

вышением на 0,06 ед. у животных белорусской селекции. Общего белка в крови у коров обеих групп было от 96,62 до 101,48 г/л, при этом больше его на 4,86 г/л, или на 5,0 %, было у животных отечественной селекции. Содержание кальция при показателе 3,2 ммоль/л (животные импортной селекции) было ниже на 0,67 ммоль/л, или на 17,3 %, по сравнению с группой маток отечественной селекции. Уровень фосфора и железа в крови подопытных животных был в пределах от 1,91 до 2,0 ммоль/л и от 11,08 до 12,76 мкмоль/л.

Полученные результаты по биохимическим показателям крови животных абердин-ангусской породы отечественной и венгерской селекции указывают на успешную адаптацию импортных животных к природно-климатическим и хозяйственным условиям зоны пойменного земледелия Припятского Полесья.

#### Литература

1. Чернов, Г. А. Акклиматизация абердин-ангусского скота в СССР / Г. А. Чернов // Проблемы мясного скотоводства : сб. науч. тр. / ВНИИМС. – Оренбург, 1972. – С. 138-143.
2. Зелепухин, А. Г. Мясное скотоводство / А. Г. Зелепухин, В. И. Левахин. – Оренбург : ОГУ, 2000. – 350 с.
3. Козырь, В. С. Мясные породы скота в Украине / В. С. Козырь, Н. И. Соловьев. – Днепрпетровск : ЗАТ «Поліграфіст», 1997. – 325 с.
4. Козырь, В. С. Адаптация мясного скота в степной зоне Украины / В. С. Козырь // Зоотехния. – 2005. - № 5. – С. 22-26.
5. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных : справ. пособие / А. П. Калашников [и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – М., 2003. – 426 с.
6. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Мн. : Вышэйшая школа, 1967. – 326 с.

Поступила 20.03.2014 г.

УДК 636.2.034.612.602

В.П. СИМОНЕНКО, А.И. ГАНДЖА, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ,  
И.В. КИРИЛЛОВА, О.П. КУРАК, Н.В. ЖУРИНА, М.А. КОВАЛЬЧУК  
Л.В. ГЛУЩЕНКО

### **ВЛИЯНИЕ СУРФАГОНА И ТИМЭСТРОФАНА НА ВЫХОД ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ ВНЕ ОРГАНИЗМА**

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

В результате исследований разработан усовершенствованный состав питательных сред для созревания ооцитов и культивирования ранних зародышей с использованием

сурфагона и тимэстрофана, обеспечивающий уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II 78,4-94,1%, при уровне дробления – 39,7-47,6% и выходе преимплантационных эмбрионов – 13,5-19,1 %.

**Ключевые слова:** ооцит-кумулосный комплекс, вне организма, сурфагон, тимэстрофан, оплодотворение, созревание, зародыш, эмбрион.

V.P. SIMONENKO, A.I. GANDZHA, L.L. LETKEVICH, I.V. KIRILLOVA, O.P. KURAK,  
N.V. ZHURINA, M.A. KOVALCHUK

## **SURFAGON AND TIMESTROPHAN EFFECT ON OUTCOME OF PREIMPLANTATION EMBRYOS IN VITRO**

RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences  
of Belarus on Animal husbandry»

As a result of research an improved nutrients media for maturation of oocyte and cultivation of early embryos using surfagon and timestrophan was developed, providing the level of oocyte maturation to the stage of metaphase II of 78,4-94,1 %, at the level of cleavage – 39,7-47,6 % and output of preimplantation embryos – 13,5-19,1 %.

**Keywords:** oocyte-cumulus complex, in vitro, surfagon, timestrophan, fertilization, maturation, embryo.

**Введение.** Известно, что созревание фолликулов и ооцитов в яичниках млекопитающих находится под контролем многочисленных гормонов, поступающих в них из кровеносной системы или синтезируемых в яичниках [1]. Гормоны гипофиза и гипоталамуса являются главными регуляторами овариальной функции. Нейронами гипоталамуса секретируется гонадотропин-релизинг гормон (Гн-РГ), регулирующий выделение фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) передней долей гипофиза. ФСГ переносится кровью к мишени – яичникам, где, взаимодействуя с рецепторами премордиальных фолликулов, индуцирует их развитие. Клетки гранулезы развивающегося фолликула начинают вырабатывать эстроген, который поддерживает рост фолликула и стимулирует пролиферацию клеток эндометрия, повышая их чувствительность к прогестерону. По принципу отрицательной обратной связи эстроген подавляет секрецию ФСГ, тем самым препятствуя развитию других фолликулов. По мере роста фолликула увеличивается секреция им эстрогена, содержание эстрогена в крови достигает максимума, это запускает секрецию лютеинизирующего гормона (ЛГ) (обратный позитивный эффект). В результате воздействия ЛГ на яичник происходит овуляция. Однако созревание ядра ооцита включает в себя и морфологические изменения. Одно из первых по времени изменений касается ядрышка: оно теряет волокнистый характер, конденсируется и к моменту распада ядерной мембраны исчезает вообще. В момент овуляции временно исчезают ворсинки и сокращаются отростки фолликулярных клеток [2]. Однако, несмотря на высокий процент созревания ядра, полученный в культуре, ряд яйцеклеток не оплодо-

творяются из-за отсутствия цитоплазматического созревания.

Известно, что гонадотропные гормоны положительно влияют на жизнеспособность ооцитов, а также способность клеток к оплодотворению и полноценному развитию, однако практически отсутствуют сведения об эффективности использования синтетических аналогов гонадотропин-рилизинг гормонов, в частности сурфагона, при получении эмбрионов *in vitro*. При введении в организм сурфагон – синтетический нанапептид, аналог гонадотропин-рилизинг гормона ЛГ-РГ-люлиберина – стимулирует выделение гонадотропинов гипофиза в кровь максимум через 2-3 часа после введения. В отличие от естественного люлиберина биологическая активность сурфагона в 50 раз выше, что позволяет использовать этот препарат в микродозах и краткими курсами. Сурфагон более медленно, чем естественный люлиберин, разрушается под действием ферментов, что и обеспечивает его более сильное биологическое действие на гонадотропную функцию гипофиза.

Установлено, что концентрация простагландина  $F_2\alpha$  значительно выше в преовуляторных фолликулах, чем в остальных фолликулах, но различия в активности коллагеназы обнаружено не было. Самые высокие концентрации простагландинов были найдены в тех фолликулах, яйцеклетки которых в последствие дали начало наиболее жизнеспособным зародышам. Главным источником простагландинов является клетки гранулезы.

В связи с вышесказанным, целью работы являлось усовершенствование состава питательных сред для получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*

**Материал и методика исследований.** Исследования выполнены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Яичники получали на Минском и Борисовском мясокомбинатах и в убойном цехе ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области после убоя животного путем отсекаания от матки с помощью ножниц. Доставляли материал в лабораторию в стерильном солевом растворе Хенкса с добавлением 200 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина в бытовом термосе. Перед извлечением яйцеклеток из яичников их дважды промывали раствором Хенкса с добавлением антибиотиков. Извлечение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичников лезвием безопасной бритвы в растворе Хенкса в чашке Петри с добавлением 10 ед./мл гентамицина, 1 ед./мл гепарина и 1% инактивированной фетальной сыворотки. После выделения ооцитов их поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-

кумулясных комплексов осуществляли по разработанной нами 5-бальной шкале под бинокулярным микроскопом МБС-10 при 16- и 56-кратном увеличении.

Для дальнейшей работы отбирали клетки с многослойным компактным или слегка разрыхлённым кумулюсом, плотно прилегающим к зоне пеллюцида, мелкозернистой или имеющей небольшие участки гранулярной конденсации ооплазмы, равномерно заполняющей прозрачную оболочку, которая равномерна по толщине, не имеет никаких дефектов, округлая по форме.

Ооцит-кумулясные комплексы помещали в лунки планшета со средой для созревания на основе ТС-199 [Sigma] с добавлением синтетического аналога гонадотропин-релизинг гормона сурфагона в дозах 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 нг/мл и синтетического аналога простагландина  $F_2\alpha$  тимэстрофана в количестве 25, 50, 100 мкг/мл в  $CO_2$ -инкубатор на 24 часа. В качестве контроля использовали среду ТС-199 с добавлением 20%-ной фетальной сыворотки теленка. Созревшие ооциты оплодотворяли, замороженно-оттаянной спермой, которую помещали в пробирку с 1 мл питательной среды и оставляли в термостате на 1 час. В качестве питательных сред для капацитации использовали разработанную нами питательную среду на основе Тироде [Sigma]. Надосадочную жидкость удаляли, помещали в другую пробирку, добавляли 1 мл среды для капацитации и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин. Верхний слой жидкости удаляли, осадок дважды отмывали средой для капацитации методом центрифугирования при 3000 об./мин, причем при втором отмывании в среду добавляли гепарин. Затем сперму отмывали дважды в среде для оплодотворения и в количестве  $1 \times 10^6$  сперматозоидов в 1 мл добавляли к ооцитам, находящимся к этому времени в этой же среде. Помещали в  $CO_2$ -инкубатор на 18 часов для оплодотворения.

После процесса оплодотворения ооцит-кумулясные комплексы отмывали от среды для оплодотворения и помещали в среду для культивирования ранних зародышей, куда вводили сурфагон и тимэстрофан.

Синтетический аналог гонадотропин-релизинг гормона сурфагон вводили в дозах 0,02, и 0,04 нг/мл и синтетический аналог простагландина  $F_2\alpha$  тимэстрофан в количестве 25 и 50 мкг/мл при различных режимах их введения:

- сурфагон и тимэстрофан вводили в состав питательной среды в опытных дозах сразу после окончания процесса оплодотворения;
- введение тимэстрофана проводили в два этапа, т. е. 25 мкг/мл сразу после оплодотворения и 25 мкг/мл на стадии дробления 8-16 клеток;
- комплексное введение сурфагона и тимэстрофана в двух вариан-

тах:

– 0,02 нг/мл сурфагона сразу после окончания процесса оплодотворения и 50 мкг/мл тимэстрофана на 8-16-клеточной стадии дробления;

– 0,02 нг/мл сурфагона и 25 мкг/мл тимэстрофана сразу после оплодотворения + 25 мкг/мл тимэстрофана на стадии дробления 8-16 клеток.

Эффективность созревания и оплодотворения ооцит-кумулюсных комплексов определяли по количеству и качеству созревших ооцитов, уровню дробления и выходу морул-бластоцист.

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** В естественном половом цикле при созревании ооцитов до стадии оплодотворения решающую роль играют гонадотропин-релизинг гормоны, способствующие выделению гормонов, в том числе фолликулостимулирующего и лютеинизирующего. При стимулировании множественной овуляции для трансплантации эмбрионов эти препараты применяются с целью вызывания дружной овуляции ооцитов.

По результатам исследований установлено, что добавление в среду для созревания сурфагона привело к увеличению числа ооцитов созревших до стадии метафаза II (таблица 1). Так, при добавлении сурфагона в концентрации 0,06 нг/мл этот показатель составил 86,5 %, при концентрации 0,04 нг/мл – 88,5 %, при 0,01 нг/мл – 89,7 %. При добавлении сурфагона в оптимальной дозе 0,02 нг/мл были получены наилучшие результаты. Этот показатель составил 90,5 %, что на 7,8 % превышает контрольный показатель. Введение в состав среды для созревания ооцитов тимэстрофана показало не однозначные показатели. Так, при концентрации тимэстрофана 25 мкг/мл уровень созревания составил 78,4 %, что на 4,3 % ниже, чем в контрольной группе, а при концентрации 50 мкг/мл этот показатель составлял 90,1 %, что на 7,4% превышал контрольный. Наилучшие результаты по уровню созревания ооцитов до стадии метафаза II были получены при комплексном введении сурфагона в концентрации 0,02 нг/мл и тимэстрофана в концентрации 50 мкг/мл, который составил 94,1 %, что на 11,4 % превышал показатель контрольной группы. При анализе показателей уровня дробления в опытных группах с использованием синтетического аналога гонадотропин-релизинг гормона (сурфагона) было отмечено следующее. Так, при увеличении концентрации сурфагона от 0,01 до 0,04 нг/мл уровень дробления увеличивался от 43,7 до 46,2 %, что превышало контрольный показатель на 1,0-3,5 %, соответственно. Однако при увеличении концентрации сурфагона до 0,06 нг/мл уровень дробления снижался до 41,9 %, что на 0,8 % ниже контроля.

Таблица 1 – Результаты созревания ооцитов при включении в среду сурфагона и тимэстрофана

Среда для созревания ооцитов	Поставлено на культивирование, n	Созрело до метафазы II, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-VI, n-%
ТС-199 + 0,01 нг/мл сурфагона	87	78-89,7	38-43,7	13-14,9
ТС-199 + 0,02 нг/мл сурфагона	84	76-90,5	38-45,2	15-17,9
ТС-199 + 0,04 нг/мл сурфагона	78	69-88,5	36-46,2	13-16,7
ТС-199 + 0,06 нг/мл сурфагона	74	64-86,5	31-41,9	10-13,5
ТС-199 + 25 мкг/мл тиэстрофана	88	69-78,4	37-42,1	13-14,8
ТС-199 + 50 мкг/мл тиэстрофана	81	73-90,1	36-44,4	14-17,3
ТС-199 + 100 мкг/мл тиэстрофана	77	65-84,4	33-42,8	12-15,6
ТС-199 + 0,02 нг/мл сурфагона + 50 мкг/мл тиэстрофана	84	79-94,1	40-47,6	16-19,1
ТС-199 (контроль)	75	62-82,7	32-42,7	11-14,7

Аналогичная тенденция наблюдалась и по выходу морул-бластоцист, т. е. при введении сурфагона в среду для созревания ооцитов в концентрации 0,06 нг/мл этот показатель был ниже, чем в контрольной группе на 1,2 %, а снижение выхода жизнеспособных эмбрионов наблюдалась уже при концентрации сурфагона 0,04 нг/мл. В экспериментах с участием тимэстрофана выявлена оптимальная доза введения, которая составляет 50 мкг/мл. Так, при такой концентрации выход преимплантационных эмбрионов составил 17,3 % при уровне дробления 44,4 %, что превышает контрольный показатель на 2,6 и 1,7%, соответственно. При использовании тимэстрофана в концентрации 25 мкг/мл уровень дробления был на 0,6 % ниже, чем в контрольной группе, а при концентрации 100 мкг/мл был практически на уровне контроля и составлял 42,8 %.

Выход жизнеспособных эмбрионов при концентрации тимэстрофана 25 мкг/мл был также на уровне с контролем. Разница составила всего 0,1 % в сторону опытной группы. При использовании тимэстрофана

в концентрации 100 мкг/мл разница по выходу морул-бластоцист составила 0,9 %. Также наилучшие результаты по уровню дробления и выходу преимплантационных эмбрионов были получены при совместном использовании сурфагона в концентрации 0,02 нг/мл и тимэстрофана в концентрации 50 мкг/мл. Так, в данном случае уровень дробления составил 47,6 %, что на 4,9 % выше контроля, а выход жизнеспособных зародышей составил 19,1 %, что на 4,4 % выше контрольной группы.

Таким образом, использование среды для созревания ооцитов с добавлением сурфагона в дозе 0,02 нг/мл позволяет достигнуть уровня созревания яйцеклеток до стадии метафаза II – 90,5 %, при этом уровень дробления составляет 45,2 %, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке, – 17,9 %. При добавлении тимэстрофана в оптимальной дозе 50 мкг/мл уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II составил 90,1 %, уровень дробления – 44,4 % и выход преимплантационных эмбрионов – 17,3 %, однако комплексное использование сурфагона и тимэстрофана позволяет повысить уровень созревших до стадии метафаза II до 94,1 %, уровень дробления – до 47,6 %, а выход морул-бластоцист – до 19,1 %.

По результатам разработки режимов введения сурфагона и тимэстрофана в среду для культивирования ранних зародышей установлено, что однократное добавление сразу после окончания процесса оплодотворения сурфагона в концентрации 0,02 нг/мл привело к увеличению уровня дробления в сравнении с контролем на 8,8 %, а выхода Мо-В1 – на 0,2 % (таблица 2).

При увеличении концентрации сурфагона до 0,04 нг/мл уровень дробления повышался до 43,8 %, что на 9,9 % выше контрольной группы, а выход преимплантационных эмбрионов снизился на 0,7 %.

В серии опытов при введении в состав среды для культивирования ранних зародышей тимэстрофана в опытных концентрациях получены следующие результаты. Так, при однократном введении тимэстрофана в концентрации 25 мкг/мл уровень дробления составил 44,4 %, а выход морул-бластоцист – 14,8 %, что на 10,5 и 0,3 % выше контрольных показателей, а при концентрации 50 мкг/мл эти показатели составили 39,7 и 15,5 %, что также выше контроля на 5,8 и 1,0 %, соответственно. В исследованиях по двукратному введению тимэстрофана в состав опытной среды получены результаты, показывающие его положительное влияние. Так, при введении тимэстрофана первый раз сразу после окончания процесса оплодотворения и второй – на 8-16 стадии дробления клеток в дозе по 25 мкг/мл дробящихся зародышей получено 45,2 %, а выход преимплантационных эмбрионов составил 17,9 %, что на 11,3 и 3,4 % выше контрольных показателей.

Таблица 2 – Режимы введения в культуральную среду сурфагона и тимэстрофана

Среда для культивирования ранних зародышей	Поставлено на культивирование, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-В1, n-%
ТС-199 + 0,02 нг/мл сурфагона (после оплодотворения)	75	32-42,7	11-14,7
ТС-199 + 0,04 нг/мл сурфагона (после оплодотворения)	80	35-43,8	11-13,8
ТС-199 + 25 мкг/мл тимэстрофана (после оплодотворения)	27	12-44,4	4-14,8
ТС-199 + 50 мкг/мл тимэстрофана (после оплодотворения)	58	23-39,7	9-15,5
ТС-199 + 25 мкг/мл тимэстрофана (после оплодотворения) + 25 мкг/мл тимэстрофана (на стадии 8-16 кл.)	84	38-45,2	15-17,9
ТС-199 + 0,02 нг/мл сурфагона (после оплодотворения) + 50 мкг/мл тимэстрофана (на стадии 8-16 кл.)	48	16-41,1	8-16,7
ТС-199 + 0,02 нг/мл сурфагона + 25 мкг/мл тимэстрофана (после оплодотворения) + 25 мкг/мл тимэстрофана (на стадии 8-16 кл.)	54	23-42,6	10-18,5
ТС-199 (контроль)	62	21-33,9	9-14,5

**Заключение.** Использование среды для созревания ооцитов с добавлением сурфагона в дозе 0,02 нг/мл позволяет достигнуть уровня созревания яйцеклеток до стадии метафаза II – 90,5 %, при этом уровень дробления составляет 45,2 %, а выход эмбрионов, пригодных к пересадке, – 17,9 %. При добавлении тимэстрофана в оптимальной дозе 50 мкг/мл уровень созревания яйцеклеток до стадии метафаза II составил 90,1 %, уровень дробления – 44,4 % и выход преимплантационных эмбрионов – 17,3 %, однако комплексное использование сурфагона и тимэстрофана позволяет повысить уровень созревших до стадии метафаза II до 94,1 %, уровень дробления – до 47,6 %, а выход морул-бластоцист – до 19,1 %. Использование среды для культивирования ранних зародышей с добавлением сурфагона в дозе 0,02 нг/мл позволяет достигнуть уровня дробления 42,7 %, а выхода эмбрионов, при-

годных к пересадке, – 14,7 %. При добавлении тимэстрофана в оптимальной дозе 50 мкг/мл уровень дробления составил 39,7 % и выход преимплантационных эмбрионов – 15,5 %, однако комплексное использование сурфагона в концентрации 0,02 нг/мл и тимэстрофана в концентрации 25 мкг/мл сразу после завершения процесса оплодотворения, а также 25 мкг/мл тимэстрофана на 8-16-клеточной стадии дробления показало выход Мо-В1 на уровне 18,5 % при уровне дробления 42,6 %.

#### **Литература**

1. Лебедева, И. Ю. Участие клеток гранулезы в опосредовании действия пролактина и соматотропина на ооцит-кумулосные комплексы коров *in vitro* / И. Ю. Лебедева, Т. В. Кибардина, Т. И. Кузьмина // Цитология. – 2005. - № 10. – С. 882-887.

2. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки : в 5-ти т. Т. 1 / Б. Албертс [и др.]. – М. : Мир, 1987. – 231 с.

Поступила 11.03.2014 г.

УДК 636.122.082.4:591.463.1:575.116.4 (477)

О.Л. ТКАЧЁВА, Л.Т. ДОБРОДЕЕВА, Л.В. РОССОХА,  
В.И. РОССОХА, А.В. ТКАЧЁВ

## **ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЖЕРЕБЦОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЗАВОДСКИХ ПОРОД УКРАИНЫ**

Институт животноводства НААН Украины

В статье представлены данные сравнительного анализа жеребцов-производителей заводских пород по цитогенетическим и биотехнологическим показателям. При повышенном уровне общей хромосомной нестабильности у жеребцов украинской верховой и чистокровной верховой пород в 6,45 и 6,08 %, биотехнологическая пригодность их спермы составила, соответственно, 60,87 и 67,86 %. При повышении допустимого уровня общей хромосомной нестабильности у жеребцов траккененской породы на 0,91 % биотехнологическая пригодность их спермы составила 72,73 % при ухудшении показателей спермы после оттаивания. При повышенном уровне хромосомной нестабильности жеребцов-производителей заводских пород Украины ухудшаются количественные и качественные показатели спермы после деконсервации. Предлагается проводить цитогенетическую оценку лошадей по структурным абберациям для повышения эффективности их племенного использования на Украине.

**Ключевые слова:** цитогенетическая и биотехнологическая оценка, хромосомная нестабильность, сперма, жеребцы, заводские породы.