

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

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ И ГОРМОНАЛЬНЫХ ДОБАВОК ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА.

Использование энергетических добавок (бычий сывороточный альбумин, эстральная сыворотка, фетальная сыворотка, фолликулостимулирующий гормон) увеличивает эффективность получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма и повышает выход полноценных эмбрионов до 41,4–47,4%.

Ключевые слова: яичник, яйцеклетка, ооцит, эмбрион, среда, бычий сывороточный альбумин (БСА), эстральная сыворотка (ЭС), фетальная сыворотка (ФС), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ).

У млекопитающих извлеченные из фолликулов ооциты спонтанно возобновляют мейоз в самых простых синтетических средах и проходят все фазы развития до метафазы II (стадии оплодотворения). Однако этот процесс неравнозначен процессу созревания, который происходит в условиях *in vivo*. В условиях *in vitro* в простых средах происходит только ядерное созревание, вследствие чего такой ооцит не может развиваться после оплодотворения, так как в этом огромную роль играет цитоплазма, для созревания которой требуется присутствие в синтетической питательной среде множество различных биологически активных веществ, способных максимально приблизить условия *in vitro* к условиям *in vivo* [1]. В настоящее время получены данные о положительном влиянии белков и гормонов сыворотки крови на созревание ооцитов в культуральных средах. В состав сыворотки входят полипептидные факторы роста (ППФР), способствующие выживанию клеток, воздействуя на процессы их мейотического деления [3, 4]. ППФР могут инициировать в клетках гранулезы высокую скорость биосинтеза гормонов, необходимых для созревания ооцитов и их подготовку к оплодотворению [2]. Следовательно, использование сыворотки крови в качестве добавки в культуральные среды позволяет повысить эффективность метода. При этом важен выбор оптимальных концентраций и сочетаний с другими компонентами.

В связи с этим, целью наших исследований явилось изучение эф-

фективности использования эстральной и фетальной сыворотки крови, бычьего сывороточного альбумина и фолликулостимулирующего гормона в качестве энергетических и гормональных добавок при получении эмбрионов крупного рогатого скота вне организма.

Яичники отбирали в момент убоя животного. Выделяли ооциты путем рассечения ткани яичников лезвием безопасной бритвы. Оценку качества полученных ооцит-кумулясных комплексов проводили по разработанной нами 5-ти балльной шкале морфологической оценки.

Основной питательной средой служила разработанная нами среда для созревания с добавлением 10мг/мл, 20мг/мл и 30 мг/мл БСА (n=330); 5%, 15%, 20% эстральной сыворотки (n=284); 5%, 15%, 20% фетальной сыворотки (n=345); 5мг/мл, 10мг/мл и 15мг/мл ФСГ (n=337); комплекса БСА+ЭС (n=230), БСА+ФС (n=240), БСА+ФСГ (n=270), БСА+ЭС+ФСГ (n=193), БСА+ФС+ФСГ (n=230).

При анализе и статистической обработке учитывали уровень дробления и выход жизнеспособных зародышей.

Изучали эффективность разработанной нами на основе ТС-199 основной питательной среды для дозревания ооцитов ТС-199 «стандарт».

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Эффективность использования основной и опытной сред

Состав среды	Оплодотворено ооцитов, n	Дробящихся зародышей, n - %	Выход морул, n - %	Выход бластоцист, n - %	Всего морул-бластоцист, n - %	Уровень трансформации морул в бластоцисты, n - %
ТС-199 (контроль)	80	14-17,5	4-5,0	-	4-5,0	-
ТС-199 стандарт (опыт)	80	23-28,7	10-12,5	1-1,2	11-13,7	1-9,1

Из приведенных данных видно, что выход зародышей при использовании опытной среды превышал аналогичный показатель контрольной среды на 11,2%, выход морул на 7,5%, а выход морул и бластоцист – на 8,7%.

При использовании контрольной среды ни одна морула не созрела до бластоцисты. В опытной из 11 морул до стадии бластоцисты созрела одна или 9,1%.

Как показал опыт нашей работы, одной основной питательной среды для эффективного получения эмбрионов вне организма недостаточно. Необходимо использование дополнительных компонентов, способствующих полноценному созреванию клеток. С этой целью мы обогащали среду такими энергетическими и гормональными добавками как бычий сывороточный альбумин (БСА), фетальная сыворотка (ФС), эстральная сыворотка (ЭС) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) как по отдельности, так и в комплексе.

Результаты исследований представлены в табл. 2-6.

Добавление в основную питательную среду БСА в различных концентрациях (10мг/мл; 20мг/мл и 30мг/мл) позволило выявить его оптимальную концентрацию, которая составляет 10мг/мл (табл. 2). В этом случае выход дробящихся зародышей составил 39,2%, выход морул-17,5%, бластоцист-7,5%. По выходу бластоцист это на 4,9 и 5,4% выше по сравнению с концентрацией в 20 и 30мг/мл. Однако, если проанализировать уровень трансформации морул в бластоцисты, то здесь более высокие результаты получены при использовании БСА в концентрации 20мг/мл (уровень трансформации 12,5%) и 30мг/мл (уровень трансформации 15,8%), в то время как в I группе этот показатель составил 9,1%.

Таблица 2

Эффективность включения в основную среду БСА

Основная среда	Количество БСА	Оплодотворено ооцитов, n	Кол-во дробящихся зародышей, n - %	Выход морул, n - %	Выход бластоцист, n - %	Всего морул-бластоцист, n - %	Уровень трансформации морул в бластоцисты, n - %
ТС-199 стандарт	10мг/мл	120	47-39,2	21-17,5	3-7,5	24-25,0	1-9,1
ТС-199 стандарт	20мг/мл	115	45-39,1	16-13,9	3-2,6	19-16,5	3-12,5
ТС-199 стандарт	30мг/мл	95	36-37,9	12-12,6	2-2,1	14-14,7	3-15,8

В табл. 3 представлены результаты эффективности эстральной сыворотки в культуральной среде для получения эмбрионов *in vitro*. Сыворотку добавляли в концентрациях 5, 15 и 20%. Всего было оплодотворено 110, 79 и 95 яйцеклеток, соответственно.

Таблица 3

Эффективность использования эстральной сыворотки в питательных средах

Среда	Содержание эстральной сыворотки, %	Оплодотворено ооцитов, п	Выход дробящихся зародышей, п - %	Выход морул, п - %	Выход бластоцист, п - %	Выход морул-бластоцист, п - %	Уровень трансформации морул в бластоцисты, п - %
ТС-199 стандарт	5	110	36-37,9	19-17,3	5-4,5	24-21,8	5-20,8
	15	79	50-45,4	12-15,2	2-2,5	14-17,7	2-14,3
	20	95	42-53,2	13-13,7	2-2,1	15-15,8	2-13,3

Как показал анализ полученных результатов, выход дробящихся зародышей составил 37,9, 45,4 и 53,2% соответственно; морул 17,3, 15,2 и 13,7%; бластоцист – 4,5, 2,5 и 2,1%. Уровень трансформации морул в бластоцисты – 20,8, 14,3 и 13,3%.

Таким образом, прослеживается общая тенденция увеличения эффективности получения эмбрионов *in vitro* при добавлении 5% эстральной сыворотки. Выход морул-бластоцист увеличивается на 4,1 и 6,0%, а развитие морул до бластоцисты на 6,5 и 7,5%, соответственно.

В табл. 4 видна эффективность использования фетальной сыворотки плодов крупного рогатого скота в разных концентрациях.

Таблица 4

Эффективность использования фетальной сыворотки плодов коровы

Среда	Содержание фетальной сыворотки, %	Оплодотворено ооцитов, п	Выход дробящихся зародышей, п - %	Выход морул, п - %	Выход бластоцист, п - %	Выход морул-бластоцист, п - %	Уровень трансформации морул в бластоцисты, п - %
ТС-199 стандарт	5	115	42-36,5	14-12,2	2-1,7	16-13,9	2-12,5
	15	130	46-35,4	17-13,1	3-2,3	20-15,4	3-15,0
	20	100	40-40	10-10,0	1-1,0	11-11,0	1-9,1

По результатам проведенных исследований не выявлено различий в изучаемых показателях опытной и контрольной сред. Однако отмечается положительная тенденция по выходу морул и бластоцист (15,4% против 13,9 и 11,0) и развитию морул в бластоцисты (15,0 про-

тив 12,5 и 9,1%) при использовании фетальной сыворотки в 15%-ной концентрации.

В табл. 5 представлены результаты исследований эффективности использования ФСГ-П.

Таблица 5
Эффективность использования ФСГ в питательных средах

Среда	Содержание ФСГ, мг/мл	Оплодотворено ооцитов, п	Выход дробящихся зародышей, п - %	Выход морул, п - %	Выход бластоцист, п - %	Выход морул-бластоцист, п - %	Уровень трансформации морул в бластоцисты, п - %
ТС-199 стандарт	5	110	54-49,1	20-18,2	6-5,4	26-23,6	6-23,1
	10	115	54-46,9	18-15,6	2-1,7	20-17,4	2-10,0
	15	112	54-48,2	20-17,8	7-6,21	27-24,1	7-25,9

Как показал анализ результатов исследований, при добавлении в культуральную среду 5 и 15мг/мл ФСГ выход морул и бластоцист по сравнению с 10мг/мл увеличился на 6,2% и 6,7%, а развитие морулы до бластоцисты – на 13,1% и 15,9%.

В процессе исследований испытывали следующие составы сред:

- 1 ТС-199 стандарт +БСА+ЭС
- 2 ТС-199 стандарт + БСА +ФС
- 3 ТС-199 стандарт + БСА +ФСГ
4. ТС-199 стандарт + БСА +ЭС+ФСГ
5. ТС-199 стандарт + БСА +ФС+ФСГ

В качестве контроля служила ТС-199 стандарт (табл. 6).

Таблица 6
Эффективность использования комплекса гормональных и энергетических добавок в питательную среду

Среда	Оплодотворено ооцитов, п	Выход дробящихся зародышей, п - %	Выход морул, п - %	Выход бластоцист, п - %	Выход морул-бластоцист, п - %	Уровень трансформации морул в бластоцисты, п - %
1	230	131-56,9	47-20,4	26-11,3	73-31,7	26-35,6
2	240	120-50,0	44-18,3	22-9,2	66-27,5	22-33,3
3	270	154-57,0	56-20,7	34-12,6	90-33,3	34-37,8
4	193	116-60,1***	40-20,7	36-18,6	76-39,4	36-47,4
5	230	129-56,1	33-14,3	23-10,0	56-24,3	23-41,4

При анализе полученных результатов не установлено достоверных различий как по уровню дробления, так и по выходу биологически полноценных эмбрионов между испытываемыми средами. Однако следует отметить тенденцию повышения результативности при использовании среды ТС-199 стандарт + БСА + ЭС + ФСГ. Уровень дробления увеличивался по сравнению с другими средами (1, 2, 3, 5) на 3,2-10,1%, а выход биологически полноценных эмбрионов – на 6,3-14,1%. По сравнению с контролем данные показатели составляли 60,1 против 28,7% (по уровню дробления; $P < 0,001$) и по выходу морул-бластоцист – 47,4% против 9,1%.

Вывод. Использование энергетических и гормональных добавок к среде ТС-199 (БСА, ФС, ЭС, ФСГ) в культуре *in vitro* способствует цитоплазматическому созреванию ооцитов крупного рогатого скота и повышает выход полноценных эмбрионов до 41,4–47,4%.

1. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. – Л.: Агропромиздат, 1989. – 255 с.

2. Созревание ооцитов коров *in vitro* под влиянием мозгового нейростимулирующего белка, используемого с целью повышения эффективности культивирования./ Т.И. Кузьмина, В.П. Гончарова, Т.А. Гойло, А.К. Голубев, А.В. Романок // Сельскохозяйственная биология. – 1995. – № 2. – С. 61-65.

3. Schomberg D.W., May J.V., Mondshein J.S. Interactions between hormones and growth factors in the regulation of granulose cell differentiations *in vitro* // J. Steroid. Biochem. – 1983. – Vol. 19. – № 1. – P. 291-295.

4. Veldhuis J., Rodgers J.R., Furlanetto R.N. Synergistic actions of estradiol and the insulin-like growth ovarian (granulose) cells // Endocrinol. – 1986. – Vol. 119. – № 2. – P. 530-538.

УДК 636.1.082.1

М.А. ГОРБУКОВ, доктор сельскохозяйственных наук

М.К. БОРИСОВЕЦ, кандидат экономических наук

Э.А. БАЙГИНА, аспирант

РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗВЕДЕНИЯ И ПУТИ ДАЛЬНЕЙШЕГО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ РУССКОЙ ТЯЖЕЛОВОЗНОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ В БЕЛАРУСИ.

Установлено, что в племенных хозяйствах республики сформирован оригинальный по происхождению и особенностям экстерьера селекционный массив высококлассных лошадей русской тяжеловозной породы. Показаны приемы дальнейшего улучшения их качества и создания нового заводского типа путем как традиционного разведения по линиям лошадей, удовлетворяющих разработанному модельному стандарту, так и использования системы специальных подборов, тестирования и отбора жеребцов и кобыл по