

действия на эффективность эмбриотрансплантации и воспроизводительную функцию коров-доноров: Дис. ... канд. с.-х. наук: 06.02.01. – Жодино, 2000. – 116 с.

10. Saumande J. Les explorations hormonales chez les bovines dans le cadre de traitements des stimulations de l'ovaire // *Contracept. – fertile. – sex.* – 1990. – V. 18. – №9. – P. 699-710.

УДК 636.2.(4):212.64.089.67

Л.В. ГОЛУБЕЦ, кандидат сельскохозяйственных наук,
Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, кандидат сельскохозяйственных наук,
А.И. ГАНДЖА, кандидат сельскохозяйственных наук,
В.П. СИМОНЕНКО, научный сотрудник

ВЛИЯНИЕ ГОНАДОТРОПНЫХ ГОРМОНОВ ФСГ, ЛГ И ЭСТРАДИОЛА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА

Добавление комплекса гормонов ФСГ+ эстрадиол, ФСГ+ ЛГ в культуральные среды способствует более полноценному созреванию яйцеклеток в культуре *in vitro*, что приводит к оплодотворяемости 58,2-66,9% ооцитов и увеличивает выход жизнеспособных эмбрионов до 47,4-50,0%.

Ключевые слова: ооцит, яичник, яйцеклетка, эмбрион, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), эстрадиол.

Одним из факторов, определяющих качество эмбрионов, полученных методом культивирования вне организма, является полноценность созревания яйцеклетки в культуре *in vitro*. Моделирование условий роста и развития ооцитов и ранних эмбрионов, максимально приближенных к естественным, осуществляется путем добавления в среды для их культивирования биологически активных компонентов, регулирующих созревание яйцеклеток и дробление ранних зародышей *in vitro*.

Эффективность культуральных сред оценивают, как правило, по увеличению выхода созревших яйцеклеток и ранних эмбрионов на стадии морулы и бластоцисты. Большинство ооцитов (89,4%), извлеченных из яичников коров, находятся на стадии диплотены, на которой у крупного рогатого скота *in vivo* наступает торможение мейоза [5]. Извлеченные из фолликулов ооциты возобновляют мейоз спонтанно и могут проходить последовательно все стадии созревания до метафазы II, т.е. до стадии оплодотворения без каких-либо гормональных воздействий. Однако, этот процесс не равнозначен созреванию

ооцита *in vivo* до его овуляции. В условиях *in vitro* происходит лишь созревание ядра без участия цитоплазмы. Вследствие этого созревший вне организма ооцит не способен к дальнейшему развитию после оплодотворения, так как в этом процессе большую роль играют цитоплазматические факторы, ответственные за формирование структуры белков [1].

На цитоплазматическое созревание ооцитов оказывают влияние как клетки кумулюса, так и определенные гормоны. Регуляторами развития ооцитов *in vitro* могут быть гонадотропины, стероидные гормоны, инсулин, соматотропин, полипептидные факторы роста [2, 2, 4, 6].

В связи с этим целью наших исследований явилось изучение влияния комплекса гонадотропных гормонов (ФСГ + эстрадиол, ФСГ + ЛГ) на эффективность получения эмбрионов вне организма

Яйцеклетки для культивирования получали из яичников коров, убитых на мясокомбинате, методом рассечения фолликулов в среде Хенкса с добавлением 1% фетальной сыворотки, 1 ед/мл гепарина и 5 мкг/мл гентамицина. Для культивирования отбирали яйцеклетки без видимых признаков дегенерации, с плотным многослойным кумулюсом, гомогенной ооплазмой, равномерно заполняющей прозрачную оболочку. Затем ооциты помещали в модифицированную среду ТС – 199 (Sigma) и ставили на культивирование в CO₂-инкубатор при температуре 38⁰C, 5% CO₂ и 98% - ной влажности. Через 24 часа проводили оплодотворение. Капацитацию замороженно-оттаянной спермы осуществляли методом *swir-up* в модифицированном растворе Тирода (Sigma) с концентрацией гепарина 50 мкг/мл. Яйцеклетки помещали в каплю среды для оплодотворения и добавляли суспензию спермиев в концентрации 10⁶ на 1 мл. Совместное культивирование яйцеклеток и спермиев осуществлялось в течение 18-20 часов. После оплодотворения зиготы помещали в среду для культивирования ранних эмбрионов, представляющую собой модификацию среды ТС – 199 (Sigma) на монослое кумулюса, и инкубировали в течение 7 – 11 дней.

Все манипуляции с яйцеклетками и оценку стадий развития ранних эмбрионов крупного рогатого скота проводили под микроскопом МБС – 10 при 16-56-кратном увеличении.

В своих исследованиях мы изучали эффективность использования различных концентраций комплекса таких гормональных добавок, как ФСГ + эстрадиол и ФСГ + ЛГ.

Как показали результаты исследований, при концентрации ФСГ 5мкг/мл (табл. 1) наиболее эффективной оказалась концентрация эст-

радиола 50 нг/мл, хотя в этой группе эмбрионов уровень дробления по сравнению с концентрацией 20 и 30 нг/мл сократился на 10,4% и 21,9%, выход морул – на 11,3 и 6,2%. Выход бластоцист находился практически на одном уровне, а развитие морул в бластоцисты превышало первые две группы на 14,3 и на 4,8%.

Таблица 1.

Эффективность использования ФСГ + эстрадиол в культуре in vitro

	Эстрадиол, нг/мл	Оплодотворено ооцитов, п	Кол-во дробящихся зародышей, п-%	Выход морул, п-%	Выход бластоцист, п-%	Всего морул и бластоцист, п-%	Уровень развития морул до бластоцисты, %
ФСГ-5мкг/мл	20	69	38-55 ±5,9	18-26,1 ±5,3	10-14,5 ±4,2	28-40,6 ±5,9	35,7 ±5,8
	30	81	49-60,5 ±5,4	17-21 ±4,5	14-17,3 ±4,2	31-38,3 ±5,4	45,2 ±5,5
	50	74	33-4 ±5,84,6	11-14,8 ±4,1	11-14,8 ±4,1	22-29,7 ±5,3	50,0 ±5,8

Таблица 2

Эффективность использования эстрадиола в культуре in vitro при концентрации ФСГ 10 мкг/мл

	Эстрадиол, нг/мл	Оплодотворено ооцитов, п	Кол-во дробящихся зародышей, п-%	Выход морул, п-%	Выход бластоцист, п-%	Всего морул и бластоцист, п-%	Уровень развития морул до бластоцисты, %
ФСГ-10мкг/мл	20	87	46-52,8 ±5,4	24-27,6 ±4,8	11-12,6 ±3,6	35-40,2 ±5,3	31,4 ±5,0
	30	91	53-58,2 ±5,2	19-20,9 ±4,3	15-16,5 ±3,9	34-37,4 ±5,1	44,1 ±5,2
	50	111	49-44,1 ±4,7	19-17,1 ±3,6	14-12,6 ±3,1	33-29,7 ±4,3	42,4 ±4,7

В табл. 2 представлены результаты эффективности использования

различных концентраций эстрадиола в культуре *in vitro* при концентрации ФСГ 10 мкг/мл

Анализ приведенных в таблице данных показывает, что по мере увеличения концентрации эстрадиола уровень морул сокращается, а выход бластоцист в I и III группах остается на одном уровне и уступает второй II на 3,9%. Такая же тенденция наблюдается по трансформации морул в бластоцисты. Данные показатели составили 12,7% и 1,7%.

В табл. 3 отражены результаты эффективности использования эстрадиола при концентрации ФСГ 15 мкг/мл.

Таблица 3

Эффективность использования эстрадиола в культуре *in vitro* при концентрации ФСГ 15 мкг/мл

	Эстрадиол, нг/мл	Оплодотворено ооцитов, n	Кол-во дробя- щихся зароды- шей, n-%	Выход морул, n- %	Выход бласто- цист, n-%	Всего морул и бластоцист, n-%	Уровень разви- тия морулы до бластоцисты, %
ФСГ- 15мкг/м л	20	95	64-67,4 ±4,8	18-18,9 ±4,0	10-10,5 ±3,1	28-29,5 ±4,7	35,7 ±4,9
	30	76	48-63,1 ±5,5	18-23,7 ±4,9	12-15,8 ±4,2	30-39,5 ±5,6	40,0 ±5,6
	50	87	56-64,4 ±5,1	12-13,8 ±3,7	7-8,0 ±2,9	19-21,8 ±4,4	36,8 ±5,2

Как показали исследования, более эффективной оказалась концентрация эстрадиола 30 нг/мл. Если по уровню дробления результативность была практически одинаковой, то по выходу морул показатели были выше на 4,8 и 9,9%, а по выходу бластоцист – на 5,3 и 7,8%. В целом по выходу морул и бластоцист этот показатель составил 10,0 и 17,7%, соответственно.

Таким образом, добавление 30 и 50 нг/мл эстрадиола к питательной среде, содержащей 5 и 10 мкг/мл ФСГ, позволяет получать 29,7-38,3% морул и бластоцист с развитием 45,2–50,0% морул в бластоцисты. Выход морул и бластоцист при таком же количестве эстрадиола, но с более высокой концентрацией ФСГ (15 мкг/мл) составил 21,8-39,5% при 36,8-40,0%-ном переходе морулы в стадию бластоцисты.

Кроме эстрадиола основную роль в регуляции фолликуло- и эмбриогенеза играет лютеинизирующий гормон (ЛГ). Его строго определенное соотношение с ФСГ оказывает влияние на полноценное созре-

вание, оплодотворение и развитие ранних зародышей крупного рогатого скота.

В своих исследованиях мы использовали ЛГ в концентрации 5, 10, и 15 ед/мл, ФСГ – 5, 10 и 15 мкг/мл.

Анализ результатов опытов (табл. 4) показал, что если по уровню оплодотворяемости (дробления) более высокие показатели получены в I группе (разница составила 12,0 и 18,7%), то уже по выходу морул и бластоцист эта разница изменилась и практически выровнялась (30,3; 35,2 и 34,5%).

Таблица 4

Эффективность использования ЛГ с концентрацией ФСГ 5 мкг/мл

	ЛГ, ед/мл	Оплодотворено ооцитов, n	Кол-во дробящихся зародышей, n- %	Выход морул, n- %	Выход бластоцист, n- %	Всего морул и бла- стоцист, n- %	Уровень развития морулы до бласто- цисты, %
ФСГ- 5мкг/мл	5	112	75-66,9 ±4,4	22-19,6 ±3,7	12-10,7 ±2,9	34-30,3 ±4,8	35,3 ±4,5
	10	91	50-54,9 ±5,2	23-25,9 ±4,6	9-9,8 ±3,1	32-35,2 ±5,0	28,1 ±4,7
	15	110	53-48,2 ±4,8	24-21,8 ±3,9	14-12,7 ±3,2	38-34,5 ±4,5	36,8 ±4,6

В табл. 5 отражены данные опытов по изучению эффективности ЛГ при концентрации ФСГ в питательной среде 10 мкг/мл.

По результатам исследований установлено, что уровень оплодотворения в I группе оказался выше по сравнению со II и III на 5,0 и 11,4%. По выходу морул более высокие показатели получены в III группе (26,1 против 22,0 и 17,6%) по сравнению со II и I группами, в то время как по выходу бластоцист опытные группы существенно не различались (10,4; 10,0; 12,2).

Таблица 5

**Эффективность использования ЛГ в культуре in vitro
при концентрации ФСГ 10 мкг/мл**

	ЛГ, ед/мл	Оплодотворено ооцитов, п	Кол-во дробя- щихся зароды- шей, п- %	Выход морул, п- %	Выход бласто- цист, п- %	Всего морул и бластоцист, п- %	Уровень разви- тия морулы до бластоцисты, %
ФСГ- 10мкг/м л	5	125	75-60,0 ±4,4	22-17,6 ±3,4	13-10,4 ±2,7	36-28,8 ±4,1	36,1 ±4,3
	10	100	55-55,0 ±5,0	22-22,0 ±4,1	10-10,0 ±3,0	32-32,0 ±4,7	31,2 ±4,6
	15	115	56-48,6 ±4,7	30-26,1 ±4,1	14-12,2 ±3,1	34-29,6 ±4,3	41,2 ±4,6

В табл. 6 приведены данные по эффективности использования ЛГ в культуральных средах при концентрации ФСГ 15 мкг/мл.

Таблица 6

**Эффективность использования ЛГ в культуральных средах
при концентрации ФСГ 15 мкг/мл**

	ЛГ, ед/мл	Оплодотворено ооцитов, п	Кол-во дробя- щихся зароды- шей, п- %	Выход морул, п- %	Выход бласто- цист, п- %	Всего морул и бластоцист, п- %	Уровень разви- тия морулы до бластоцисты, %
ФСГ- 15мкг/м л	5	72	39-54,2 ±5,9	15-21,8 ±4,9	7-9,7 ±3,5	22-30,5 ±5,4	31,9 ±5,5
	10	84	49-58,3 ±5,4	21-25,0 ±4,7	9-10,7 ±3,4	30-35,7 ±5,2	30,0 ±5,0
	15	10,5	71-67,6 ±4,6	20-19,0 ±3,8	18-17,1 ±3,8	38-36,2 ±4,7	47,4 ±4,9

Как показывают данные, приведенные в таблице, уровень оплодотворения, выход бластоцист и уровень трансформации морул в бластоцисты увеличился по мере увеличения концентрации ЛГ на 9,3-13,4%; 6,4-7,4% и 15,5-17,4%, соответственно.

Использование ФСГ и ЛГ в культуре in vitro полностью подтверждает наличие зависимости между этими гормонами in vivo, что осо-

бенно заметно на процессе оплодотворения. В первых двух опытах (табл. 4, 5) с увеличением концентрации ЛГ уменьшилось количество оплодотворенных яйцеклеток. Лучший результат (66,9% дробящихся зародышей) получен при 5 мкг/мл ФСГ и добавлении 5 ед/мл ЛГ.

Обратная зависимость наблюдалась в третьем опыте с концентрацией ФСГ 15 мкг/мл. Увеличение количества ЛГ до 15 ед/мл способствовало оплодотворению 67,6% созревших яйцеклеток, что, по-видимому, вызвано установлением оптимального гормонального равновесия между ФСГ и ЛГ *in vitro*. Данная закономерность не прослеживается по выходу морул и бластоцист. Однако, по трансформации морул в бластоцисты самый высокий процент (47,4) отмечен в среде с 15 мкг/мл ФСГ и 15 ед/мл ЛГ.

Вывод. Использование гормональных добавок: (ФСГ + эстрадиол и ФСГ + ЛГ) в культуральных средах позволяет повысить эффективность метода получения эмбрионов вне организма. Однако решение данной проблемы не может ограничиться выполненной работой и требует проведения дальнейших исследований.

1. Гордон А. Контроль воспроизводства с.-х. животных. – М: Агропромиздат, 1988 – 415 с.
2. Baulien E.E., Schoderet-Slatkiet S. Steroidal and peptides control mechanisms in membrane of *Xenopus Laevis* oocytes resuming meiotic division // *J.Steroid Biochem.* – 1983. – Vol. 19. – № 1. – P. 139-145.
3. Eppig J., Schroeder A.C. Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects // *Theriogenology.* – 1986. – Vol. 25. – № 1. – P. 97-106.
4. King W.A., Greve B.T., Gott A.K. Meiosis in bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo* // *Acta. Vet. Scand.* – 1986. – Vol. 27. – №2. – P. 267-269.
5. Кузьмина Т.И., Гончарова В.П., Гойло Т.А., Голубев А.К., Романюк А.В. Созревание ооцитов коров *in vitro* под влиянием мозгового нейростимулирующего белка, используемого с целью повышения эффективности культивирования // *Сельскохозяйственная биология.* – 1995. – № 2. – С. 61-65.
6. Veldhuis J., Rodgers J.R., Furlanetto R.N. Synergistic actions of estradiol and the insulin-like growth ovarian (granulosa) cells // *Endocrinol.* – 1986. – Vol. 119. – № 2. – P. 530-538.