

Буркат. – Киев : БМТ, 2001. – 723 с.

2. Wijayagunawardane, M. P. Prostaglandin E2, prostaglandin F2 alpha and endothelin-1 production by cow oviductal epithelial cell monolayers: effect of progesterone, estradiol 17 beta, oxytocin and luteinizing hormone / M. P. Wijayagunawardane, A. Miyamoto, K. Sato // *Theriogenology*. – 1999. – Vol. 52. – P. 791-801.

3. Сингина, Г. Н. Исследования развития эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* / Г. Н. Сингина, О. Л. Шатайло // *Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных : материалы 6-й Междунар. конф. (19-20 дек. 2006 г.)*. – Дубровицы, 2006. – С. 167-171.

4. Swain, J. E. [et al.] // *Reproduction*. – 2002. – Vol. 123. – P. 253-260.

(поступила 27.02.2009 г.)

УДК 636.2:612.64.089.67.

Л.В. ГОЛУБЕЦ, М.П. СТАРОВОЙТОВА, А.Е. ОТРОЩЕНКО

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭСТРАЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ *IN VITRO***

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

**Введение.** После извлечения из фолликулов полученные ооцит-кумулусные комплексы (ОКК) должны быть максимально обеспечены всеми питательными компонентами так, как это происходит в условиях *in vivo*, т. е. в организме матери. В питательной среде должно присутствовать всё то, что способствует выживанию клетки, её пролиферации и дифференцировке.

В настоящее время частично выяснены потребности клеток в питательных веществах, для удовлетворения которых составляются и используются сложные, химически-определённые среды, такие, например, как ТС-199, Менезо, Хэм, которые обеспечивают клетку основным набором микроэлементов, витаминов, аминокислот. Однако без наличия гормональной и энергетической составляющей получить положительный результат в культуре *in vitro* практически невозможно. В качестве такой биологически активной добавки чаще всего используется сыворотка крови крупного рогатого скота.

Сыворотка представляет собой чрезвычайно сложный комплекс соединений, точный состав которого до настоящего времени окончательно не выяснен. Однако основные функции, которыми она обладает, определены достаточно чётко: обеспечение клеток гормональной составляющей, способствование прикреплению и распластыванию клеток, а также обеспечение их транспортными белками, минеральными веществами, липидами, факторами роста [1].

В настоящее время при проведении работ в системе *in vitro* используется в основном два вида сыворотки – это сыворотка крови плодов крупного рогатого скота и сыворотка крови крупного рогатого скота. Иногда в литературе появляются сообщения об использовании сыворотки крови северных оленей.

Если сыворотка крови плодов коровы производится в заводских условиях и обладает определённым стандартом, то сыворотка крови крупного рогатого скота производится в лабораторных условиях.

В большинстве лабораторий используется эстральная сыворотка крупного рогатого скота, т. е. сыворотка, полученная из крови коров, находящихся в спонтанной охоте, в различных концентрациях. Однако хорошо известно, что гормональный фон и другие гематологические показатели в процессе полового цикла претерпевают изменения и то, что было в период охоты, не будет соответствовать тому, что будет на 7-9 день полового цикла, когда эмбриону будет 7-9 дней. Кроме этого встаёт вопрос: когда, в какой период времени наиболее эффективно добавлять сыворотку в питательную среду в процессе роста и развития ранних зародышей?

В связи с вышесказанным, перед нами была поставлена следующая цель исследований – изучить эффективность использования сыворотки крови крупного рогатого скота в культуре *in vitro*.

**Материал и методика исследований.** Объектом исследования служили ооцит-кумулосные комплексы крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы и эмбрионы, полученные из яйцеклеток на основании технологии экстракорпорального оплодотворения.

Животных овариоэктомировали на конвейере Гродненского мясокомбината. Яичники доставляли в лабораторию в течение 1,0-1,5 часов при температуре 36-38°C. Для облегчения и ускорения поиска ооцит-кумулосных комплексов полученный промывной раствор пропускали через эмбриофильтр Retsch (Германия) с диаметром пор 50 микрон. После данной процедуры проводился поиск и оценка качества ооцитов.

В опытах использовались ооциты с равномерной по толщине, гомогенной апполицирующей ооплазмой, окружённые многослойным (не менее 3-5 слоёв) компактным кумулюсом. После отмывания ооциты в среде для дозревания ставились в инкубатор при температуре 38,7°C, содержанием 5 % CO<sub>2</sub> и максимальной влажностью. Все питательные среды и солевые растворы были приготовлены на основании реактивов фирмы Sigma по собственным методикам.

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** В таблице 1 представлены результаты опытов по определению эффективности использования в культуральных системах *in vitro* фетальной и эстральной сыворотки крупного рогатого скота.

Таблица 1 – Сравнительная эффективность использования фетальной и эстральной сыворотки в культуральных системах *in vitro*

Сыворотка	Концентрация	Кол-во ооцитов	Количество зародышей, n - %				
			Дробящихся	В том числе			
				Мо+Бл	Из них		
					Бл	В том числе отличных	
Мо+Бл	Бл	Мо+Бл	Бл				
Фетальная сыворотка	5	56	21-37,5	10-17,8	2-3,5	7-70	2-100
	10	71	34-47,9	13-18,3	3-4,2	9-69,2	3-100
	15	83	32-38,5	19-22,8	3-3,6	13-68,4	3-100
	20	76	31-40,7	15-19,7	3-3,9	9-60	3-100
Эстральная сыворотка	5	70	30-42,8	14-20,0	4-5,7	8-57,1	4-100
	10	91	51-56,0	22-24,1	9-9,9	14-63,6	9-100
	15	73	39-53,4	19-26,0	6-8,2	15-78,9	6-100
	20	62	26-41,9	10-16,1	7-11,3	7-70	7-100

Как показал сравнительный анализ результатов, прослеживается чёткая тенденция повышения всех показателей при использовании эстральной сыворотки. Так, по уровню дробления это превышение составило от 1,2 % при концентрации сыворотки 20 % до 14,9 % при её концентрации 15 %. В среднем же этот показатель равнялся 7,4 %. Аналогичная тенденция наблюдалась и по общему выходу эмбрионов на предимплантационных стадиях (Мо+Бл), за исключением концентрации сыворотки в 20 % (использование эстральной сыворотки в такой концентрации снижало показатель на 3,6 %), и по выходу blastocysts; при этом все полученные blastocysts оказались отличного качества.

Как было сказано выше, несмотря на многочисленные исследования по изучению безсывороточных сред, до настоящего времени её использование является крайне желательным и даже необходимым, поскольку она обеспечивает необходимость растущего и развивающегося эмбриона теми элементами, которые наиболее полно отвечают его потребностям. Созревание ооцита до стадии оплодотворения в культуре *in vitro* происходит в течение 24 часов, а рост и развитие эмбриона – в течение 7-9 дней, и всё это время идет потребление питательных элементов и выделение продуктов обмена. В связи с этим существует необходимость их пополнения. В какой период с момента оплодотворения наиболее оптимально и эффективно пополнение концентрации питательных веществ и в первую очередь сыворотки?

В таблице 2 представлены результаты наших исследований по изучению данного вопроса.

Таблица 2 – Эффективность получения ранних зародышей в культуре *in vitro* в зависимости от времени добавления эстральной сыворотки

Интервал времени, ч	Количество		Количество зародышей, n - %				
	Опытов, n	Ооцитов, n	Дробящихся	В том числе			
				Мо+Бл	Бл	В том числе	
						Мо+Бл	Бл
24	3	115	55-47,8	33-28,7**	10-8,7	17-30,3	10-100
48	3	125	71-56,8	36-28,8	14-11,2	22-30,9	12-85,7
72	3	97	52-53,6	36-37,1	12-12,4	18-34,6	12-100
96	3	111	70-63,1	58-52,3	24-21,6	27-38,6	22-91,7
120	3	131	65-49,6	35-26,7***	12-9,2	15-23,1	9-75,0

Как показывает анализ результатов проведённых нами экспериментов, как и в предыдущих исследованиях, уровень дробления не отличался какой-либо закономерностью и составлял от 47,8 % при добавлении сыворотки через 24 часа до 63,1 %, сыворотка добавлялась через 96 часов после оплодотворения, чего нельзя сказать об общем выходе предимплантационных эмбрионов (Мо+Бл) и выходе эмбрионов на стадии бластоциста. Так, при добавлении сыворотки через 96 часов после оплодотворения уровень дробления составил 62,8 % от числа дробящихся зародышей, что достоверно выше по сравнению с 24 часами на 22,8 % ( $P < 0,05$ ), с 48 часами – на 32,1 % ( $P < 0,001$ ) и по сравнению со 120 часами – на 29 % ( $P < 0,01$ ).

Аналогичные показатели, хотя и не достоверные, получены и по выходу бластоцист. Так, при добавлении сыворотки через 96 часов выход бластоцист от числа дробящихся зародышей составил 34,3 % и превысил выход бластоцист в других группах на 16,1; 14,6; 11,2 и 15,8 при добавлении сыворотки через 24, 48, 72 и 120 часов, соответственно. Количество отличных бластоцист колебалось от 75 до 100 %.

Как правило, эстральную сыворотку крупного рогатого скота получают из крови коров, находящихся в спонтанной половой охоте, когда созревает и овулирует один доминирующий фолликул. В данный момент у нормально циклирующего, клинически здорового животного, гормональный профиль крови соответствует физиологической норме, в то время как в период гормональной обработки доноров экзогенными гонадотропинами с целью вызывания суперовуляции происходит значительный сдвиг гормональной составляющей крови коров-доноров в сторону увеличения. Инъекция фолликулостимулирующих препаратов в середине лютеальной фазы эстрального цикла влекут за собой сильное увеличение ФСГ, ЛГ-активности гипофиза, щитовидной

железы и надпочечников в течение нескольких дней, что оказывает значительное влияние на сложные эндокринные процессы развития фолликулов, созревания ооцитов и овуляции. Так, по некоторым данным [3, 4] уровень прогестерона увеличивается в 6-8 раз, эстрадиола – в 1,5-2 раза, тестостерона – в 2 раза. Отмечается пульсирующая секреция ЛГ, повышенное содержание пролактина, кортизола и тироксина [2, 5]. Экзогенное введение гонадотропинов с целью вызывания множественной овуляции у коров вызывает изменения секреторной активности желез внутренней секреции, участвующих в регуляции репродуктивной функции. В связи с этим вызывает определённый интерес вопрос изучения влияния сыворотки крови, полученной в период стимуляции суперовуляции и в стимулированный половой цикл на эффективность получения эмбрионов *in vitro*.

Как показывает анализ приведённых данных (таблица 3), в контрольной группе получены достоверно более высокие результаты по сравнению со всеми опытными группами по всем показателям. Так, по уровню дробления превосходство составляло в среднем 18,9-28,9 %, по общему выходу эмбрионов на предимплантационных стадиях (Мо+Бл) – 13,3-21,9 %, в том числе по бластоцистам – на 12,6-18,6 %. Среди опытных групп наблюдается чёткая тенденция увеличения вышеперечисленных показателей (кроме уровня дробления) при использовании сыворотки крови коров-доноров, полученной на 2-й день гормональной обработки независимо от уровня суперовуляции. Так, по выходу морул-бластоцист показатель увеличивался на 6,6-7,1 %, в том числе по выходу бластоцист – на 2,6-6,0 %.

Таблица 3 – Эффективность использования сыворотки крови коров-доноров, полученной в период гормональной обработки

Сыворотка	Количество овуляций	Количество ооцитов	Количество зародышей, п-%				
			Дробящихся	В том числе			
				Мо+Бл	Бл	В том числе	
						Мо+Бл	Бл
1	2	3	4	5	6	7	8
Эстральная сыворотка (контроль)	-	285	197-69,1	106-37,2	27-25,5	86-81,1	26-96,3
1-й день обработки (10-й день полового цикла)	10-13	154	73-47,4	30-19,5	2-6,7	15-50,0	2-100
	3-6	149	76-51,0	23-15,4	2-8,7	11-47,8	1-50
	0-2	136	62-45,6	23-16,9	2-8,7	10-43,5	2-100
Итого	-	439	211-48,1***	76-17,3***	6-7,9***	36-47,4	5-83,3

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8
2-й день обработки (11-й день полового цикла)	10-13	143	55-38,5	33-23,1	4-12,1	23-69,7	3-75,0
	3-6	129	52-40,3	35-27,1	5-14,3	25-71,4	5-100
	0-2	151	63-41,7	33-21,8	4-12,1	22-66,7	4-100
Итого	-	423	170-40,2***	101-23,9***	13-12,9*	70-69,3	12-92,3
3-й день обработки (12-й день полового цикла)	10-13	137	71-51,8	22-16,0	2-9,1	15-68,2	1-50
	3-6	155	77-49,7	22-14,2	3-13,6	14-63,6	2-66,7
	0-2	152	75-49,3	24-15,8	2-8,3	14-58,3	2-100
Итого	-	444	223-50,2***	68-15,3***	7-10,3*	43-63,2	5-71,4
4-й день обработки (13-й день полового цикла)	10-13	136	53-38,9	26-19,1	1-3,8	15-57,7	-
	3-6	148	70-47,3	26-17,6	2-7,7	13-50,0	1-50
	0-2	143	70-48,9	20-14,0	1-5,0	14-70,0	1-100
Итого	-	427	193-45,2**	72-16,8***	5-6,9***	42-58,3	2-40

В таблицах 4 и 5 представлен сравнительный анализ эффективности использования в культуральных системах *in vitro* сыворотки крови коров в разные дни спонтанного и стимулированного полового цикла (0 день – день охоты, 6 день – день накануне извлечения эмбрионов и 7 день – день извлечения эмбрионов).

Таблица 4 – Сравнительная эффективность использования сыворотки крови коров, полученной в спонтанный половой цикл

День полового цикла	Количество ооцитов, п	Спонтанный половой цикл				
		Количество зародышей, п-%				
		Дробящихся	В том числе			
			Мо+Бл	Бл	Дробящихся	
Мо+Бл	Мо+Бл					
0	75	38-57,7	24-32,0	7-18,4	18-75,0	6-85,7
6	91	52-57,1	20-21,9	6-11,5	16-80,0	6-100
7	84	42-50,0	20-23,8	5-11,9	13-65,0	4-80

Таблица 5 – Сравнительная эффективность использования сыворотки крови коров, полученной в стимулированный половой цикл

День полового цикла	Количество ооцитов, п	Стимулированный половой цикл				
		Количество зародышей, п-%				
		Дробящихся	В том числе			
			Мо+Бл	Бл	из них отличных	
Мо+Бл	Бл					
0	101	63-62,4	27-26,7	8-12,6	24-88,9	8-100
6	97	63-64,9	20-20,6	5-7,9	17-85,0	4-80,0
7	97	57-58,8	17-17,5	4-7,0	14-82,3	3-75,0

Как показал анализ приведённых данных, более высокие показатели получены при использовании сыворотки крови коров, находящихся в спонтанной охоте, независимо от дня цикла, за исключением уровня дробления. Так, по выходу морул-бластоцист превосходство составило на нулевой день – 5,3 %, на 6 день – 1,3 и на 7 день – 6,3 %, в том числе по выходу бластоцист данный показатель составил 5,8 %, 3,6 и 4,9%, соответственно. Следует отметить, что внутри групп более высокие результаты были получены при использовании сыворотки, взятой в период охоты (0 день полового цикла). По выходу бластоцист увеличение составило в спонтанный цикл – 6,5-6,9 %, в стимулированный – 4,7-5,6 %.

**Заключение.** Таким образом, как показали результаты наших исследований, более эффективным является использование эстральной сыворотки по сравнению с фетальной. При этом уровень дробления увеличивается в зависимости от концентрации сыворотки на 1,2-14,9%, а бластоцист – на 1,6-6,0 %. Увеличение концентрации сыворотки через 96 часов после оплодотворения позволяет увеличить уровень дробления до 82,8 %, а выход бластоцист – до 21,6 %. Использование в культуральных системах *in vitro* сыворотки коров-доноров в период гормональной обработки и в стимулированный половой цикл достоверно снижает показатели по уровню дробления и выходу бластоцист по сравнению с контролем.

#### Литература

1. Конки, Д. Культура животных клеток. Методы / Д. Конки, Р. Фрешни. – М. : «Мир», 1989. – 333 с.
2. Леткевич, Л. Л. Прогнозирование эффективности трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота : автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук / Леткевич Л.Л.. – Жодино, 1993. – 24 с.
3. Пасицкий, Н. Д. Новые аспекты участия биологически активных веществ в регуляции метаболизма и продуктивности с.-х. животных / Н. Д. Пасицкий, В. Е. Шавкун,

М. Н. Лесев. – Боровск, 1991. – 120 с.

4. Шпаковская, О. А. Влияние экзогенных гонадотропинов на процессы гормональной регуляции фолликулогенеза у коров : автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук / Шпаковская О.А. – Жодино, 2000. – 20 с.

5. Meneilly, A. S. Prolactin and the control of gonadotropin secretion in female / A. S. Meneilly // J. Reprod. Fert. – 1980. – № 58. – P. 537-549.

(поступила 4.03.2009 г.)

УДК 636.1.082.2(476)

М.А. ГОРБУКОВ, Ю.И. ГЕРМАН, В.И. ЧАВЛЫТКО,  
М.К. БОРИСОВЕЦ, В.Н. ДАЙЛИДЁНОК, А.И. ГЕРМАН

## **КАЧЕСТВО РАЗВОДИМЫХ В БЕЛАРУСИ ПОРОД ЛОШАДЕЙ ЗАРУБЕЖНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

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

**Введение.** Сложившиеся условия многопланового функционирования коневодства обуславливают необходимость разводить в республике кроме белорусских упряжных лошадей других пород, как тяжеловозных, для улучшения рабочих, продуктивных качеств пользовательного конепоголовья, так и верховых – для использования в конном спорте [1, 2]. Тяжеловозное коневодство в республике представлено русской и советской тяжеловозными, верховое – траккененской и ганноверской породами лошадей. Их востребованность в Беларуси обусловлена как актуальностью развития в современных условиях рабочепользовательного, продуктивного коневодства, так и социальной значимостью конного спорта.

Все разводимые в республике тяжеловозные и верховые породы лошадей – зарубежного происхождения. Численность их, особенно лошадей верховых пород, недостаточная для длительного замкнутого разведения, импорт генетического материала, особенно жеребцов-производителей, необходим. Однако, чтобы избежать существенных валютных затрат на закупку многочисленного конепоголовья нами осуществляется направленная работа по улучшению и совершенствованию собственной племенной базы. Одним из элементов данной работы является оценка имеющегося конепоголовья, установление его генеалогической структуры пород, параметров отдельных признаков. Эти данные необходимы для выявления и использования в селекционной работе наиболее перспективных генотипов.