

3. Антонюк, В. С. Пути повышения эффективности животноводства / В. С. Антонюк // Актуальные проблемы интенсификации производства продукции животноводства : материалы междунар. науч.-произв. конф., 12-13 окт. 1999 г. – Жодино, 1999. – С. 83-87.
4. Шляхтунов, В. И. Скотоводство и технология производства молока и говядины : учебник для с.-х. ВУЗов / В. И. Шляхтунов, В. С. Антонюк, Д. М. Бубен. – Мн. : Ураджай, 1997. – 164 с.
5. Маменко, А. М. Формирование, прогнозирование и методы оценки качества мясной продукции животных / А. М. Маменко, В. Н. Кандыба, Н. И. Бугаев. – М., 1996. – 35 с.
6. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных : справ. пособие / под ред. А. П. Калашникова [и др.]. – М., 2003. – 455 с.
7. Оценка мясной продуктивности и определение качества мяса убойного скота : методические рек. / ВНИИМС. – Оренбург, 1984. – 54 с.
8. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Мн. : Вышэйшая школа, 1967. – 326 с.

УДК 636.2.034:612.02

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, А.И. ГАНДЖА, И.В. КОСТИКОВА, Е.Д. РАКОВИЧ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ВЫБРАКОВАННЫХ КОРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ ВНЕ ОРГАНИЗМА

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

Введение. Воспроизводство стада в молочном скотоводстве является основным вопросом в животноводческой отрасли. С переходом на интенсивные технологии ведения животноводства возрастают продуктивные нагрузки на животных. В связи с этим высокопродуктивные коровы преждевременно выбывают на мясокомбинат [1]. В то время как за продуктивную жизнь эти животные приносят 2-4 телёнка, потенциальный запас ооцитов в яичниках коровы составляет несколько сот тысяч. В течение жизни огромная часть ооцитов подвергается атрезии и в воспроизводстве не участвует. Суперовуляцией можно частично повысить реализацию генетического потенциала и получить от коровы дополнительно потомство. Еще одним способом использования нереализованного запаса яйцеклеток является культивирование ооцитов вне организма.

Успешное культивирование ооцитов зависит от многих факторов, из которых первостепенное значение имеет клиническое состояние животного и прежде всего, морфофункциональное состояние репродуктивных органов [2]. Как правило, выбракованные коровы имеют

нарушения воспроизводительной функции, что не может не отразиться на условиях и результате получения ранних зародышей вне организма [1, 3, 4]. Гипофункция яичников, лютеиновые и фолликулярные кисты, эндометриты ведут к нарушениям фолликулярного роста, задержке оогенеза, снижению оплодотворяемости как *in vivo*, так и *in vitro*, а также мутациям и ранней эмбриональной смертности [5, 6, 7, 8].

Целью работы стало изучение влияния отдельных факторов при использовании репродуктивного потенциала выбракованных коров для получения ранних зародышей вне организма.

Материал и методы исследований Исследования проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Объектом исследований служили яичники, ооциты крупного рогатого скота и эмбрионы на ранних преимплантационных стадиях развития, полученные вне организма. В качестве доноров яичников использовались высокопродуктивные коровы (6 тыс. кг молока за лактацию и выше), выбракованные по различным причинам и поступившие на мясокомбинат. Яичники получали на Минском мясокомбинате, а также в убойном цехе РУП «Экспериментальная база «Жодино». При оценке морфофункционального состояния яичника учитывали его размеры, количество и размеры фолликулов, наличие жёлтых тел, количество извлечённых ооцитов от каждого яичника индивидуально.

Для изучения влияния условий кратковременного (1-2, 3-4 ч) хранения яичников на выход жизнеспособных эмбрионов доставку яичников проводили в среде Хенкса при температуре 28-38°C. После выделения ооцитов их поиск и морфологическую оценку осуществляли под бинокулярным микроскопом МБС-10 при 16- и 56-кратном увеличении. Затем ооциты помещали в питательную среду для созревания клеток в CO₂-инкубатор при 38,5°C с максимальной влажностью (98 %) и присутствии в воздухе 5 % CO₂ под слоем минерального масла в течение 24 ч. Созревшие ооциты оплодотворяли заморожено-оттаянной спермой после проведения процедуры капацитации.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Проанализировано морфологическое состояние 69 яичников (табл. 1), из которых 13 находились в фолликулярной стадии полового цикла, 14 – в лютеиновой, у 12-ти наблюдалась киста, 23 яичника находились в состоянии гипофункции, в 7-ми присутствовали персистентные жёлтые тела. Таким образом, у 60,9 % яичников выбракованных коров наблюдались нарушения овариальной функции. От этих животных получено в среднем на яичник 17,3-24,1 ооцита. Из яичников в фолликулярной и лютеиновой стадии полового цикла извлечено в среднем 28,7 и 27,4 оо-

цита на яичник. Всего в среднем на один яичник получено 23,3 ооцита.

Таблица 1

Физиологическое состояние яичников

Фаза полового цикла или патологии яичника	Количество яичников, n	Количество ооцитов в среднем на 1 яичник, n
Фолликулярная	13	28,7±4,5
Лютеиновая	14	27,4±4,0
Киста	12	17,3±3,2
Гипофункция	23	24,1±7,8
Персистентное жёлтое тело	7	19,1±4,0
Итого	69	23,3±4,6

Проведены исследования по выявлению влияния морфофункционального состояния яичников на созревание ооцитов и выход ранних эмбрионов (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность получения эмбрионов вне организма в зависимости от физиологического состояния яичников

Фаза полового цикла или патологии яичника	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления		Выход морул-бластоцист	
		n	%	n	%
Фолликулярная	112	68	60,7	32	28,5
Лютеиновая	120	64	53,3	22	18,3
Киста	94	30	31,9	5	5,3
Гипофункция	208	25	12,0	-	-
Персистентное жёлтое тело	76	18	23,7	6	7,9

Исследования показали, что наиболее высокий уровень созревания ооцитов и их последующего дробления был отмечен при использовании яичников в фолликулярной стадии – 60,7 %, выход морул-бластоцист составил 28,5 %. При использовании яичников в лютеиновой фазе полового цикла эти показатели составили 53,3 и 18,3 %, соответственно. Наличие кисты, персистентного жёлтого тела и гипофункции снижало уровень дробления на 28,8 %, 37,0 и 48,7 %, соответственно, по сравнению с фолликулярной фазой, а выход зародышей на стадии морула-бластоциста – на 23,2 и 20,6 %, при гипофункции яичников зародышей на преимплантационных стадиях не получено.

Изучены типоразмеры яичников высокопродуктивных коров (табл. 3). При анализе типоразмеров яичников измеряли их объём, ширину, длину, а также учитывали количество и размеры фолликулов.

Типоразмеры яичников

Объём яичника, см ³	Длина яичника, мм	Ширина яичника, мм
До 4,0, n = 16	25,6 ± 1,37	15,2 ± 1,02
4,1-6,0, n=23	28,9 ± 1,41	18,3 ± 0,84**
6,1-8,0, n=17	31,7 ± 1,52**	22,6 ± 0,96***
8,1 и >, n=4	38,2 ± 0,81**	25,5 ± 1,20**

Из 60 изученных яичников 16 яичников (26,7 %) имели объём до 4 см³, длину – 25,6 мм, ширину – 15,2 мм, а 23 (38,3 %) были с объёмом от 4,1 до 6,0 см³, длиной 28,9, шириной 18,3 мм. У 17-ти яичников (28,3%) объём составил 6,1-8,0 см³, длина – 31,7 мм, ширина – 22,6 мм. И лишь у 4-х яичников (6,7%) отмечен объём более 8,0 см³, длина – 38,2 мм, ширина – 25,5 мм.

Количество антральных фолликулов в исследованных яичниках в зависимости от их объёма колебалось от 18,1 при объёме яичника менее 4,0 см³ до 24,2 при объёме более 8,0 см³. В среднем на одном яичнике имелось 21,9 антральных фолликулов. Из них количество фолликулов диаметром до 4 мм в среднем составило на один яичник 15,9, а с диаметром более 4 мм – 6,8. Анализ проведённых исследований по установлению взаимосвязи между объёмом яичника и количеством и качеством извлечённых из яичников ооцитов показывает, что в среднем из одного яичника извлечено 19,8 клеток. Больше всего 23,1 и 21,7 ооцитов извлечено из яичников объёмом 4,1-6,0 и 6,1-8,0 см³, соответственно. Из яичников данных объёмов получено максимальное количество пригодных для культивирования вне организма клеток – 13,4 и 10,7, соответственно. В среднем количество ооцитов, способных возобновлять мейоз в условиях вне организма, на один яичник составило 9,7 при lim 6,4-13,4, или 49 % от общего количества полученных ооцит-кумулясных комплексов.

Изучено влияние условий кратковременного хранения яичников высокопродуктивных коров с момента убоя животного до их обработки в лаборатории. Продолжительность кратковременного хранения составляла 1-2 и 3-4 ч. Анализировались только те культуральные чашки, в которых ооциты после оплодотворения начинали дробиться, и были получены жизнеспособные эмбрионы. Результаты представлены в табл. 4.

Непродолжительное (1-2 ч) хранение яичников при 28°C позволило получить 41,7 % дробящихся зародышей и 18,8 % морул-бластоцист. Наиболее высокий уровень выхода зародышей на преимплантационных стадиях развития (29,7 %) отмечен при транспортировке гонад с температурой среды 32°C, хотя процент дробящихся зародышей оказался самым низким в группе – 37,8 %. Больше всего дробящихся за-

родышей (45,0 %) получено при хранении яичников при 35°C, выход морул-бластоцист составил 22,5 %. В среднем по группе уровень дробления составил 42,4 %, выход морул-бластоцист – 23 %.

Таблица 4

Влияние условий кратковременного хранения яичников высокопродуктивных коров на выход эмбрионов *in vitro*

Время, ч	Температура, t°C	Поставлено на созревание ооцитов, n	Результат созревания			
			Морул, n	Бластоцист, n	Итого	
					% дробления	% морул-бластоцист
1-2	28	48	3	6	41,7	18,8
	32	37	6	5	37,8	29,7
	35	80	5	13	45,0	22,5
Итого		165	14	24	42,4	23,0
3-4	28	41	3	4	51,2	17,1
	30	62	2	2	41,9	6,5
	38	90	2	3	47,8	5,5
Итого		193	7	9	46,6	8,3

Хранение яичников вне организма в течение 3-4 ч не оказало существенного влияния на дробление клеток, но значительно снизило выход преимплантационных зародышей. Лучший результат – 51,2 % дробящихся клеток и 17,1 % эмбрионов на стадии морула-бластоциста получен при хранении яичников при 28°C. Более высокая температура среды на момент доставки биоматериала в лабораторию 30 и 38°C не повлияла существенно на уровень дробления (41,9 и 47,8 %), однако выход преимплантационных зародышей снизился на 10,6 и 11,6 %, соответственно. В среднем по группе выход дробящихся зародышей составил 46,6 %, морул-бластоцист – 8,3 %.

Нами проведены исследования по изучению влияния сезона года на оплодотворяемость ооцитов высокопродуктивных коров при культивировании их вне организма и выход жизнеспособных эмбрионов (табл. 5).

Установлено, что зимние месяцы являются наименее благоприятными для получения ранних эмбрионов вне организма – 5,4-9,8 % от дробящихся зародышей, хотя количество дробящихся эмбрионов составило в среднем 39,3 % (lim 28,6 – 47,4 %). По-видимому, на результативности метода сказываются не столько метаболические нарушения в организме животных, сколько неблагоприятный температурный фактор в момент проведения технологических манипуляций с яичниками.

В весенний период процент оплодотворяемости ооцитов был выше: в марте-апреле он составил 48,6-50 % и в мае снизился на 20,5 %, что

Таблица 5

Влияние сезона года на оплодотворяемость ооцитов высокопродуктивных коров при культивировании их вне организма

Месяц	Число ооцитов, поставленных на культивирование, n	Уровень дробления		Выход морул-бластоцист	
		n	%	n	%
Декабрь	169	71	42	7	9,8
Январь	98	28	28,6	2	7,1
Февраль	156	74	47,4	4	5,4
Март	140	68	48,6	11	16,2
Апрель	114	57	50	13	22,8
Май	160	43	29,5	9	20,9
Июнь	95	41	43,1	15	36,6
Июль	61	30	49,2	5	16,6
Август	80	30	37,5	-	-
Сентябрь	75	36	48	10	27,8
Октябрь	143	75	52,4	22	29,3
Ноябрь	250	98	39,2	16	16,3

связано, по-видимому, с процессом адаптации при переводе животных на пастбищное содержание. Однако выход морул-бластоцист составил 20,9 % от количества делящихся клеток, что больше на 4,7 % по сравнению с мартом и меньше на 1,9 %, чем в апреле. В летние месяцы уровень дробления клеток составил 37,5-49,2 %. Больше всего клеток на преимплантационных стадиях получено в июне – 36,6 %, в июле этот показатель составил 16,6 %, а в августе таких клеток не получено. В сентябре-ноябре оплодотворяемость и дробление ооцитов колебались в пределах 39,2-52,4 %. Выход морул-бластоцист был достаточно высок и составил в сентябре и октябре 27,8 и 29,3 %. В ноябре этот показатель снизился до 16,3 %. Достаточно высокий выход преимплантационных зародышей в первые осенние месяцы свидетельствует о нормализации метаболических процессов и гормонального баланса в организме животных. В среднем получено 42,9 % дробящихся клеток и 17,4 % морул-бластоцист.

Изучено влияние индивидуальных особенностей коров-доноров яичников на эффективность получения эмбрионов вне организма. Анализировались только те яичники, от которых получены эмбрионы на стадии морула-бластоциста. В результате исследований установлено, что уровень дробления колеблется в широких пределах от 16,7 до 90,9 %. Выход морул составил 0-27,3 %, а бластоцист – 0-31,8 %. Средние показатели выглядят следующим образом: выход ооцитов на одно животное составил 23,2, уровень дробления – 47,6 %, выход морул – 6,9 %, выход бластоцист – 9,1 %, всего морул-бластоцист – 16,0%. Заслуживает внимания тот факт, что уровень трансформации морул в бластоцисты составляет 51,3 %, в то время как 48,7 % клеток

на стадии морулы прекращает свое развитие и дегенерирует, что говорит о существовании критического периода в развитии эмбрионов не только на стадии 8-16 клеток, но и на стадии перехода морулы в бластоцисту.

Заключение. 1. Использование яичников в фолликулярной и лютеиновой стадии полового цикла позволяет получать 28,7 и 27,4 ооцита на яичник, 60,7 и 53,3 % дробящихся клеток, 28,5 и 18,3 % жизнеспособных эмбрионов, соответственно. У 60,9 % яичников, полученных на мясокомбинате от выбракованных высокопродуктивных коров, наблюдались нарушения овариальной функции. От них получено 31,9% дробящихся клеток и 0-7,8 % морул-бластоцист.

2. Непродолжительное (1-2 ч) хранение яичников при транспортировке позволяет получать 42,4 % дробящихся клеток и 23 % морул-бластоцист. Оптимальной является температура среды 32-35 °С. Хранение яичников в течение 3-4 ч при температуре 28 °С позволило получить 51,2 % дробящихся клеток и 17,1 % зародышей, пригодных к пересадке.

3. Наиболее высокий выход эмбрионов на стадии морулы-бластоцисты наблюдался в осенний период и составил 22,9 %. В зимние месяцы этот показатель снижался до 7,5 %, весной и летом составил 19,0 и 17,8 %, соответственно.

4. Выход эмбрионов на преимплантационных стадиях развития зависит от индивидуальных особенностей животных и может колебаться от 0 до 31,8 %.

Литература

1. Валюшкин, К. Д. Актуальные вопросы воспроизводства крупного рогатого скота / К. Д. Валюшкин // Ученые записки ВГАВМ. Т 40. – Витебск, 2004. – С. 105-107.
2. Бугров, А. Д. Зависимость выхода и качества ооцитов от типоразмеров яичников коров / А. Д. Бугров, И. В. Ткачева // Зоотехния. – 1999. – № 6. – С. 30-32.
3. Ахмолдаева, А. М. Созревание и оплодотворение in vitro ооцитов крупного рогатого скота при действии биологически активных веществ / А. М. Ахмолдаева, Н. И. Сергеев, И. А. Порфирьев // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – № 6. – С. 58-65.
4. Кузьмич, Р. Г. Основные этиологические факторы акушерской и гинекологической патологии у коров / Р. Г. Кузьмич // Ветеринарная наука – производству : сб. по материалам Междунар. науч.-практ. конф. Вып. 38. – Мн., 2005. – С. 309-311.
5. Завертяев, Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / Б. П. Завертяев. – Л. : Агропромиздат, 1989. – 255 с.
6. Роль метаболитических гормонов в регуляции функции яичников у коров / А. В. Лебедев [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2005. – № 2. – С. 14-20.
7. Решетникова, Н. М. Фолликулогенез крупного рогатого скота при гормональной регуляции и различных формах нарушения воспроизводительной функции / Н. М. Решетникова // Биология воспроизведения и биотехнологические методы разведения сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. – М., 1989. – С. 73-83.
8. Дегай, В. Эндокринные аспекты физиологии и патологии размножения крупного рогатого скота / В. Дегай. – Владивосток, 1994. – 177 с.