

Литература

1. Мороз, В. А. Овцеводство и козоводство : учебник / В.А. Мороз. – Ставрополь : АГРУС, 2005. – 495 с.
2. Медведский, В. А. Овцеводству – зелёный свет / В. А. Медведский // Наше сельское хозяйство. – 2013. – № 14(70). – С. 66–70.
3. Цирельсон, Н. Б. Основы животноводства / Н. Б. Цирельсон. – Москва : Высшая школа, 1974. – 502 с.
4. Слесарев, И. К. Обмен веществ и продуктивность жвачных животных в связи с химизацией кормления : автореф. дисс.... д-ра биол. наук / Слесарев И.К. – Оренбург, 1972. – 59 с.
5. Республиканская программа развития овцеводства на 2013–2015 гг. : утв. Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 20.03.2013 года. – № 202. – 11 с.
6. Комплекс мер по развитию овцеводства в Республике Беларусь на 2019-2025 годы : утв. Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 07.08.2019 года за № 524. – 12 с.
7. Рекомендации по воспроизводству маточного поголовья овец : методические рекомендации / Ю. И. Герман [и др.] ; РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». – Жодино, 2015. – 46 с.
8. Отраслевой регламент разведения овец многоплодного полутонкорунного типа. Типовые технологические процессы / Ю. И. Герман [и др.] ; РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». – Жодино, 2016. – 34 с.
9. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск : Высшая школа, 1973. – 318 с.
10. Справочник зоотехника / под ред. А. Н. Калашникова. – Москва : Агропромиздат, 1986. – 479 с.

Поступила 12.03.2021 г.

УДК 636.2:612.64:591.463.1

Л.В. ГОЛУБЕЦ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕМЕНИ С ОПРЕДЕЛЕННЫМ ПОЛОМ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

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

В статье представлены результаты работы, целью которых было установить эффективность оплодотворения в культуре in vitro яйцелеток крупного рогатого скота спермой, разделенной по полу. Всего было оплодотворено 1804 яйцеклетки: 770 обычной спермой и 1034 сексированной. Получено 583 бластоцисты. Уровень дробления оказался практически одинаковым и составил при использовании обычной спермы 91,9%, а при использовании спермы с определенным полом – 91,3%. Выход бластоцист, при оплодотворении сексированным семенем составил 29,9% от числа оплодотворенных яйцеклеток и 32,7% от числа дробящихся зародышей, что оказалось ниже по сравнению с обычным семенем на 5,7 и 6,0п.п., соответственно.

Ключевые слова: ооциты, яйцеклетки, эмбрионы, сперма, разделенная по полу, сексированная сперма, оплодотворение.

L.V. GOLUBETS

USE OF SEMEN WITH A SPECIFIC GENDER FOR OBTAINING CATTLE EMBRYOS IN *IN VITRO* CULTURE

Grodno State Agrarian University, Grodno, Republic of Belarus

The paper presents the results of work with purpose to establish the efficiency of fertilization in *in vitro* culture of oocytes of cattle with semen divided by gender. In total, 1804 oocytes were fertilized: 770 with ordinary semen and 1034 with divided by gender. 583 blastocysts were obtained. The cleavage level was almost the same and made 91.9% when using ordinary semen, and 91.3% when using semen with certain gender. The output of blastocysts during fertilization with certain gender semen made 29.9% of the number of fertilized oocytes and 32.7% of the number of cleaving embryos, which turned out to be 5.7 and 6.0 p.p. lower compared to ordinary semen, respectively.

Keywords: oocytes, embryos, semen divided by gender, sexed semen, fertilization.

Введение. Установление того факта, что ооциты, извлеченные из фолликула и помещенные в соответствующие условия, возобновляют мейоз, созревают до стадии оплодотворения, а полученные после оплодотворения зародыши способны развиваться до предимплантационных стадий, послужило основой разработки технологии получения эмбрионов вне организма матери или в культуре *in vitro*. С разработкой метода трансвагинальной аспирации ооцитов (ТАО/ОПУ) данная технология стала одним из наиболее динамично развивающихся и занимающих все более прочное положение биотехнологических методов интенсификации использования репродуктивного и генетического потенциала племенных животных [1, 2, 3].

Значительно расширила рамки использования животных с выдающимися селекционными признаками и способна, в ближайшем будущем, стать если не альтернативой, то сильным конкурентом обычной трансплантации эмбрионов, в отличие от которой может успешно использоваться независимо от физиологического и репродуктивного статуса донора. Например, ооциты могут извлекаться до двух раз в неделю независимо от стадии полового цикла, их можно получать у стельных (до 3-х месяцев) животных, животных с патологиями репродуктивного тракта (за исключением яичников). Для получения ооцитов нет необходимости в гормональной стимуляции множественного роста фолликулов. ТАО не оказывает значительного влияния на яичниковые структуры и их функциональную активность, а также на репродуктивную систему в целом [1, 4, 5, 6, 7]. Она может быть использована при получении эмбрионов у животных с нарушенной воспроизводительной

функцией и у тех, которые не дают эмбрионов при трансплантации [1, 6]. И, что самое главное, в перерасчете на месячную эмбриопродуктивность давать большее количество зародышей по сравнению с трансплантацией эмбрионов. Так, при обычной трансплантации донор может быть использован примерно 4 раза в год и дать в итоге 20 качественных эмбрионов. Использование ТАО позволяет проводить аспирацию два раза в неделю и при этом получать по два эмбриона или 8 эмбрионов за месяц или 96 эмбрионов за год, что в 4-5 раз больше количества эмбрионов, полученных от донора за год при обычной трансплантации [6].

Таким образом, к настоящему времени трансвагинальная аспирация ооцитов превратилась в хорошо зарекомендовавший себя метод получения высокоценного генетического материала в виде ооцитов, яйцеклеток и эмбрионов. Однако, несмотря на явные успехи и множество исследований, проведенных с целью повышения эффективности метода, многие вопросы продолжают оставаться открытыми для изучения, а также появляются новые, требующие к себе внимания. Так, в последние годы во многих странах мира пристальное внимание уделяется регуляции пола у сельскохозяйственных животных, которая представляет значительный практический интерес, поскольку способствует ускорению генетического прогресса в селекционно-племенной работе [8]. Ранее изучалась возможность разделения сперматозоидов, содержащих X- или Y-хромосому следующими способами: осаждение, центрифугирование в градиенте, электрофорез, обработка специфическими антителами и т.д. [9]. Однако на практике не было получено убедительных доказательств эффективности этих приемов. На основании результатов исследований, проведенных американскими учеными, была усовершенствована обычная аналитическая проточно-цитометрическая система и разработана Белтсвилская технология разделения спермы, которая состоит из нескольких операций [10]. Первое время после разработки описанной технологии использовали стандартную скоростную систему с рабочим давлением в пределах 0,84 кг/см². При этом скорость разделения клеток составляла 350 тысяч сперматозоидов в час. Позднее, когда технология была усовершенствована, в том числе за счет повышения давления в системе до 4,22 кг/см², стало возможным сортировать до 11 млн сперматозоидов в час и получать образцы, содержащие 90 % клеток с X- или Y-хромосомой [11].

В 1988 году установлено, что разделенные с помощью проточной цитометрии сперматозоиды способны к образованию пронуклеуса при введении в ооциты хомячков [12]. В том же году английскими исследователями были проведены первые опыты по использованию разделенной спермы для искусственного осеменения телок и крольчих [13]. Две группы телок осеменяли с помощью цервикального введения фракции

сперматозоидов с X- или Y-хромосомой. В дозе содержалось 5 миллионов клеток. Оплодотворяемость животных оказалась очень низкой, и телки в основном абортывали между 4-м и 5-м месяцем беременности. Изучение половых органов у абортыванных плодов показало, что в случае осеменения X-фракцией 8 из 11 плодов были самками, при использовании Y-фракции 12 из 20 плодов - самцами. Низкие результаты оплодотворяемости были получены и у крольчих, однако в этом случае удалось получить живых крольчат, которые нормально развивались и в дальнейшем принесли здоровое потомство. Позднее были проведены успешные эксперименты по оплодотворению яйцеклеток крупного рогатого скота разделенными сперматозоидами *in vitro* [14]. С помощью проточной цитометрии получали фракции спермы, содержащие до 79 % половых клеток с X-хромосомой и до 70 % - с Y-хромосомой. Телкам пересаживали эмбрионы предполагаемого пола, в результате чего в первой группе родилось 3 телочки, во второй - 3 бычка. В последующих опытах удалось получить до 90 % телят мужского пола [15]. Также был проведен ряд экспериментов по изучению эффективности пересадки коровам эмбрионов, полученных *in vitro* с помощью разделенного семени [16]. Приживляемость эмбрионов у коров со спонтанным эструсом составила 16,3, у коров с синхронизированным эструсом - 20,0, у телок - 34,2 %. Из 40 родившихся телят 37 были телочками.

В более поздних исследованиях изучали эффективность пересадок коровам заморожено-оттаянных эмбрионов, полученных *in vitro* с использованием фракции X-сперматозоидов [17]. Приживляемость таких эмбрионов в опытной группе составила 40,9 %, в контрольной, где использовали обычные эмбрионы, - 41,9 %. Всего родилось 458 телят, из которых 96,8 % были самками. Применение высокоскоростной проточной цитометрии для разделения сперматозоидов быков не оказывает отрицательного влияния на структурное состояние ДНК в клетках [18]. Коммерческое использование разделенной по полу спермы в зарубежных странах началось с 2000 года и к настоящему времени в мире получено более 2 млн телят [19]. В основном разделенную сперму быков используют для осеменения телок. Таким образом, технология разделения сперматозоидов по полу с использованием высокоскоростной проточной цитометрии представляет эффективный способ регуляции пола и в настоящее время находит применение в практике разведения не только крупного рогатого скота, но и других видов сельскохозяйственных животных.

Целью нашей работы явилось изучение эффективности использования при оплодотворении ооцитов спермы, разделенной по полу.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в отраслевой биотехнологической лаборатории по репродукции

сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет» и в селекционно – генетическом центре ООО «Бетагран-Липецк» (РФ). Пункция фолликулов проводилась с использованием ультразвуковой системы AlokaSSD 500, включающей в себя ультразвуковой сканер AlokaProsound 2, ультразвуковой излучатель с частотой 7,5 МГц, вакуумную помпу Craft suction unit, держатель ультразвукового излучателя, иглы длиной 55 см и диаметром 18G. Скорость аспирации фолликулярной жидкости составляла 25мл/мин. В качестве промывной жидкости использовали фосфатно солевой буфер Дюльбекко с добавлением 100 ед./мл гентамицина и 1% BSA. Локализацию ооцит-кумулясных комплексов проводили с помощью эмбрионального фильтра «EMCON», поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под микроскопом «Olympus» при 16- и 90-кратным увеличением, соответственно. Качество ооцит-кумулясных комплексов оценивалось по 4-х бальной шкале. При этом основным критерием являлось наличие кумулюса и его качество. Ооциты отличного качества имели более трех слоев кумулюса, хорошего - 2-3 слоя, удовлетворительного – 1 слой кумулюса или его фрагменты на отдельных участках зоны пеллюцида.

Таблица 1 – Сравнительная эффективность оплодотворения ооцитов обычной и разделенной по полу спермой

Показатели	Обычное семя					Семя, разделенное по полу					
	Быки-производители										
	Ног один	Аллегро	Райт	Мольнар	Итого	Маузер	Мосби	Коди	Бипшог	Инспект	Итого
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Оплодотворено ОКК, n	245	184	204	137	770	346	358	121	92	117	1034
Дробящихся зародышей, n	220	172	189	127	708	321	322	107	88	106	944
Уровень дробления, %	89,8	94,5	93,5	92,7	91,9	93,0	90,6	88,4	95,6	90,6	91,3
Выход бластоцист, n	75	57	78	64	274	94	96	50	32	37	309

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Процент от оплодотворенных ооцитов	30,6	31,0	38,2	46,7	35,6	27,2	26,8	41,3	34,8	31,6	29,9
Процент от дробящихся зародышей	34,1	33,1	41,3	50,4	38,7	29,3	29,8	46,7	36,4	34,90	32,7

Неудовлетворительные ооциты, это ооциты без кумулюса. В качестве основной среды созревания использовалась TCM-199 с добавлением 10 мкг/мл ФСГ, 5 мкг/мл эстрадиола и 5 мкг/мл ЛН, а также 5% эстральной сыворотки. Оплодотворение проводилось замороженно-оттаянным семенем обычным и разделённым по полу в среде FertTalp. Получение активной фракции сперматозоидов проводили путём центрифугирования.

Очищенные зиготы помещались в среду SOF и культивировались при температуре 38,5° С, максимальной влажности (95%), газовой атмосфере, состоящей из 5% CO₂ и O₂ и 90% N₂, в течение 7-8 суток. Количество дробящихся зародышей подсчитывали через 48 и 72 часа после оплодотворения.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Технология разделения сперматозоидов по полу с использованием высокоскоростной проточной цитометрии представляет собой эффективный способ регуляции пола и в настоящее время находит применение в практике разведения не только крупного рогатого скота, но и других видов сельскохозяйственных животных [20]. Дальнейшее совершенствование этой технологии позволит улучшить результативность разделения сперматозоидов и повысить эффективность искусственного осеменения животных. Однако сегодня использование в процессе разделения красителей, воздействия лазерного излучения и электростатического поля и центрифугирования приводит к снижению энергетического запаса сперматозоидов, что приводит к снижению оплодотворяющей способности семени в среднем на 15 %, по сравнению с обычным. и повышает чувствительность к криоконсервации. Кроме этого, на выходе мы получаем значительно меньшую концентрацию сперматозоидов в дозе: 2,5-3,5 млн. спермиев против 15млн. в дозе обычной спермы [21]. В связи с вышесказанным особое внимание было обращено на использование сексированной спермы при получении эмбрионов в культуре *in vitro*. Были проведены успешные эксперименты по оплодотворению яйцеклеток крупного рогатого скота разделенными сперматозоидами вне организма

матери и трансплантации полученных таким образом эмбрионов реципиентам.

В процессе своих исследований, результаты которых представлены в таблице 1, мы использовали обычную сперму от четырех быков и разделенную по полу от пяти. Обычной спермой было оплодотворено 770 яйцеклеток. Всего оплодотворилось 708 клеток. При этом уровень дробления составил 91,9%. По итогам эксперимента было получено 274 бластоцисты, что составило 35,6% от оплодотворенных яйцеклеток и 38,7% от числа дробящихся зародышей. При использовании семени разделенного по полу по уровню дробления различий практически не было 91,9% (обычное семя) и 91,3% (сексированное семя). Что касается бластоцист, их выход от числа оплодотворенных яйцеклеток при оплодотворении сексированным семенем снижался на 5,7п.п. а от числа дробящихся зародышей на 6,0п.п.

Заключение. Таким образом, использование семени, разделенного по полу при получении эмбрионов крупного рогатого скота в культуре *in vitro* показало свою достаточно высокую эффективность, практически не уступающую обычному семени. При этом уровень дробления составил 91,3 и 91,9%, выход бластоцист от числа оплодотворенных клеток 29,9 и 35,6%, а от числа дробящихся зародышей 32,7 и 38,7%, соответственно.

Литература

1. Boni, R. Impact of Ovum Pick-Up (OPU) technique for research and animal breeding / R. Boni, L. Zicarelli, T. A. M. Kruij // *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy* / АЕТЕ. - Amsterdam: Elsevier, 1995. - P. 211-221
2. Эффективность применения раствора мелоксикама в воспроизводстве и трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота / Д. М. Богданович [и др.] // *Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2018. – Т. 53, ч. 1. – С. 29-38.*
3. Пайтеров, С. Н. Эффективность применения раствора мелоксикама в трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота / С. Н. Пайтеров, Д. М. Богданович // *Актуальные проблемы ветеринарии и интенсивного животноводства : материалы нац. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию со дня рожд. Заслуж. работника высшей школы РФ, Почетного проф. Брянской ГСХА, д-ра вет. наук, проф. А. А. Ткачева. – Брянск, 2018. – С. 119-122.*
4. Bols, P. Gebruik van de transvaginale Ovum Pick-Up (OPU) techniek: geboorte van de eerste OPU kalveren in België. (Use of transvaginal oocyte pick-up: first OPU calves born in Belgium) / P. Bols, A. Soom Van, A. de Kruij // *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. – 1996. – Vol. 65. – P. 86-91.*
5. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results / J. F. Hasler [et al.] // *Theriogenology. – 1995. – Vol. 43. – P. 141-152*
6. Potential use of Ovum Pick-Up for embryo production and breeding in cattle // T. Kruij [et al.] // *Theriogenology. – 1994. – Vol. 42. – P. 675-683.*
7. Пайтеров, С. Н. Эффективность использования дексаметазона при криоконсервировании эмбрионов крупного рогатого скота / С. Н. Пайтеров, Д. М. Богданович // *Актуальные проблемы ветеринарии и интенсивного животноводства : материалы нац. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию со дня рожд. Заслуж. работника высшей школы РФ, Почетного проф. Брянской ГСХА, д-ра вет. наук, проф. А. А. Ткачева. – Брянск, 2018. – С. 123-126.*

8. Seidel, G. E. Jr. Overview of sexing sperm / G. E. Jr. Seidel // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 68. – P. 443-446
9. Validating bovine sexed semen samples using quantitative PCR / H. Joerg [et al.] // *J. Anim. Breed. Genet.* – 2004. – Vol. 121. – P. 209-215.
10. Johnson, L. A. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sorting gives improved sperm output for IVF and A.I. / L. A. Johnson, G. R. Welch, W. Rens // *J. Anim. Sci.* – 1999. – Vol. 77, Suppl. 2. – P. 213-220.
11. Johnson, L. A. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X- and Y- sperm for maximum efficiency / L. A. Johnson, G. R. Welch // *Theriogenology*. – 1999. – Vol. 52. – P. 1323-1341.
12. Johnson, L. A. Flow sorting of X- and Y- chromosome-bearing mammalian sperm: activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes / L. A. Johnson, R. N. Clarke // *Gamete Res.* – 1988. – Vol. 21. – P. 335-343.
13. Sexing of sperm by flow cytometry / J. M. Morrell [et al.] // *Vet. Record*, 1988, 122: 322-324
14. Cran D.G., Johnson L.A., Miller N.G. e. a. Production of bovine calves following separation of X- and Y- chromosome-bearing sperm and in vitro fertilization / D. G. Cran [et al.] // *Vet. Record*. – 1993. – Vol. 132. – P. 40-41.
15. Cran, D. G. Sex preselection in cattle: a field trial / D. G. Cran, L. A. Johnson, C. Polge // *Vet. Record*. – 1995. – Vol. 136. – P. 495-496.
16. In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows / R. D. Wilson [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2005. – Vol. 88. – P. 776-782.
17. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm / J. Xu [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2006. – Vol. 89. – P. 2510-2518.
18. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay / G. B. Boe-Hansen [et al.] // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 63. – P. 1789-1802.
19. Rath, D. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen / D. Rath, L. Johnson // *Reprod. Domest. Anim.* – 2008. – Vol. 43. – P. 338-346.
20. Cran D. G. Semen sexing, practice and application. Third conf. of Europe Society for domestic animal reprod. Anger, France, 1999: 18-19.
21. Seidel, Jr. G. E. Sexing mammalian sperm-intertwining of commerce, technology, and biology / Jr. G. E. Seidel // *Anim. Reprod. Sci.* – 2003. – Vol. 79. – P. 145-156.

Поступила 20.04.2021 г.

УДК 636.2:612.64

Л.В. ГОЛУБЕЦ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА IN VIVO И IN VITRO

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

Большое значение в повышении эффективности вспомогательных репродуктивных технологий in vivo и in vitro имеет эмбриопродуктивность доноров. Важную роль в повышении ее уровня может сыграть оптимизация использования доноров. В процессе