

государственный аграрный университет имени В.Я. Горина. – пос. Майский, 2019. – Т. 2. – С. 118–119. 10. Муравьева, Н. А. Показатели молочной продуктивности коров разных пород в зависимости от их живой массы / Н. А. Муравьева, А. С. Бушкарева, Е. А. Пивоварова // Вестник АПК Верхневолжья. – 2020. – № 2. – С. 62–65. 11. Организационно-технологические требования при производстве молока на молочных комплексах промышленного типа [Электронный ресурс] : одобрено коллегией Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь : Постановление от 4 июня 2018 г., № 16. – Режим доступа : http://www.mshp.gov.by/documents/animal/trebovaniya_toloko.pdf. – Дата доступа : 21.03.2021. 12. Разумовский, Н. П. Эффективность стойлово-пастбищного содержания дойных коров в условиях молочно-товарного комплекса / Н. П. Разумовский, Л. А. Возмитель // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2020. – Т. 56, вып. 3. – С. 95–98. 13. Совершенствование отдельных элементов балансовой кластеризации молочного скотоводства в условиях промышленных технологий / М. В. Базылев [и др.] // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сборник научных трудов. – Гродно, 2016. – Т. 34, вып. 15. – С. 3–12. 14. Совершенствование технологических процессов производства молока на комплексах : монография / Н. С. Мотузко [и др.]. – Минск : Техноперспектива, 2013. – 483 с. 15. Суровцев, В. Н. Адаптация и развитие производителей молока в новых экономических условиях / В. Н. Суровцев, Е. Н. Паюрова // Молочное и мясное скотоводство. – 2020. – № 6. – С. 3–7. 16. Теоретическое и практическое обеспечение высокой продуктивности коров : практическое пособие. Ч. 1. Технологическое обеспечение высокой продуктивности коров / А. И. Ятусевич [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич. – Витебск : ВГАВМ, 2015. – 356 с. 17. Технологические рекомендации по организации производства молока на новых и реконструируемых молочно-товарных фермах : монография / Н. А. Попков [и др.]. – Жодино : РУП НПЦ НАА Беларуси по животноводству, 2018. – 138 с. 18. Improving milk safety at farm-level in an intensive dairy production system: relevance to smallholder dairy producers / L. D. Habtamu [et al.] // Food Quality and Safety. – 2018. – Vol. 2, iss. 3. – P. 135–143.

Поступила в редакцию 27.04.2021.

DOI 10.52368/2078-0109-2021-57-2-87-91

УДК 636.2.612.64.089.67

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДОНОРОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА IN VITRO В СИСТЕМЕ ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ АСПИРАЦИИ ООЦИТОВ (ТАО)

Голубец Л.В.

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь

В представленной работе приведены результаты исследований по изучению эффективности различных режимов ТАО при получении эмбрионов в культуре *in vitro*. Пункцию фолликулов проводили два и четыре раза в месяц с недельным перерывом после аспираций, четыре и восемь раз в месяц без перерыва, а также строго регулярно каждые три и семь дней. Как показал анализ полученных результатов, проведение процедуры аспирации в режиме строго через каждые семь дней снижало количество аспирированных фолликулов по сравнению с другими группами доноров на 4,2-12,8%, но в то же время повышало общий выход ооцитов на 7,9-16,1 п.п. Выход ооцитов пригодных для культивирования, оказался выше на 5,5-13,5 п.п. при проведении аспирации один раз в неделю через неделю (два раза в месяц) и составил 84,9%. Выход эмбрионов от числа оплодотворенных яйцеклеток оказался более высоким при проведении аспираций два раза в неделю через неделю (четыре раза в месяц с недельным перерывом) и составил 32,5% против 20,0-25,0% в других группах животных. **Ключевые слова:** ооциты, эмбрионы, аспирация, частота, фолликулы, пункция, культивирование, яйцеклетка, оплодотворение, дробление.

EFFICIENCY OF DIFFERENT MODES OF USING DONORS IN OBTAINING CATTLE EMBRYOS IN VITRO IN THE SYSTEM OF TRANSVAGINAL ASPIRATION OF OOCYTES (TAO)

Golubets L.V.

Grodno State Agrarian University, Grodno, Republic of Belarus

In the present paper the results are given of studies on the effectiveness of various TAO modes in obtaining embryos in culture *in vitro*. Follicle puncture was performed two and four times a month with a week break after aspiration, four and eight times a month without interruption, and also strictly regularly every three and seven days. As the analysis of the obtained results shows, performing the aspiration procedure strictly every seven days reduced the number of aspirated follicles in comparison with other donor groups by 4.2-12.8%, but at the same time increased the total oocyte yield by 7.9-16.1 pp. The yield of oocytes suitable for cultivation was 5.5-13.5 pp higher when performing aspiration once every other week (twice a month) and amounted to 84.9%. The yield of embryos from the number of fertilized eggs was higher when aspirated twice a week every other week (four times a month with a weekly break) and amounted to 32.5% versus 20.0-25.0% in other groups of animals. **Keywords:** oocytes, embryos, aspiration, frequency, follicles, puncture, cultivation, egg cell, fertilization, cleavage.

Введение. Одним из наиболее прогрессивных и экономически выгодных методов развития молочного скотоводства и повышения его рентабельности, признанным во всем мире, в настоящее время является трансплантация эмбрионов, полученных как *in vivo* (путем вызывания множественной овуляции) так и *in vitro* (оплодотворение ооцитов вне организма матери). Трансплантация эмбрионов направлена на совершенствование генетического потенциала стада путем ускоренного воспроизводства высокопродуктивных и ценных в генетическом отношении животных, что открывает огромные возможности в разведении и воспроизводстве крупного рогатого скота как с целью повышения эффективности племенной работы, так и увеличения в короткие сроки средней продуктивности стада [1, 3, 7]. Значение трансплантации эмбрионов значительно возросло с разработкой и внедрением в практику племенной работы геномной селекции. Особую позицию в этом отношении занимает сегодня технология получения и трансплантации эмбрионов, полученных в искусственных условиях, основанной принципом которой заключается в том, что полученные из яичников доноров ооциты дозревают до стадии оплодотворения и оплодотворяются в условиях лаборатории. Полученные зиготы растут и развиваются до предимплантационных эмбрионов в условиях инкубатора, после чего могут быть пересажены реципиентам или заморожены и помещены в криобанк для хранения [7]. Создание новых и совершенствование существующих пород, ускоренное размножение ценных в племенном отношении животных, сохранение генетических ресурсов производства экологически чистых лекарственных средств позволяет упростить и повысить эффективность международной кооперации по обмену и торговле генетическими ресурсами. В отличие от традиционной трансплантации технология *in vitro* исключает гормональную стимуляцию, дает возможность использования животных с нарушением воспроизводительных функций, не связанных с яичниками [10], получать эмбрионы от животных уже после убоя на мясокомбинате, используя их яичники [9, 11], использовать животных на ранних стадиях стельности, что позволяет получить большее количество стельностей в пересчете на годовую эмбриопродуктивность за счет более высокой интенсивности использования доноров. Так, если при получении эмбрионов *in vivo* количество извлечений за год не может превышать 5-6, и при этом можно получить в среднем 25-30 эмбрионов, то аспирацию ооцитов можно проводить до двух раз в неделю. Но даже при аспирации раз в неделю и получении при этом на одну аспирацию 1,5-2,0 эмбриона, годовая продуктивность может составить 75-100 зародышей. Следовательно, одним из факторов, имеющим немаловажное значение и оказывающим влияние на конечный результат эффективности технологии, является режим использования доноров [2, 4, 5, 6, 8], что и определило цель наших исследований.

Целью исследований явилось изучение влияния интенсивности использования доноров на эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro*.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в отраслевой биотехнологической лаборатории по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет» и в селекционно-генетическом центре ООО «Бетагран-Липецк» РФ. Ооциты получали путем трансвагинальной пункции фолликулов с использованием ультразвуковой системы AlokaSSD 500, включающей в себя ультразвуковой сканер Aloka Prosound 2, ультразвуковой излучатель с частотой 7.5MHz, вакуумную помпу Craft suction unit, держатель ультразвукового излучателя и иглы длиной 55 см и диаметром 18. Животных аспирировали по следующему графику: один раз в неделю через неделю (два раза в месяц с недельным отдыхом после каждой аспирации), один раз в неделю (четыре раза в месяц), два раза в неделю через неделю (четыре раза в месяц с недельным отдыхом), два раза в неделю (восемь раз в месяц), а также каждые три дня и каждые семь дней. В качестве промывной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 50 мкг/мл гентамицина и 0,5% эстральной сыворотки. Локализацию ооцит-кумулясных комплексов проводили с помощью фильтровальной системы EmSafe. Поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под стереоскопическим бинокулярным микроскопом Olympus SZ51 при 16- и 90-кратным увеличением. Пригодные для созревания ооцит-кумулясные комплексы помещали в культуральную среду созревания и помещали в CO₂ инкубатор «Membert» при температуре 38,7°C с максимальной влажностью 96-98% и уровнем углекислого газа 5%.

Оплодотворение проводили замороженно-оттаянной спермой в концентрации 1×10^6 /мл. Капацитацию спермы проводили с использованием градиента плотности Перколл. Совместная инкубация продолжалась в течение 18-20 часов при температуре 38,7°C, максимальной влажности и в присутствии 5% CO₂ в атмосфере. После завершения инкубации предположительные зиготы отмывались от спермы в среде для культивирования ранних зародышей и помещались в CO₂ инкубатор на 7-9 дней, до получения эмбрионов на предимплантационных стадиях развития.

Питательные среды для созревания, капацитации и оплодотворения были приготовлены по нашим методикам на основе реактивов фирмы Sigma.

Биометрическую обработку полученного цифрового материала проводили общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты исследований. В таблице 1 представлены результаты исследований по изучению эффективности различных режимов использования доноров при трансвагинальной аспирации ооцитов. Как показывает анализ представленных в таблице данных количество аспирированных фолликулов при аспирации один или два раза в неделю оказалось выше по сравнению с аспирацией один и два раза в неделю через неделю т.е. с недельным отдыхом после аспираций на 8,3 и 8,4%, соответственно. При регулярной аспирации каждые семь дней данный показатель снижался по сравнению с другими режимами использования на 4,4-14,7%, но в то же время повышался общий выход ооцитов от числа аспирированных фолликулов на 16,1 п.п. по сравнению с пункцией фолликулов один раз в неделю через неделю, на 15,4 п.п. при аспирации каждую неделю, на 11,6 п.п. – два раза в неделю через неделю, на 7,9 п.п.– дважды в неделю и на 8.9п.п. – при регулярных процедурах каждые три дня. По выходу ооцитов пригодных для дальнейшего культивирования более успешными были аспирации, проведенные один раз в неделю через неделю. Данный показатель составил 84,9%, что на 5,5-13,5 п.п. выше по сравнению с другими графиками использования. По уровню дробления (количество дробящихся зародышей от числа оплодотворенных яйцеклеток) какой-либо закономерности не отмечено. Его величина колебалась в пределах 60,0-72,7%. При этом следует отметить, что более высокие результаты получены при аспирациях два раза в неделю через неделю (75,0%), а также при регулярных аспирациях каждые три и семь дней - 70,4% и 72,7%, соответственно. При проведении пункции фолликулов два раза в неделю через неделю получен лучший результат по выходу эмбрионов на предимплантационных стадиях – 32,5% от числа оплодотворенных яйцеклеток. Данный показатель в этой группе животных превысил аналогичный показатель других групп на 7,5-12,5 п.п.

Заключение 1. Проведение процедуры трансвагинальной аспирации в режиме один или два раза в неделю позволило повысить количество аспирированных фолликулов на 8,3 и 8,4%, соответственно, в то время как регулярные аспирации каждые семь дней снижали данный показатель по сравнению с другими группами на 8,3 и 8,4%, соответственно.

2. Отмечается более высокий общий выход ооцитов от числа аспирированных фолликулов при регулярных аспирациях каждые семь дней – 89,7%, что на 7,9-16,1 п.п. выше по сравнению с другими группами животных. В то время как выход жизнеспособных ооцитов оказался выше при проведении аспирации один раз в неделю через неделю на 5,5-13,5 п.п. по сравнению с другими режимами использования и составил 84,9%.

3. По выходу эмбрионов более успешным оказалось проведение аспираций два раза в неделю через неделю. В этом случае было получено 32,5% зародышей от числа оплодотворенных яйцеклеток, в то время как в других группах животных данный показатель колебался в пределах 20,0-25,0%.

Таблица 1 - Эффективность различных режимов трансвагинальной аспирации ооцитов*

Периодичность аспираций	Количество аспираций	Аспираторовано фолликулов	Получено ОКК		Оплодотворено ОКК	Количество дробящихся зародышей	Выход эмбрионов				Всего
			всего	пригодных			день цикла			10	
							7	8	9		
1 раз в неделю через неделю	40	7,2±0,84	5,3±0,76	4,5±0,72	4,5±0,72	3,1±0,44	0,7±0,11	0,1±0,05	0,1±0,04	1,0±0,15	
1 раз в неделю	40	7,8±0,76	5,8±0,64	4,5±0,59	4,5±0,58	2,7±0,35	0,3±0,09	0,4±0,11	-	0,9±0,14	
2 раза в неделю через неделю	40	7,1±0,72	5,6±0,61	4,0±0,49	4,0±0,49	3,0±0,38	0,7±0,14	0,2±0,10	0,1±0,04	1,3±0,24	
2 раза в неделю	40	7,7±0,80	6,3±0,68	5,0±0,56	4,9±0,56	3,3±0,39	0,7±0,13	0,2±0,07	-	1,2±0,17	
ждые три дня	137	7,3±0,33	5,9±0,30	4,5±0,26	4,4±0,25	3,1±0,18	0,5±0,06	0,3±0,05	-	0,9±0,08	
каждые семь дней	180	6,8±0,35	6,1±0,33	4,5±0,27	4,4±0,27	3,2±0,20	0,7±0,07	0,2±0,04	-	1,1±0,10	

*Примечание. Все показатели приведены в пересчете на одну аспирацию.

Литература. 1. *Инновационные технологии в разведении и селекции племенного скота : монография / Л. В. Голубец [и др.]. – Гродно : ГГАУ, 2019. – 430 с.* 2. Aerts, J. M. J. *Development and practical applications of a method for repeated transvaginal, ultrasound-guided biopsy collection of the bovine ovary / J. M. J. Aerts, M. Oste, P. E. J. Bols // Theriogenology. – 2005. – P. 947–951.* 3. *Factors influencing in vitro embryo production / LSA Camargo [et al.] // Anim Reprod. – 2006. – Vol. 3 (1). – P. 19–2817.* 4. *Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos / G. X. Dieleman [et al.] // Mol Reprod Dev. – 2008. – Dec., 75(12). – P. 1710–1715.* 5. *Effects of ovum pick-up frequency and fsh stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production / R. De Roover [et al.] // Reproduction in Domestic Animals. – 2008. – Vol. 43, № 2. – P. 239–245.* 6. *Effects of onceversus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryodevelopment / J. R. Gibbons // Theriogenology. – 1994. – P. 206.* 7. Gordon, Ian. *Laboratory Production of Cattle Embryos / Ian Gordon ; CAB International. – Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK, 1994. – 672 p.* 4. 8. *Effect of the frequency of ovum pick-up intervals on follicle number, oocyte recovery and embryo production rates in cattle Theriogenology / K. Imai [et al.]. – 2000. – 359 p.* 9. Katska, L. *Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle / L. Katska // Anim Reprod Sci. – 1984a. – P. 461–463.* 10. *Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows / C. R. Looney // Theriogenology. – 1994. – P. 67–72.* 11. *In vitro fertilization and subsequent derived from abattoir ovaries follicle aspiration embryo development using oocytes or collected by transvaginal in water buffalo / X. F. Zhang // Anim. Husb. and Vet. Med. – 2007. – Vol. 39 (11). – P. 15–17.*

Поступила в редакцию 07.04.2021.

DOI 10.52368/2078-0109-2021-57-2-91-96

УДК 636.2.612.64.089.67

ВЛИЯНИЕ ДОНОРА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Голубец Л.В.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

В процессе исследований изучалось влияние индивидуальных особенностей доноров на эффективность аспираций и получение эмбрионов в культуре *in vitro*. По результатам исследований не установлено какой-либо закономерности по эффективности аспираций и получению эмбрионов в культуре *in vitro* в зависимости от их количества. Так, число аспирированных фолликулов, в зависимости от донора, колебалось в пределах от 3,7 до 8,2, выход жизнеспособных ооцитов – от 55,1% до 96,4%, уровень дробления – от 41,7% до 95,1%, выход эмбрионов – от 2,1% до 32,4%. Отмечается тенденция увеличения средних показателей эффективности по мере возрастания порядкового номера аспирации. Так, средний выход ооцитов при возрастании количества аспираций с одной до девяти составил, в зависимости от донора, 2,3-4,8, а выход эмбрионов – 0,1-0,7, при возрастании количества аспираций с 11 до 14 – 2,4-5,3 и 0,3-0,7 и при возрастании количества аспираций с 15 до 22 – 3,9-9,7 и 0,6-1,8 соответственно. **Ключевые слова:** эмбрион, фолликулы, яйцеклетка, аспирация, донор, культивирование, порядковый номер, дробление, *in vitro*.

INFLUENCE OF DONORS ON THE EFFICIENCY OF OBTAINING EMBRYOS IN CULTURE IN VITRO

Golubets L.V.

Grodno State Agrarian University, Grodno, Republic of Belarus

*In the process of research the influence of individual characteristics of donors on the efficiency of aspiration and obtaining embryos in culture in vitro was studied. As a result no regularity has been established for the effectiveness of aspiration and obtaining embryos in culture in vitro depending on their number. Thus, the number of aspirated follicles, depending on the donor, ranged from 3.7 to 8.2, the yield of viable oocytes from 55.1% to 96.4%, the level of cleavage from 41.7% to 95.1%, and the yield of embryos from 2.1% to 32.4%. There is a tendency for the average efficiency indicators to be increased as the aspiration serial number increases. Thus, the average yield of oocytes with an increase in the number of aspirations from one to nine was, depending on the donor, 2.3-4.8, and the yield of embryos was 0.1-0.7, with an increase in the number of aspirations from 11 to 14, -2.4-5.3 and 0.3 -0.7 and with an increase in number of aspirations from 15 to 22 - 3.9-9.7 and 0.6-1.8, respectively. **Keywords:** embryo, follicles, egg cell, aspiration, donor, cultivation, serial number, cleavage, in vitro.*

Введение. Одним из первых методов клеточных репродуктивных технологий стало искусственное осеменение, которое оценивается как величайшее достижение в биологии размножения животных, особенно крупного рогатого скота, определившее решающую роль быков-производителей и позволившее систематизировать процессы разведения и селекции, контролировать распространение гинекологических заболеваний, а в последнее время и возможность разделять сперму по полу и тем самым планировать пол будущего потомства. Однако искус-