

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭПИНИФРИНА И ГИПОТАУРИНА В СРЕДАХ ДЛЯ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ООЦИТОВ IN VITRO

А.И. ГАНДЖА, кандидат сельскохозяйственных наук  
Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, кандидат сельскохозяйственных наук  
В.П. СИМОНЕНКО  
РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»  
Л.В. ГОЛУБЕЦ, доктор сельскохозяйственных наук  
УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Реферат. Использование эпинифрина и гипотаурина в средах для оплодотворения ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* позволяет получать до 61,6 % дробящихся клеток и 16,7-41,8 % морул-бластоцист.

Ключевые слова: ооциты, оплодотворение, эпинифрин, гипотаурин, зародыши, питательная среда.

**Введение.** Новые технологии воспроизводства домашних животных внесли огромный вклад в быстрый генетический прогресс, наблюдаемый в последние десятилетия. Искусственное осеменение и трансплантация эмбрионов почти полностью изменили племенную работу в скотоводстве. Оплодотворение *in vitro* – относительно новый метод. Первый телёнок из оплодотворённой вне организма клетки родился в 1981 г., впоследствии родилось ещё несколько телят. Однако этот метод сочли непригодным для широкого применения вследствие его сложности. Дальнейшие разработки исследователей были направлены на упрощение метода за счёт использования искусственных сред и создания искусственных условий выращивания зародышей без снижения выхода полноценных эмбрионов и их жизнеспособности [1, 3, 4, 8].

Оплодотворение ооцитов протекает в культуральных средах в контролируемых условиях и включает ряд процессов, обуславливающих непосредственное слияние гамет: контакт и пенетрация кумулюсных клеток сперматозоидами, слияние мембран ооцита и сперматозоида, пенетрация зоны пеллюцида, а также слияние пронуклеусов, после чего начинается развитие зародыша. Однако, несмотря на достаточно многочисленные исследования по созданию оптимальных условий оплодотворения яйцеклеток крупного рогатого скота *in vitro*, ряд вопросов остается открытым [2, 5].

В большинстве лабораторий мира оплодотворение проводят в средах ТС-199, Тироде, Тироде М, Игла и др. При этом уровень дробящихся зародышей составляет от 23,9 до 82 % в отдельных опытах. Такая высокая вариабельность оплодотворяемости объясняется, прежде

всего тем, что среды для оплодотворения недостаточно совершенны и требуется проведение дополнительных исследований с целью создания оптимальных условий оплодотворения.

В связи с вышесказанным, целью наших исследований явилось изучение эффективности использования биологически активных компонентов: бычьего сывороточного альбумина (BSA), эпинифрина (ЭПФ) и гипотаурина (ГПТ) в средах для оплодотворения ооцитов.

**Материал и методы исследований.** Исследования были проведены в лаборатории генетики РУП «Институт животноводства НАН Беларуси».

Созревание ооцитов проводили по разработанной нами ранее методике из яичников убитых на мясокомбинате коров путём культивирования их вне организма.

Для оплодотворения использовалась замороженно-оттаянная сперма. Капацитация проводилась по разработанной нами методике в среде для капацитации на основе среды Тироде-М с использованием гепарина и процедуры флотации. Оплодотворение осуществляли в среде для оплодотворения различных модификаций с добавлением таких компонентов, как бычий сывороточный альбумин (BSA) – 10-100 мг/мл, пируват натрия (pNa) – 0,003 мг/мл, гипотаурин в концентрации 1,5 мг/мл и эпинифрин в концентрации 0,5 мг/мл. Эффективность оплодотворения определялась по уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей.

Все манипуляции с яйцеклетками, оценку активности сперматозоидов, стадий развития и качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота осуществляли под микроскопом МБС-10 при увеличении во 100 крат.

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** Большинство авторов указывают на то, что среда Тироде М более эффективна для оплодотворения. В наших исследованиях оплодотворение проводилось в среде с добавлением бычьего сывороточного альбумина (BSA) в концентрации 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мг/мл, в качестве контроля служила среда Тироде-М без BSA. Эффективность оплодотворения определялась по уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей (табл. 1).

Добавление в среду Тироде М BSA в различных концентрациях позволило увеличить уровень дробления на 3-16,7 %, а выход морул-бластоцист – на 2,2-17,4 % по сравнению с контролем. Причём, уровень дробления был выше при концентрации бычьего сывороточного альбумина 40 и 100 мг/мл (39,1-44,7 соответственно), в то время как выход морул-бластоцист был выше при концентрации BSA 60 мг/мл и составил 28,1 %, что на 17,4 % выше по сравнению с контролем (раз-

Таблица 1

Эффективность использования бычьего сывороточного альбумина  
в среде для оплодотворения.

№ п/п	Концентрация BSA, мг/мл	Оплодотворено ооцитов, п	Уровень дробления, п-%	Выход Мо-В1, п-%
1	10	100	31 – 31,0	4 – 12,9
2	20	80	25 – 31,2	4 – 16,0
3	40	120	47 – 39,1	8 – 17,0
4	60	90	32 – 35,6	9 – 28,1**
5	80	100	37 – 37,0	9 – 24,3**
6	100	150	67 – 44,7**	12 – 17,9
7	Контроль	100	28 – 28,0	3 – 10,7

Примечание: здесь и далее – \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001

ница статистически достоверна) и на 3,8-15,2 % по сравнению с другими группами.

Таким образом, добавление в среду для оплодотворения бычьего сывороточного альбумина в концентрации 60 мг/мл позволяет получить при практически одинаковом уровне дробления 28,1 % зародышей на предимплантационных стадиях.

В дальнейших исследованиях мы проследили эффективность добавления BSA в дозе 60 мг/мл к средам TC-199, Тироде и Игла (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность использования бычьего сывороточного альбумина в различных питательных средах для оплодотворения

№ п/п	Состав питательной среды	Оплодотворено ооцитов, п	Уровень дробления, п-%	Выход Мо-В1, п-%
1	TC-199 + BSA	138	18 – 13,0	3 – 16,6
2	Тироде + BSA	137	47 – 34,3**	10 – 21,3*
3	Тироде М + BSA	140	43 – 30,7*	11 – 25,6**
4	Игла + BSA	151	20 – 13,2	2 – 10,0

Как показали исследования, уровень дробления клеток был выше в среде Тироде с BSA и составлял 34,3 % (P<0,01). В то же время в остальных группах этот показатель был ниже. Так, при использовании в качестве основной питательной среды TC-199 и Игла он составлял всего 13,0-13,2 %. При использовании среды Тироде М уровень дробления был ниже, чем в первом случае, на 3,6 %, но выше по сравнению с другими группами. Однако выход морул-бластоцист был более высоким при использовании среды Тироде М и составил 25,6 % (P<0,01), что на 4,3-15,6 % выше, чем в других группах.

Обмен веществ эмбрионов на различных стадиях развития имеет свои особенности. Так, для эмбрионов коров на ранних стадиях дробления в качестве энергетического субстрата лучше использовать пируватоградную кислоту. Ким Д. и др. показали, что пируват натрия под-

держивает развитие эмбрионов *in vitro* до стадии морулы [6]. Другие авторы отмечают, что экзогенный пируват натрия не является необходимым компонентом для развития ооцитов и ранних зародышей [7].

В своих исследованиях мы попытались установить эффективность добавления пирувата натрия (pNa) в различные среды при культивировании ранних зародышей (табл. 3).

Таблица 3

Влияние пирувата натрия на эффективность получения ранних зародышей вне организма

№ п/п	Состав питательной среды	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
1	ТС-199+ BSA + pNa	140	17 – 12,1	3 – 17,6
2	Тиродe + BSA + pNa	125	46 – 36,8***	16 – 34,6***
3	Тиродe М + BSA + pNa	136	60 – 44,1***	23 – 38,3***
4	Игла + BSA + pNa	151	14 – 9,3	2 – 14,3

Добавление пирувата натрия к среде Тиродe и Тиродe М способствовало повышению уровня дробления по сравнению с другими средами на 24,7-34,8 %, выход морул-бластоцист при этом составил 34,6-38,3 % ( $P < 0,001$ ), что значительно превысило аналогичные показатели при использовании среды для оплодотворения без добавления пирувата натрия (против 20,5-23,5 % соответственно). Добавление пирувата натрия в среды ТС-199 и Игла также способствовало незначительному повышению выхода морул-бластоцист по сравнению с аналогичными средами без этого компонента (17,6 против 16,6 % и 14,3 против 10,0% соответственно).

Таким образом, добавление в питательные среды для оплодотворения пирувата натрия способствовало повышению уровня дробления до 44,1 %, увеличению выхода морул-бластоцист – до 38,3 %.

Конечной целью экстракорпорального оплодотворения фолликулярных ооцитов является получение эмбрионов, пригодных для трансплантации. Однако эта проблема является очень сложной. В настоящее время многочисленные эксперименты показали, что культивирование эмбрионов крупного рогатого скота в питательных средах, как правило, приводит к остановке их дробления на 8-16-клеточной стадии развития. Вторым критическим этапом в развитии зародышей крупного рогатого скота является переход от морулы к бластоцисте. Преодоление блока дробления эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* требует наличия в среде культивирования биологически активных компонентов или их аналогов, вырабатываемых некоторыми клеточными системами [2, 5].

В своих исследованиях к среде для оплодотворения добавляли эпифрин и гипотаурин с целью стимуляции подвижности сперматозои-

дов и улучшения их пенетрационной способности, а также проверки влияния на дальнейшее развитие эмбрионов крупного рогатого скота вне организма (табл. 4, 5).

Таблица 4  
Влияние эпинифрина (ЭПФ) на оплодотворяемость и дальнейшее развитие эмбрионов крупного рогатого скота

№ п/п	Состав питательной среды	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
1	ТС-199 + BSA + pNa + ЭПФ	156	23 – 14,7	4 – 17,4
2	Тиродe + BSA + pNa + ЭПФ	173	76 – 43,9***	22 – 28,9**
3	Тиродe M+BSA + pNa + ЭПФ	141	56 – 39,7***	18 – 32,1***
4	Игла + BSA + pNa + ЭПФ	171	20 – 11,7	3 – 15,0

Таблица 5  
Влияние гипотаурина (ГПТ) на оплодотворяемость и дальнейшее развитие эмбрионов крупного рогатого скота

№ п/п	Состав питательной среды	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
1	ТС-199 + BSA + pNa + ГПТ	136	13 – 9,5	2 – 15,3
2	Тиродe + BSA + pNa + ГПТ	171	47 – 27,5***	11 – 24,0***
3	Тиродe M+BSA + pNa + ГПТ	183	58 – 31,7***	16 – 27,6***
4	Игла + BSA + pNa + ГПТ	167	20 – 11,9	2 – 10,0

Исследования показали, что уровень дробления при использовании эпинифрина в средах Тиродe и Тиродe М составил соответственно 43,9 и 39,7 %, в то время как при использовании среды ТС-199 и Игла этот показатель находился на уровне 14,7 и 11,7 % соответственно ( $P < 0,001$ ). Выход морул-бластоцист составил соответственно 28,9; 32,1; 17,4 и 15,0 %.

Использование гипотаурина уменьшило выход дробящихся зародышей по сравнению с эпинифрином на 2,1-5 %, сохранив аналогичную зависимость при использовании различных сред. При использовании сред Тиродe и Тиродe М уровень дробления составил 27,5-31,7 %, выход жизнеспособных зародышей – 24,0-27,6 % соответственно. При использовании сред ТС-199 и Игла эти показатели были ниже и составили соответственно 9,5-15,3 % и 11,9-10,0 %.

При использовании всего комплекса энергетических добавок к среде для оплодотворения уровень дробления эмбрионов после экстракорпорального оплодотворения был значительно выше по сравнению с аналогичными группами во всех предыдущих опытах (табл. 6).

Таблица 6

Эффективность использования энергетических добавок в среде для оплодотворения

№ п/п	Состав питательной среды	Оплодотворено ооцитов, п	Уровень дробления, п-%	Выход Мо-В1, п-%
1	ТС-199+BSA+pNa+ЭПФ+ГПТ	143	23 – 16,1	3 – 17,4
2	Тиродe+BSA+pNa+ЭПФ+ГПТ	156	85 – 54,5***	30 – 35,3***
3	ТиродeM+BSA+pNa+ЭПФ+ГПТ	190	117–61,6***	49 – 41,8***
4	Игла+BSA+pNa+ЭПФ+ГПТ	170	24 – 14,1	4 – 16,7

Как показали исследования, уровень дробления был выше при использовании сред Тиродe и Тиродe М и составил соответственно 54,5 и 61,6 %, что на 38,4; 45,5 % и 40,4; 47,5 % выше по сравнению с использованием сред ТС-199 и Игла соответственно. Выход морул-бластоцист составил соответственно 35,3; 41,8; 17,4 и 16,7 %. Использование гипотаурина в смеси с эпинифрином в среде Тиродe и Тиродe М увеличило выход дробящихся зародышей по сравнению со средами ТС-199 и Игла на 17,9; 18,6 % и 24,4; 25,1 %.

Таким образом, использование в качестве энергетических добавок эпинифрина и гипотаурина приводило к незначительному повышению выхода морул-бластоцист по сравнению со средами, содержащими только бычий сывороточный альбумин. Наиболее высокие показатели уровня дробления и выхода морул-бластоцист достигались при использовании всего комплекса добавок в соотношениях, указанных выше. При этом уровень дробления составил в зависимости от использованной среды 14,1-61,6 %, а выход зародышей на предимплантационных стадиях – 16,7-41,8 %.

Высокая вариабельность результатов говорит о необходимости проведения дальнейших исследований по разработке культуральных сред для оплодотворения фолликулярных ооцитов крупного рогатого скота вне организма.

**Вывод.** Установлено, что добавление к средам ТС-199, Тиродe, Тиродe М, Игла, содержащим 6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,0003 мг/мл пирувата натрия, гипотаурина в концентрации 1,5 мг/мл и эпинифрина 0,5 мг/мл позволяет достигнуть уровня дробления 14,1-61,6 % и выхода морул-бластоцист 16,7-41,8 %.

#### Литература

1. Завертяев, Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. – Л.: Агропромиздат, 1989. – 255 с.
2. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота / П. Кауфвольд [и др.]. – М.: ВО Агропромиздат, 1990. – 56 с.
3. Normal development following in vitro fertilization in the cow / B.G. Brackett [et al.] // Biol. Reprod. – 1982. – Vol. 27. – P. 147-158.
4. Bovine twins resulting from in vitro fertilization / B.G. Brackett [et al.] //

Theriogenology. – 1984. – Vol. 21. – P. 224.

5. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct / W.H. Eyestone [et al.] // Theriogenology. – 1987. – Vol. 28. – P. 1-7.

6. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium / J.H. Kim [et al.] // Theriogenology. – 1993. – Vol. 39. – N 4. – P. 875-886.

7. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates / C.F. Rosenkrans [et al.] // Biol. Reprod. – 1993. – Vol. 49. – P. 459-462.

8. Skjervold H. A general view of animal breeding // Future Developments in the Genetic Improvement of Animals (J.S.F. Barker, K. Hammond and A.E. McClintock, eds.). – 1982. – P. 3-9.

УДК 636.1.06

## КАЧЕСТВО ТЯЖЕЛОВОЗНО-БЕЛОРУССКИХ ПОМЕСЕЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

М.А. ГОРБУКОВ, доктор сельскохозяйственных наук

М.К. БОРИСОВЕЦ, кандидат экономических наук

Э.А. БАЙГИНА, В.И. ЧАВЛЫТКО

РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»

Реферат. Установлено, что помеси I поколения от скрещивания белорусских упряжных кобыл с производителями торийской, литовской и русской тяжеловозных пород обычно крупнее сверстников, но у них недостаточно выражен тип материнской породы, и использовать в племенной работе можно лишь единичных, тщательно отобранных особей.

Ключевые слова: породы, скрещивание, лошади, оценка.

**Введение.** В Беларуси основное конепоголовье – это рабочие лошади, разнообразно используемые в сельскохозяйственных предприятиях и личных подворьях населения. Существующий спрос определяет потребность в достаточно крупных, работоспособных животных, поэтому селекция здесь, прежде всего, направлена на получение улучшателей тяжеловозного и упряжного типов. Хорошо выражены эти качества у лошадей наиболее распространённой в республике белорусской упряжной породы [1, 2, 3]. После её утверждения в 2000 г. селекция осуществляется преимущественно путём чистопородного разведения лошадей по линиям, что обеспечивает сохранение достигнутых параметров развития породных признаков, увеличение количества типичных животных в ведущих хозяйствах.

Вместе с тем, для обеспечения конкурентоспособности породы, расширения её генеалогической структуры, получения крупных работоспособных лошадей новых перспективных генотипов, закладки заводских линий, селекционной программой предусмотрено осуществ-