбрионов.

L.V. GOLUBETS, A.S. DESHKO, I.S. KYSSA, Y.A. YAKUBETS, V.I. BELEVICH,
A.A. SEKHIN, V.N. SURMACH, D.V. MASHTALER

EFFECT OF EXOGENOUS FOLLICULOGENESIS REGULATION ON THE EFFICIENCY OF TRANSVAGINAL OOCYTE ASPIRATION

Grodno State Agrarian University, Grodno, Republic of Belarus

The paper presents the results of studies on the effect of folliculogenesis regulation on the efficiency of oocyte aspiration. The analysis of the obtained data shows that the removal of follicles with a diameter over 8 mm does not affect the efficiency of oocyte aspiration. Quantitative and qualitative indicators in the experimental group did not differ from the control one. Removal of the dominant follicle in 72 hours before aspiration, allowed to increase, calculated per one aspiration in comparison with the control, the number of aspirated follicles by 41%, yield of oocytes – by 22.9%, including oocytes suitable for cultivation – by 30.8%. Ovarian stimulation with “FSG Super” preparation increased the number of aspirated follicles by 19.2-39.8%, yield of oocytes – by 32.8-45.9%, including oocytes suitable for maturation – by 39.6-43.7%. “Pluset” preparation increased the number of aspirated follicles by 35.9%, yield of oocytes – by 35.3%, including those suitable for maturation – by 43.9%.

Keywords: cattle, embryos, recipients, *in vivo*, embryo transplantation.

Введение. В последние годы использование трансвагинальной аспирации ооцитов с целью получения эмбрионов *in vitro* получает всё большее распространение в племенных стадах крупного рогатого скота во всех странах с развитым молочным и мясным скотоводством. Однако, несмотря на это, существует ряд вопросов, требующих своего решения с целью повышения эффективности метода. Так, для крупного рогатого скота, особенно молочного направления продуктивности, характерно ограниченное количество антральных фолликулов в яичниках. Появление и опережающее развитие в процессе полового цикла доминантного фолликула приводит к торможению развития и последующей атрезии популяции остальных фолликулов. Даже при самом тщательном отборе компетентных к созреванию ооцит-кумулясных комплексов только около 35 % проходят полное цитоплазматическое созревание, успешно оплодотворяется и развивается до стадии бластоцисты [1, 2]. При этом отмечается, что условия оплодотворения яйцеклеток и культивирования ранних зародышей *in vitro* не имели такого решающего влияния как условия созревания. Рядом исследований установлено, что если созревание ооцитов происходило *in vivo*, а их оплодотворение и культивирование эмбрионов *in vitro*, потенциал к развитию таких клеток удваивался. Выход бластоцист при этом составлял 49,3 против 26,4 % соответственно [3, 4, 5]. Из чего следует, что внутрифолликулярный период роста и развития ооцитов крайне важный этап в процессе придания яйцеклетке компетентности для успешного оплодотворения и развития в полноценный жизнеспособный эмбрион. Поэтому многие исследования были направлены на определение фолликулярных характеристик, которые смогли бы подсказать ответ на вопрос о том, какие факторы ответственны за придание ооциту высокой компетентности к развитию. Исследования касались состава фолликулярной жидкости, размера фолликулов [3, 6, 7], гормонального фона [4], физиологического статуса яичников [7, 8, 9] и ряда других факторов. Однако, хотя эти исследования и предложили важные подсказки относительно фолликулярных особенностей, связанных с потенциалом развития ооцит-кумулясных комплексов, вопрос создания условий созревания, обеспечивающих 100 % компетенцию ооцитов к развитию, по-прежнему остаётся открытым.

Одним из направлений в решении этой задачи, по мнению ряда исследователей, является искусственная регуляция фолликулогенеза. Так, например, воздействуя на яичники экзогенными фолликулостимулирующими гормонами можно создавать новую популяцию растущих антральных фолликулов. Однако мнение об эффективности данного метода и его влиянии на компетенцию ооцитов у разных исследователей разное. Одни отмечают положительное влияние инъекции ФСГ на получение ооцитом компетенции к развитию [10], другие не

видят особой разницы между стимулированными животными и интактными по выходу жизнеспособных эмбрионов и даже отмечают снижение качества ооцитов у таких животных [6].

Мы в своих исследованиях с целью активизации фолликулогенеза, увеличения количества растущих фолликулов и повышения качества получаемых ооцитов использовали удаление всех фолликулов свыше 8 мм, а также доминантного фолликула как фактора инициации новой фолликулярной волны и микростимуляция яичников фолликулостимулирующими гормонами перед аспирацией ооцитов, с целью множественного роста фолликулов.

Цель работы: изучить эффективность трансвагинальной аспирации ооцитов при экзогенной регуляции фолликулогенеза.

Материал и методика исследований. Исследования проводились на базе отраслевой биотехнологической лаборатории по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет» в 2017–2019 гг.

В качестве доноров ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) использовали коров живой массой 650–800 кг в возрасте 4–8 лет с удоем по наивысшей лактации 10–13,5 тыс. кг молока жирностью 3,8 % и более.

Трансвагинальная пункция фолликулов проводилась с использованием ультразвуковой системы Aloka SSD 500, включающей в себя ультразвуковой сканер Aloka Prosound 2, ультразвуковой излучатель с частотой 7,5 MHz, вакуумную помпу Craft suction unit, держатель ультразвукового излучателя и иглы диаметром 18, 20G. Локализацию ооцит-кумулюсных комплексов проводили с помощью эмбрионального фильтра «EMCON», поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под микроскопом «Olympus» при 16- и 90-кратным увеличением, соответственно.

В качестве основной питательной среды для созревания ооцитов использовали TCM 199 с добавлением бикарбоната и пирувата натрия, а также гентамицина, с добавлением эстральной или фетальной сыворотки в концентрации 15 %, для культивирования ранних зародышей среду SOF.

В качестве фолликулостимулирующего гормона для микростимуляции яичников использовали препарат «ФСГ-супер» в дозе 12,5, 25, и 50 Арм. ед. и препарат «Плюсет» в дозе 250, 500 и 1000 ИЕ. Удаление доминантного фолликула проводили за 72 часа до аспирации.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Удаление доминантного фолликула инициирует начало новой фолликулярной волны и инициирует к росту новую популяцию фолликулов.

Как показывает анализ результатов, представленных в таблице 1, по изучению влияния удаления доминантного фолликула данная процедура, проведённая за 72 часа до начала аспирации, позволила увели-

чить в расчёте на одну аспирацию по сравнению с контролем количество аспирированных фолликулов на 41 %, выход ооцитов – на 22,9 %, в том числе ооцитов, пригодных для культивирования, на 30,8 %, из них отличного и хорошего качества – практически в два раза.

Таблица 1 – Влияние удаления доминантного фолликула на эффективность аспирации

Группы ооцитов	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов, n-%				
		всего	отличных и хороших	удовл., условно годных	всего пригодных	не пригодных
Опытная	103	71-68,9	30-42,2	31-43,7	61-85,9	8-11,3
В т.ч. на аспирацию	8,6±2,3	5,9±2,77	2,5±1,93	2,6±1,88	5,1±2,84	0,7±0,65
Контрольная	86	67-77,9	19-28,3	36-53,7	55-82,1	12-17,9
В т.ч. на аспирацию	6,1±1,6	4,8±1,19	1,3±0,56	2,6±1,01	3,9±1,32	0,9±0,54

Казалось бы, что удаление всех фолликулов диаметром свыше 6 мм (до появления доминантного фолликула) способно синхронизировать и стимулировать к росту их новую популяцию. Однако, как показывают результаты проведенных нами исследований, какого-либо заметного влияния на эффективность аспирации удаление фолликулов диаметром свыше 8 мм не оказало (таблица 2). Все показатели опытной группы, как количественные, так и качественные, практически не отличались от показателей контрольной группы. Так, уровень извлекаемости ооцитов составлял 85,1 и 84,7 %, выход эмбрионов, пригодных для постановки на дозревание, – 76,4 и 74,5 %, в том числе отличного и хорошего качества – 24,5 и 23,4 % в опытной и контрольной группах, соответственно.

Таблица 2 – Удаление фолликулов свыше 8 мм и эффективность аспирации

Группы ооцитов	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов, n-%				
		всего	отличных и хороших	удовл., условно годных	всего пригодных	не пригодных
Опытная	249	212-85,1	52-24,5	110-51,9	162-76,4	50-23,6
Контрольная	333	282-84,7	66-23,4	144-51,1	210-74,5	72-25,5

Одним из наиболее спорных и открытых до настоящего времени вопросов остаётся вопрос стимуляции яичников перед аспирацией с целью увеличения количества фолликулов. В своих опытах в качестве стимулятора мы использовали фолликулостимулирующий гормон ФСГ-Супер, в количестве 12,5, 25,0 и 50,0 единиц Арморевского стандарта и Плюсета в дозе 250, 500 и 1000 ИЕ (таблицы 3 и 4).

Как показали результаты исследований (таблица 3), стимуляция яичников ФСГ-супер увеличивала количество аспирированных на донора фолликулов на 19,2-39,8 %, выход ооцитов на донора в целом – на 32,8-45,9 %, в том числе пригодных для постановки дозревания – на 39,6-43,7 %. Доза введённого препарата достоверного влияния на количественные и качественные показатели аспирации не оказала. Количество аспирированных на донора фолликулов колебалось в пределах 9,3-10,9, количество полученных ооцитов – в пределах 8,1-8,9, в том числе пригодных для культивирования – в пределах 6,7-6,9.

Таблица 3 – Влияние микростимуляции препаратом ФСГ-Супер на эффективность аспирации ооцитов

Группа животных	Доноров, п	Аспирировано фолликулов		Получено ОКК, п-%			
		все-го	в т. ч. на донора	всего	в т. ч. на донора	всего пригодных	
						всего	в т. ч. на донора
Опытная I 25 Арм. ед.	12	131	10,9±4,87	107-81,7	8,9±4,60	83-77,6	6,9±3,60
Опытная II 12,5 Арм. ед.	10	93	9,3±1,49	81-87,1	8,1±1,52	67-82,7	6,7±1,70
Опытная III 50 Арм. ед.	10	101	10,1±2,42	84-83,2	8,4±2,17	69-82,1	6,9±2,02
Контрольная	14	109	7,8±3,35	86-78,9	6,1±1,17	67-77,9	4,8±2,86

Микростимуляция фолликулярного роста фолликулостимулирующим гормоном Плюсета позволила повысить, по сравнению с контролем, в целом на донора количество аспирированных фолликулов на 35,9 %, выход ооцитов – на 35,3 %, в том числе пригодных – на 43,9 % (таблица 4).

При анализе результатов микростимуляции в зависимости от дозы введенного гормона установлено более высокая ответная реакция яичников при использовании 1000 ИЕ Плюсета. При этом количество аспирированных фолликулов на донора увеличивалось по сравнению с дозой 250 и 500 ИЕ на 59,7 и 21,6 %, выход ооцитов в целом на донора

– на 70,6 и 19,2 % и выход ооцитов пригодных для культивирования – на 60,0 и 18,0 % соответственно.

Таблица 4 – Влияние микростимуляции препаратом Плюсет на эффективность аспирации ооцитов

Группа животных	Доноров, п	Аспирировано фолликулов		Получено ОКК, п-%			
		всего	в т. ч. на донора	всего	в т. ч. на донора	всего пригодных	
						всего	в т. ч. на донора
Опытная I	14	94	6,7±1,98	72-76,6	5,1±1,51	63-87,5	4,5±1,60
Опытная II	14	124	8,8±1,64	102-82,2	7,3±1,82	86-84,3	6,1±1,46
Опытная III	12	129	10,7±6,25	105-81,4	8,7±5,94	86-81,9	7,2±5,51
ИТОГО	40	347	8,7±4,14	279-80,4	6,9±3,57	235-84,2	5,9±3,47
Контрольная	12	77	6,4±1,18	61-79,2	5,1±0,80	49-80,3	4,1±1,08

Заключение. Полученные в результате исследований данные показали, что кратность использования доноров, частота аспираций, а также количество фолликулов в яичнике достоверных различий не имеют и не влияют на эффективность аспирации ооцитов у коров. Выход ооцитов отличного и хорошего качества повышается при аспирации ооцитов в лютеиновую фазу полового цикла на 8,4 п. п. и остаётся без изменений при проведении аспираций ооцитов в фолликулярную фазу. Наличие в яичниках фолликулов диаметром свыше 8 мм снижает выход ооцитов отличного и хорошего качества в среднем на 9,4 п. п., а удаление доминантного фолликула (за 72 ч до начала аспирации) повышает количество фолликулов на 41 %, выход ооцитов – на 22,9 % в том числе ооцитов, пригодных для культивирования, – на 30,8 %. Микростимуляция яичников фолликулостимулирующим гормоном ФСГ-супер и Плюсет повышает эффективность аспирации ооцитов 19,2-45,9 %.

Литература

1. Boni, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis / R. Boni // Anim. Reprod. Sci. – 2012. – Vol. 9. – P. 362-369.
2. Некоторые аспекты получения ооцитов крупного рогатого скота путем трансвагинальной пункции фолликулов / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко, И. С. Кысса, М. В. Попов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 123-128.
3. Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the pre-implantation development of cloned bovine embryos / L. J. Ding [et al.] // Mol. Reprod. Dev. – 2008. – Vol. 75. – P. 1710-1715.

4. Bilodeau-Goeseels, S. Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodi-esterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes / S. Bilodeau-Goeseels // Mol. Reprod. Dev. – 2011. – Vol. 78. – P. 734-743.
5. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology / F.A. Ward [et al.] // Theriogenology. – 2000. – Vol. 54. – P. 433-446.
6. Cebrian-Serrano, A. Beneficial effect of two culture systems with small groups of embryos on the development and quality of in vitro-produced bovine embryos / A. Cebrian-Serrano, I. Salvador, M. A. Silvestre // Anat Histol Embryol. – 2014. – Vol. 43. – P. 22-30.
7. Holding bovine oocytes in the absence of maturation inhibitors: kinetics of in vitro maturation and effect on blastocyst development after in vitro fertilization / H. Alm [et al.] // Theriogenology. – 2008. – Vol. 70. – P. 1024-1029.
8. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production / R. De Roover [et al.] // Reprod. Domest. Anim. – 2008. – Vol. 43. – P. 239-245.
9. Nuclear maturation kinetics and in vitro embryo development of cattle oocytes pre-matured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine / P. Adona [et al.] // Anim. Reprod. Sci. – 2008. – Vol. 104. – P. 389-397.
10. Первый опыт получения эмбрионов крупного рогатого скота in vitro в системе трансвагинальной аспирации ооцитов (ТАО) / В. К. Пестис [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2015. - № 1. – С. 86-91.

Поступила 30.03.2020 г.

УДК 636.1.082.22

М.А. ГОРБУКОВ, А.Н. РУДАК, Ю.И. ГЕРМАН

ПОРОДНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СЕЛЕКЦИОНИРУЕМЫХ ПРИЗНАКОВ ЛОШАДЕЙ В ПЛЕМЕННЫХ И КОННОСПОРТИВНЫХ ОРГАНИЗАЦИЯХ БЕЛАРУСИ

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

Установлено разнообразие породного состава и генеалогической структуры селекционных групп лошадей в конноспортивных организациях Беларуси. Показана зависимость племенной ценности потомства от индивидуальной сочетаемости родительских пар, взаимосвязь работоспособности молодняка на заводских испытаниях с последующими достижениями его в конном спорте. Из общего количества испытанного молодняка (n=542) количество призеров в конном спорте оказалось 61 голова (11,3 %), что подтверждает необходимость улучшения селекционно-технологических аспектов его выращивания, осуществления тщательного отбора на всех этапах спортивной подготовки и использования.

Ключевые слова: лошади, конноспортивные организации, работоспособность, племенная ценность, кроссы линий, наследуемость.