

по тазогрудному и грудному индексам, которые характеризуют специализацию крупного рогатого скота мясного направления продуктивности. Так, по тазогрудному индексу бычки достоверно на 12,3 и 10 единиц ($P < 0,01$) превосходили сверстниц в 12- и 15-месячном возрасте, соответственно.

Изучение корреляционных взаимосвязей показало, что в возрасте 12 мес. связь между индексом растянутости и живой массой незначительно отрицательная, в то время как к 15-месячному возрасту индекс растянутости положительно коррелирует с живой массой, что указывает на то, что растянутые животные более долгорослы. По грудному индексу телосложения наблюдается достаточно высокая корреляция с живой массой как в 12-, так и в 15-месячном возрасте. Коэффициент корреляции (0,51) между грудным индексом в 12 мес. и живой массой в 15 мес. указывает на то, что по величине первого можно прогнозировать развитие животного в последующем.

Литература

1. Амерханов, Х. Основы развития мясного скотоводства за рубежом / Х. Амерханов // Молочное и мясное скотоводство. – 2004. – № 7. – С. 12-13.
2. Багрий, Б. А. Разведение и селекция мясного скота / Б. А. Багрий. – Москва : Агропромиздат, 1991. – 256 с.
3. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных / А. П. Калашников [и др.]. – Москва : Агропромиздат, 2003. – 456 с.
4. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Мн. : Высшая школа, 1973. – 250 с.

(поступила 13.03.2012 г.)

УДК 636.2.034:612.02

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, А.И. ГАНДЖА, В.П. СИМОНЕНКО,
И.В. КИРИЛЛОВА

ПОЛУЧЕНИЕ РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА ИЗ ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФОЛЛИКУЛОВ И ООЦИТОВ

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

Введение. Создание криобанка ооцитов, зигот и эмбрионов, полученных *in vitro*, путем их глубокого замораживания в жидком азоте при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, наиболее перспективное направление исследова-

дований на современном этапе развития, способствующее сохранению и планомерному использованию генетических ресурсов сельскохозяйственных животных [1, 2]. Однако если криоконсервирование эмбрионов крупного рогатого скота, полученных после индукции суперовуляции и искусственного осеменения, за сравнительно короткий промежуток времени получило мировое признание и с успехом используется в животноводстве, научно-исследовательских лабораториях, то эффективность криоконсервации ооцитов и эмбрионов, полученных вне организма, не столь результативна [3, 4].

На изменение клеточного объема, ионного гомеостаза, активность ферментных комплексов и, как следствие, на структурное и функциональное состояние клеток после криоконсервации влияют тип криопротектора, его концентрация, продолжительность и температура экспозиции к нему. Большое значение имеют также состав культуральных сред и условия созревания и оплодотворения деконсервированных ооцитов. Следует отметить, что морфологическая оценка является одним из наиболее субъективных приемов тестирования состояния биообъектов. Основным критерием оценки жизнеспособности ооцитов после криоконсервирования и оттаивания являются сохранение потенции ооцитов возобновлять мейоз, оплодотворяться и продолжать развитие в условиях *in vitro*.

В связи с вышесказанным, целью наших исследований явилось изучение условий получения ранних зародышей крупного рогатого скота вне организма из деконсервированных фолликулов и фолликулярных ооцитов.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Объектом исследований служили фолликулы и ооциты коров, извлеченные из яичников убитых на мясокомбинате животных. Для приготовления витрификационных сред использовали криофилактики: этиленгликоль, диметилсульфоксид, пропандиол, глицерин, сахарозу. Базовой средой служили фосфатный буфер или среда ТС-199 с добавлением 20%-ной фетальной сыворотки. Криоконсервирование фолликулов и фолликулярных ооцитов проводили в пластиковых пайеттах методом витрификации. Овариальные фолликулы после оттаивания иссекали, проводили поиск ооцитов. Для культивирования отбирали ооциты окруженные клетками кумулюса с интактной зоной пеллюцида. Созревание замороженно-оттаянных ооцитов, оплодотворение, оценку уровня дробления проводили по общепринятой методике, как и для свежеизвлеченных клеток [5]. Для созревания фолликулярных

ооцитов и культивирования ранних зародышей мы использовали стандартную среду ТС-199 (контроль) и KSOM. Критерием оценки жизнеспособности ооцитов, полученных из деконсервированных фолликулов и фолликулярных ооцитов, служил уровень дробления оплодотворенных яйцеклеток.

Численность ооцитов в опытах по определению оптимального количества клеток на лунку при созревании составляла: А – 1 ооцит; Б – 5 ооцитов; В – 10 ооцитов; Г – 20 ооцитов; Д – 30 ооцитов. Культивирование проводили в 4-луночных планшетах в 500 мкл среды ТС-199 в общей сложности в течение 27 ч. Часть ооцитов перед замораживанием культивировали в питательной среде в течение 20 или 24 часов. Овариальные фолликулы были разделены на три опытные группы: 1) стандартное культивирование в малом объеме среды с регулярной ее заменой; 2) культивирование в большом объеме культуральной среды без перемешивания; 3) культивирование в большом объеме культуральной среды с помешиванием. Фолликулы первой группы помещали из расчета один фрагмент на одну лунку 4-луночного планшета для культивирования клеток в 500 мкл культуральной среды и инкубировали в 5 % CO₂ при 39 °С в течение двух суток. Через сутки 250 мкл культуральной среды заменяли на свежие. Опытное культивирование фолликулов второй группы после отогрева и отмывки производили в чашках Петри с 4 мл среды. Замену среды не производили. Культивирование третьей группы фолликулов осуществляли, как и второй группы, при 5 % CO₂ и 39 °С с периодическим помешиванием.

Результаты эксперимента и их обсуждение. В естественных условиях (*in vivo*) ооциты дозревают обособленно друг от друга в фолликулах. В период одного полового цикла созревает и овулирует как правило одна яйцеклетка. При получении ранних эмбрионов вне организма созревание ооцитов проводят группами, и количество клеток в группах при культивировании играет не последнюю роль наряду с составом питательных сред.

Нами изучено влияние количества культивируемых ооцитов в определенном объеме культуральных сред на их жизнеспособность и мейотическое созревание вне организма после размораживания (таблица 1). Увеличение общего времени созревания замороженно-оттаянных ооцитов на 3 часа по сравнению со свежеизвлеченными оправданно из-за снижения уровня метаболизма данной категории клеток.

Таблица 1 – Уровень созревания деконсервированных ооцитов коров, культивируемых в группах с разным количеством клеток и временем предварительного созревания

Опытные группы	Количество клеток, п	Время предварительного культивирования, ч	Количество клеток, пригодных для культивирования		Время культивирования после оттаивания, ч	Проведен цитогенетический анализ, п	Количество клеток		Другие стадии мейоза	
			п	%			Созрело до метафазы II	%		
А	20	24	16	80,0	3	16	8	50,0	8	50,0
	20	20	14	70,0	7	14	6	42,9	8	57,1
	18	0	12	66,7	27	12	4	33,3	8	66,7
Итого	58	–	42	72,4	–	42	18	42,9	24	57,1
Б	32	24	27	84,4	3	20	10	50,0	10	50,0
	30	20	24	80,0	7	18	8	44,4	10	55,6
	28	0	21	75,0	27	16	7	43,8	9	56,2
Итого	90	–	72	80,0	–	54	25	46,3	29	53,7
В	50	24	42	84,0	3	30	16	53,3	14	46,7
	50	20	41	82,0	7	30	14	46,7	16	53,3
	44	0	32	72,7	27	28	12	42,9	16	57,1
Итого	144	–	115	80,0	–	88	42	47,7	46	52,3
Г	80	24	68	85,0	3	40	26	65,0	14	35,0
	80	20	63	78,8	7	40	21	52,5	19	47,5
	62	0	47	75,8	27	35	17	48,6	18	51,4
Итого	222	–	178	80,2	–	115	64	55,7	51	44,3
Д	90	24	60	66,7	3	42	18	42,9	24	57,1
	90	20	65	72,2	7	41	16	39,0	25	61,0
	85	0	58	68,2	27	40	13	32,5	27	67,5
Итого	265	–	183	69,1	–	123	47	38,2	76	61,8

Количество морфологически «нормальных» клеток после размораживания, имеющих неповрежденную прозрачную оболочку, гомогенную и мелкозернистую ооплазму в среднем по группам составило: 72,4% в опыте А; по 80,0 % в опытах Б, В и Г и 69,1 % в варианте Д. Следует отметить положительное влияние предварительного созревания гамет вне организма на их сохранность после деконсервации, так инкубация в течение 24 часов позволила получить в опытах А, Б, В и Г 80,0-85,0 % морфологически «нормальных» ооцитов, а в опыте Д – 66,7 %, из них созрело до метафазы II после оттаивания и культивирования в течение 3 часов 50,0-65,0 % и 42,9 % клеток.

Установлено, что увеличение количества клеток при культивировании в 500 мкл среды с 1 до 20 способствует повышению числа клеток, достигших стадии метафазы II в среднем с 42,9 до 55,7 %, а до 30 клеток в лунке вызывает снижение выхода пригодных для оплодотворения яйцеклеток до 38,2 %. Предварительное культивирование ооцитов в течение 20 часов перед заморозкой также оказало положительное влияние на их жизнеспособность в сравнении со свежеизвлеченными – сохранность составила 70,0-82,0 % и 66,7-75,8 %, соответственно, что оказалось выше на 3,3-9,3 %. Аналогичная картина наблюдалась и по уровню созревания ооцитов до стадии метафаза II. Цитогенетический анализ выявил преимущество предварительного культивирования в течение 20 часов по сравнению со свежеизвлеченными по количеству клеток, полученных после оттаивания и окончательного культивирования вне организма, на стадии метафаза II на 0,6-9,6 %.

Во всех вариантах опыта Д с количеством клеток 30 штук в лунке наметилась тенденция снижения изучаемых показателей. Так, сохранность клеток после оттаивания составила 66,7-72,2 %, до стадии метафаза II созрело 32,5-42,9 % клеток. Из всех вариантов опыта наилучший результат получен в группе Г при культивировании в одной лунке 20 клеток: сохранность составила 75,8-85,0 %, стадии метафаза II достигло 48,6-65,0 % ооцитов.

Таким образом, предварительное культивирование 20 ооциткумулюсных комплексов коров в 500 мкл среды перед замораживанием повышает криорезистентность гамет, что проявляется в повышении их жизнеспособности на 3,0-9,2 % и количества созревших до метафазы II мейоза клеток на 3,9-12,5 % по сравнению с остальными опытными группами. Установлена сохранность деконсервированных ооцитов на уровне 66,7-85,0 %, а созревание до метафазы II мейоза – на уровне 32,5-65,0 %.

Влияние параметров культивирования овариальных фолликулов на сохранность ооцитов оценивалось по количеству дробящихся зародышей после извлечения клеток из фолликулов и оплодотворения капа-

цитированной замороженно-оттаянной спермой быка. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние параметров культивирования замороженно-оттаянных овариальных фолликулов на оплодотворяемость яйцеклеток

Вариант опыта	Время культивирования, ч	Количество ооцитов, n	Количество клеток пригодных для оплодотворения		Уровень дробления		Количество дегенерированных клеток	
			n	%	n	%	n	%
I	24	16	9	56,3	1	11,1	1	100
	27	12	7	58,3	1	14,3	–	–
	36	15	7	46,7	–	–	–	–
Всего		43	23	53,5	2	8,7	1	50,0
II	24	18	10	55,6	2	20,0	1	50,0
	27	20	11	55,0	3	27,3	2	66,7
	36	14	7	50,0	–	–	–	–
Всего		52	28	53,8	5	17,9	3	60,0
III	24	20	12	60,0	3	25,0	1	33,3
	27	22	12	54,5	2	16,6	1	50,0
	36	18	7	38,9	1	14,7	–	–
Всего		60	31	51,7	6	19,4	2	33,3
Итого		155	82	52,9	13	15,6	6	46,2

Анализ результатов проведенных исследований не выявил существенных различий по выходу количества клеток, пригодных для культивирования в трех вариантах опыта, и составил в среднем 52,9 %, увеличение времени культивирования до 36 часов снижало результативность опыта. В среднем уровень дробления составил 15,6 %, в I группе получено дробящихся зародышей – 8,7 %, во II – 17,9 %, в III – 19,4 %. Морфологические признаки дегенерации наблюдались у 50,0% клеток I группы, у 60,0 % II группы и 33,3 % III группы. Таким образом, культивирование деконсервированных овариальных фолликулов в большом объеме (4 мл) культуральной среды в течение 24-27 часов позволяет получать после диссекции 51,7-53,8 % ооцитов, пригодных к оплодотворению, и 16,6-27,3 % дробящихся зародышей после оплодотворения.

По результатам исследований разработаны условия культивирования деконсервированных ооцитов коров вне организма. Предварительное созревание ооцит-кумулюсных комплексов в 500 мкл среды ТС-199 в течение 24 часов перед замораживанием способствует сохранению морфологической целостности 85,0 % ооцитов после оттаивания, дополнительное культивирование клеток после деконсервации в тече-

ние 3 часов позволяет получать 65,0 % ооцитов на стадии метафаза II. Культивирование деконсервированных овариальных фолликулов в большом объеме (4 мл) культуральной среды в течение 24-27 часов позволяет получать 51,7-53,8 % клеток, пригодных к оплодотворению, и 16,6-27,3 % дробящихся зародышей после оплодотворения.

Среда ТС-199 представляет собой сбалансированную комбинацию витаминов, аминокислот, солей Эрла и других факторов, предназначенных для культуры клеток. Культуральная среда KSOM (potassium simplex optimization medium) – синтетическая среда, аналогичная по минеральному составу яйцеводной жидкости мышей. В опыте среду ТС-199 модифицировали бикарбонатом и пируватом натрия, бычьим сывороточным альбумином – 60 мг/мл, ФСГ – 5 мкг/мл, эстрадиолом – 5 мкг/мл, в двух других опытах среду ТС-199 М использовали в комплексе с монослоем клеток гранулезы или кумулюса. Отсутствие кумулюсного окружения вызывает, как правило, дегенерацию ооцитов. Практика работы с деконсервированными ооцитами показывает, что после прохождения технологических этапов часто ооцит-кумулюсный комплекс (ОКК) теряет частично или полностью клетки кумулюса, поэтому представляется целесообразным использовать заранее приготовленный монослой данных клеток.

Клетки гранулезы, окружающие ооциты в фолликулах яичников, играют важную роль в создании условий, требуемых для развития фолликулов, овуляции, оплодотворения, развития и имплантации эмбрионов. Большинство исследователей используют клетки гранулезы для преодоления блока дробления при культивировании *in vitro*. В то же время, установлен эффект положительного влияния гранулезы на созревание вне организма ооцитов коров [6].

Анализ проведенных экспериментов по влиянию состава питательных сред на выход ранних зародышей коров, полученных из деконсервированных фолликулов и фолликулярных ооцитов, выявил положительный эффект от присутствия монослоя соматических клеток кумулюса и гранулезы в культуральных системах (таблица 3).

Если в контроле (ТС-199) уровень дробления составил 5,0 %, в среде ТС-199 М – 4,8; 9,5 %, то на монослое клеток гранулезы получено 10,5 % дробящихся клеток из замороженно-оттаянных фолликулов, из ооцитов – 15,2 %, а на монослое соматических клеток кумулюса – 11,8; 12,7 %, соответственно. По уровню дробления лучше всего зарекомендовала себя среда KSOM – 22,7 и 15,2 %, из них 60,0 % клеток были с признаками морфологических повреждений. В экспериментах с монослоями соматических клеток фолликула на ТС-199 М получено 50,0 % морфологически полноценных ранних зародышей вне организма. Всего было использовано 280 ооцитов, уровень дробления составил

11,4%, количество дегенерированных клеток – 56,2 %, морфологически «нормальных» – 43,8 %. Из 97 деконсервированных фолликулов во всех опытах подробилось 10,3 % клеток, дегенерированных зародышей получено 50,0 %. Из 183 замороженно-оттаянных ооцитов подробилось 12 %, 13 дробящихся клеток, или 59,1 %, остановились в развитии с признаками дегенерации.

Таблица 3 – Влияние культуральной среды на выход ранних зародышей коров, полученных из деконсервированных фолликулов (I) и фолликулярных ооцитов (II) вне организма

№ п/п	Среда	Опыт	Количество клеток, п	Уровень дробления, п -%	Количество дегенерированных клеток, п-%
1	ТС-199 стандарт (контроль)	I	18	–	–
		II	20	1-5,0	1-100,0
2	ТС-199 М (модифицированная)	I	21	1-4,8	1-100,0
		II	42	4-9,5	2-50,0
3	ТС-199 М на моно-слое гранулезы	I	19	2-10,5	1-50,0
		II	33	5-15,2	2-40,0
4	ТС-199 М на моно-слое кумулюса	I	17	2-1,8	1-50,0
		II	55	7-12,7	3-42,9
5	KSOM	I	22	5-22,7	3-60,0
		II	33	5-15,2	3-60,0
Всего		I	97	10-10,3	5-50,0
		II	183	22-12,0	13-59,1
ИТОГО			280	32-11,4	18-56,2

По результатам проведенных исследований установлено, что комплексное применение среды ТС-199 М с монослоем соматических клеток кумулюса или гранулезы способствует оплодотворяемости деконсервированных фолликулов и ооцитов коров на уровне 10,5-15,2 % с сохранением способности к дальнейшему развитию у 40,0-50,0 % зародышей.

Заключение. Предварительное созревание ооцит-кумулюсных комплексов в 500 мкл среды ТС-199 в течение 24 часов перед замораживанием способствует сохранению морфологической целостности 85,0 % ооцитов после оттаивания, дополнительное культивирование клеток после деконсервации в течение 3 часов позволяет получать 65,0% ооцитов на стадии метафаза II. Культивирование деконсервиро-

ванных овариальных фолликулов в 4 мл культуральной среды в течение 24-27 часов позволяет получать 51,7-53,8 % клеток, пригодных к оплодотворению, и 16,6-27,3 % дробящихся зародышей после оплодотворения.

Комплексное применение среды ТС-199 М с монослоем соматических клеток гранулезы способствует оплодотворяемости деконсервированных ооцитов коров на уровне 15,2 % с сохранением способности к дальнейшему развитию у 40,0 % зародышей.

Литература

1. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / под ред. М. В. Зубец, В. П. Буркат. – Киев, 1999. – 722 с.
2. Безуглий, М. Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин. – Х., 2002. – 155 с.
3. Руткис, З. А. Зависимость криорезистентности ооцитов коров при витрификации от исходного состояния их кумулюса / З. А. Руткис // Современные методы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. – СПб, 2001. – С. 228-231.
4. Троцкий, П. А. Использование пайетт с различным диаметром для криоконсервирования ооцит-кумулясных комплексов коров / П. А. Троцкий // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных : материалы 6-ой международ. науч. конф. – Дубровицы, 2006. – С. 192-194.
5. Усовершенствованная технология получения ранних зародышей вне организма для ускоренного размножения и сохранения высокоценных животных в скотоводстве / А. И. Ганджа [и др.]. – Жодино, 2011. – 35 с.
6. Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the developmental competence of bovine oocytes during in vitro maturation period are promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects / S. Ikeda [et al.] // Reproduction. – 2006. – Vol. 132. – P. 549-557.

(поступила 5.03.2-12 г.)

УДК 636.4.082.31:612.017

Е.И. ЛИНКЕВИЧ, Т.В. ЗУБОВА, Е.И. ШЕЙКО, Д.М. БОГДАНОВИЧ

ПОКАЗАТЕЛИ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КРОВИ И СПЕРМЫ ХРЯЧКОВ В УСЛОВИЯХ АДАПТАЦИИ

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

Введение. Приспособление животных, перемещаемых из одной экологической зоны в другую, тесно связано со степенью устойчивости организма к воздействию факторов внешней среды. Для всесторонней оценки физиологического состояния животных в условиях