

научных статей по материалам 84-й научно-практической конференции. 2019. - С. 359-363. 3. Живая масса и экстерьерные особенности овец от однородного и разнородного подбора / В.А. Мороз, Е.Н. Чернобай, Н.А. Новгородова, И.Г. Сердюков // Вестник Курганской ГСХА. - 2017. - № 2 (22). - С. 51-53. 4. Качественные показатели шерсти овец породы джалгинский меринот от внутри- и межлинейного подбора / В.А. Мороз, Н.А. Новгородова, Е.Н. Чернобай, И.Г. Сердюков // Зоотехния. - 2017. - № 6. - С. 31-32. 5. Клинические, морфологические и биохимические показатели у овец от внутри- и межлинейного подбора / Н.А. Агаркова, Е.Н. Чернобай, Н.И. Ефимова, и др. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2019. № 7. С. 130-134. 6. Количественные и качественные показатели шерсти овец породы российский мясной меринот в колхозе-племзаводе имени Ленина Арзгирского района Ставропольского края / Н.И. Ефимова, Е.Н. Чернобай, С.Н. Шумаенко, Антоненко Т.И. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. - 2019. - № 4. - С. 83-88. 7. Мороз В.А. Овцеводство и козоводство : учебник. - Ставрополь: СтГАУ «АГРУС», 2005. 496 с. 8. Продуктивные особенности овец в зависимости от возраста родителей / Е.Н. Чернобай, Н.И. Ефимова, В.И. Гузенко и др. // Вестник АПК Ставрополя. - 2017. - № 2 (26). - С. 126-130. 9. Трухачев, В.И. Селекционно-генетические методы повышения продуктивности овец тонкорунных пород Северного Кавказа / В.И. Трухачев, Е.Н. Чернобай : монография. Ставрополь, АГРУС, 2018. 220 с. 10. Фенотипические корреляции и наследуемость признаков чистопородным и помесным молодняком с разной кровностью по австралийскому мясному мериноту / Е.Н. Чернобай, Т.И. Антоненко, Н.И. Ефимова и др. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. - 2018. - № 6. - С. 121-126. 11. Формирование гистоструктуры кожи и фенотипические корреляции овец породы джалгинский меринот от внутри- и межлинейного подбора / Е.Н. Чернобай, Н.А. Агаркова, Н.И. Ефимова и др. // Вестник АПК Ставрополя. - 2019. - № 2 (34). - С. 34-38. 12. Чернобай, Е.Н. Влияние сроков стрижки на продуктивность овец / Е.Н. Чернобай // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. - 2017. - № 3 (17). - С. 8-13. 13. Чернобай, Е.Н. Взаимосвязь основных хозяйственно-полезных признаков у тонкорунных овец и их наследуемость / Е.Н. Чернобай, Т.И. Антоненко // В сборнике: Современные аспекты ветеринарии и зоотехнии. творческое наследие В.К. Бириха (к 115-летию со дня рождения). материалы Всероссийской научно-практической конференции. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова». - 2018. - С. 84-88. 14. Чернобай, Е.Н. Фенотипические корреляции и наследуемость признаков продуктивности у овец от внутри- и межлинейного подбора для перспективного рынка "ФУДНЕТ" / Е.Н. Чернобай, Т.И. Антоненко, Н.И. Ефимова // В сборнике: Цифровые технологии в сельском хозяйстве: текущее состояние и перспективы развития. сборник научных трудов по материалам I Международной научно-практической конференции. - 2018. - С. 246-251. 15. Чернобай, Е.Н. Особенности телосложения ярок различных генотипов / Чернобай Е.Н. В сборнике: Повышение продуктивных и племенных качеств сельскохозяйственных животных. Сборник научных статей по материалам 75-я Региональной научно-практической конференции. - 2011. - С. 23-27. 16. Phenotypic correlation and heritability of signs in sheep received from parents with different ages / E.N. Chernobai, V.I. Guzenko, A.A. Drovorub, T.I. Antonenko, V.I. Konoplev // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2018. - T. 9. - № 2. - С. 757-761. 17. Selected methods of formation desirable phenotype of different sheep breeds / V.I. Trukhachev, S.A. Oleinik, E.N. Chernobai, T.I. Antonenko, V.I. Konoplev // В сборнике: AGRICULTURE FOR THE NEXT 100 YEARS. Proceedings of the 26th NJF Congress. 2018. С. 125-129. 18. The productive features of sheep in different types of breeding / V.I. Trukhachev, V.A. Moroz, E.N. Chernobai, V.I. Guzenko, A.A. Drovorub // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2017. - T. 8. - № 5. - С. 653-659.

УДК: 591.391.1: 591.158.1

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛУЧЕНИЯ *in vitro* ЭМБРИОНОВ ИЗ ООЦИТОВ КОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ POST MORTEM И МЕТОДОМ ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ АСПИРАЦИИ ФОЛЛИКУЛОВ

Сингина Г.Н., Шедова Е.Н., Чинаров Р.Ю., Тарадайник Н.П.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, г. Подольск, Россия

Проведена оценка эффективности технологии получения *in vitro* эмбрионов из женских половых клеток (ооцитов) после их экстракорпорального созревания и оплодотворения. Доля развития бластоцист (стадии пригодной для трансплантации и замораживания) в случае использования *post mortem* ооцитов составила 42% и в случае применения ооцитов, выделенных прижизненно 26%. **Ключевые слова:** ооциты коров, *in vitro*, созревание, оплодотворение, эмбриональное развитие.

THE RESULT OF OBTAINING *in vitro* EMBRYO FROM COW OOCYTES ISOLETED POST MORTEM and BY USING OVUM PICK UP METHOD

Singina G.N., Shedova E.N., Chinarov R. Yu., Taradaynic N.P.

L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podolsk, Russia

*The effectiveness of the technology for obtaining in vitro embryos from bovine oocytes after their in vitro maturation and fertilization was assessed. The rate of oocytes developed to the blastocyst stage (the stage suitable for transplantation and freezing) in the case of using post mortem oocytes was 42%, while in the case of using oocytes isolated intravitaly, it was 26%. **Keywords:** cow oocytes, in vitro, maturation, fertilization, embryonic development*

Введение. Развитие и внедрение в практику вспомогательных репродуктивных технологий направленных на получение эмбрионов и их трансплантацию животным-реципиентам актуально для скотоводства так как позволяет увеличить темпы генетического прогресса в селекции крупного рогатого скота и повысить эффективность программ сохранения малочисленных пород. Эмбрионы развиваются либо *in vivo*, либо *in vitro*. В обоих случаях целью является получение большего количества потомства от лучших и уникальных матерей [1-3].

Суть технологии получения эмбрионов *in vivo* заключается в вызывании у коров-доноров множественной овуляции с помощью гормональной обработки, их искусственном осеменении, вымывании эмбрионов и пересадке эмбрионов животным –реципиентам (МОЕТ). *In vitro* эмбрионы пригодные для трансплантации развиваются из ооцитов, созревших и оплодотворенных в искусственных условиях. Получить ооциты можно как от живых животных (чаще всего методом трансвагинальной пункции фолликулов), так и *post mortem* непосредственно из яичников. При этом *post mortem* ооциты извлекаются лишь в ограниченном количестве и однократно, в то время как трансвагинальную аспирацию фолликулов (ovum-pick-up, OPU) можно проводить длительное время и многократно [2]. Показано, что OPU — наиболее гибкий и воспроизводимый метод получения эмбрионов от живых доноров. В отличие от МОЕТ, OPU не препятствует нормальному воспроизводству и производственному циклу донора. Подходящим донором может стать любая самка в возрасте от 6 месяцев до 3-го месяца стельности и вскоре после отела (через 2-3 недели) [3]. В настоящее время OPU стала реализованной на практике альтернативой традиционной программе получения эмбрионов *in vivo* [3, 4] и все чаще используется в коммерческих целях во всем мире [5-7]. Получение эмбрионов *in vitro* (*in vitro* embryo production, IVEP) с использованием *post mortem* ооцитов применимо в основном в исследовательских работах, где требуется большое количество дешевого экспериментального материала.

В течение ряда лет, нами проводилась работа по моделированию и усовершенствованию технологии IVEP у крупного рогатого скота и в данной публикации нами представлены результаты оценки ее эффективности как в контексте использования *post mortem*, так и OPU ооцитов.

Материал и методы исследований. Исследования проводили на базе лаборатории экспериментальной эмбриологии ФГБНУ Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста. Для получения женских половых клеток (ооцитов) *post mortem*, яичники коров и половозрелых телок, отобранные на мясокомбинате после убоя, доставляли в лабораторию в течение 4-6 ч, освобождали от прилегающих тканей и многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе, содержащем пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). Ооцит-кумуляусные комплексы (ОКК) выделяли из яичников посредством рассечения лезвием стенок фолликулов и промывали 3 раза в среде ТС-199, содержащей NEPES (25 мМ), Na-пируват (0,5 мМ), ФБС (5%), гепарин (10 мкг/мл) и гентамицин (50 мкг/мл). Одновременно с промывкой проводили морфологическую оценку извлеченных ОКК, отбирая для дальнейшего культивирования ооциты согласно общепринятым критериям [8].

ОПУ-ооциты получали от половозрелых телок симментальской породы (n=6) с естественным половым циклом. Пункцию фолликулов выполняли раз в неделю с использованием ОПУ-системы для крупного рогатого скота («Minitube», Германия), включающей ультразвуковой сканер SSD Pro Sound 2, конвекциональный секторный зонд, вакуумный насос и держатель зонда. Аспирацию всех видимых фолликулов проводили иглой диаметром 1,2 мм и длиной 75 мм, соединенной силиконовым шлангом с флаконом объемом 50 мл. В качестве аспирационной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавлением 10% ФБС, 18 МЕ/мл гепарина и 50 мг/мл гентамицина. Аспираты от каждого донора фильтровали индивидуально, промывали с использованием ФСБ, дополненного 1% ФБС, после чего под стереомикроскопом искали и оценивали ОКК. Выделенные ОКК разделяли на пригодные для культивирования *in vitro* (включая ооциты, лишённые клеток кумулюса) и не пригодные для культивирования *in vitro* (с явными цитоплазматическими аномалиями).

После селекции выделенные *post mortem* и методом ОПУ ооциты в течение 24 ч инкубировали с целью созревания в среде ТС-199, содержащей НЕРЕС (25 мМ), Na-пируват (0,5 мМ), фолликулостимулирующий и лютеоинизирующий гормоны (по 10 мкг/мл), эпидермальный фактор роста (10 нг/мл), а также ФБС (10 %) и гентамицин (50 мкг/мл). с последующим их *in vitro* оплодотворением (*in vitro fertilization, IVF*). Для IVF созревшие ОКК однократно промывали в среде ВО-IVF (IVF Bioscience, Великобритания) и помещали в капли той же среды за 30 мин до контакта со сперматозоидами. Ооциты оплодотворяли с использованием фракции активных сперматозоидов, полученных методом swim-up [9]. Соломинку с замороженной спермой размораживали, содержимое соломинки переносили на дно пробирок, содержащей 1 мл среды Sperm-TALP [10], и помещали в инкубатор на 50 мин. После инкубации из пробирки отбирали верхний слой объемом 750 мкл, переносили его в другую пробирку содержащую среду Sperm-TALP и при 300 g в течение 7 мин. Полученный осадок, содержащий подвижные спермии, вносили в среду ВО-IVF (IVF Bioscience, Великобритания) с предварительно перенесенными туда созревшими ОКК, так чтобы конечная концентрация мужских половых клеток в среде ВО-IVF составила 1×10^6 сперматозоидов на мл. Половые клетки совместно культивировали в течение 12-14 ч, после чего ооциты осторожно освобождали в среде НЕРЕС-TALP [9] от клеток кумулюса и налипших сперматозоидов и помещали в среду для эмбрионального развития.

Эмбрионы культивировали в 4-луночных планшетах (Nunc, Дания) в каплях среды ВО-IVC (IVF Bioscience, Великобритания) объемом 500 (для *post mortem*-ооцитов) или 100 мкл (для ОПУ-ооцитов) под слоем минерального масла в инкубаторе при температуре 38,5°C и газовой атмосфере, содержащей 5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂. В обоих случаях через 3 суток культивирования проводили смену среды и морфологическую оценку доли раздробившихся зигот, на 5-е сутки в капли среды ВО-IVC добавляли ФБС (2,5%), на 7-е сутки культивирования подсчитывали число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты (Бл), а на 10-е число эмбрионов, достигших стадии вылупившейся Бл. Часть 7-ми дневных Бл фиксировали и окрашивали DAPI как описано ранее [11] с целью оценки в них количества ядер.

Результаты исследований. В случае получения *in vitro* эмбрионов с использованием *post mortem* ооцитов доля созревших ооцитов (отношение ооцитов с полярными тельцами к исходному количеству оплодотворенных ооцитов определяемое после процедуры IVF в процессе освобождения яйцеклеток от кумулюсных клеток и сперматозоидов) составила $86,57 \pm 3,29\%$, а доля раздробившихся ооцитов (сформированных эмбрионов всего) после их оплодотворения *in vitro* – $70,80 \pm 3,51\%$. Также согласно морфологической оценки $42,30 \pm 3,20\%$ оплодотворенных ооцитов достигало стадии Бл.

О качестве полученных бластоцист судили по общему числу, содержащихся в них ядер, а также по способности ими достигать стадии вылупившейся Бл. Обнаружено, что в эмбрионах, определённых по морфологическим критериям как Бл, содержалось в среднем 90 ядер, что подтверждало их высокое качество, 70% полученных бластоцист выходило через 3 дня дополнительного культивирования из зоны пеллюцида, что в свою очередь указывало на их высокую жизнеспособность.

При проведении работ по выделению ооцитов методом ОПУ значение среднего числа пунктированных фолликулов на одну сессию ОПУ составило 7,36, а степень извлечения ОКК – 54,35% соответственно. При этом показатель среднего числа фолликулов был вариабельным и зависел от донора. 85% ОКК, выделенных из фолликулов животных-доноров, были признаны пригодными для получения эмбрионов в системе *in vitro*. Уровень ядерного созревания ОПУ-ооцитов и их дробления после оплодотворения *in vitro* не отличались от значений, полученных для *post mortem* ооцитов. Тем не менее, обнаружены различия в доли оплодотворенных ооцитов, достигших стадии бластоцисты, которая была для ОПУ ооцитов в 1,6 раза ниже, чем для *post mortem* ооцитов. При этом качество и жизнеспособность полученных бластоцист существенно не отличалась (в среднем в Бл было 77 ядер, доля вылупления Бл составила 59%).

Заключение. Нами сделан вывод, что предложенная технология ИВЕР позволяет эффективно получать эмбрионы крупного рогатого скота как с использованием ОПУ, так и *post mortem* ооцитов. При этом, более низкие показатели развития бластоцист (стадии эмбрионального развития на которой происходит замораживание и трансплантация) из донорских ооцитов, очевидно, являются следствием применения к ним менее жестких критериев оценки качества с точки зрения их пригодности к культивированию *in vitro*.

Литература. 1. Ferré, L.B., Kjelland M.E., Strøbech L.B., Hyttel P., Mermillod P., Ross P.J. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods / L.B. Ferré, M.E. Kjelland, L.B. Strøbech, P. Hyttel, P. Mermillod, P.J. Ross // *Animal*. – 2020. – Vol. 14(5). – P. 991-1004. 2. Boni, R. Ovum pick-up in cattle: A 25 years retrospective analysis / R. Boni // *Animal Reproduction*. – 2012. – Vol. 9(3). – P. 362-369. 3. Qi, M. Transvaginal Ultrasound guided Ovum Pick-up (OPU) in Cattle / Qi, M., Yao Y., Ma H., Wang J., Zhao X. et al. // *Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering*. – 2013. – Vol. – 18. – P.118. 4. Sanches, B.V. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs / B.V. Sanches, A.F. Zangirolamo, M.M. Seneda // *Animal Reproduction*. – 2019. – Vol. 16(3). P. 394-401. 5. Viana, J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals / J. Viana // *Embryo Technology Newsletter*. – 2020. – Vol. 38(4). – P. 7-26. 6. Sirard, M.A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context / M.A. Sirard // *Reproduction*. – 2018. – Vol. 156(1). – P. R1-R7. 7. van Wagendonk-de Leeuw, A.M. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status / A.M. van Wagendonk-de Leeuw // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 65(5). – P. 914-925. 8. Baldassarre, H. Laparoscopic ovum pick-up for *in vitro* embryo production from dairy bovine and buffalo calves / H. Baldassarre, V. Bordignon // *Animal Reproduction*. – 2018. – Vol. 15(3). – P. 191-196. 9. Singina, G.N. Final maturation of bovine oocytes in a FERT-TALP medium increased their quality and competence to *in vitro* embryo development // G.N. Singina, E.N. Shedova // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. – 2019. – Vol. 54(6). – P. 1206-1213. 10. Parrish, J.J. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin / J.J. Parrish // *Theriogenology*. – 2014. – Vol. 81(1). – P. 67-73. 11. Singina, G.N. Delaying effects of prolactin and growth hormone on aging processes in bovine oocytes matured *in vitro* / G.N. Singina, E.N. Shedova, A.V. Lopukhov, O.S. Mityashova, I. Y. Lebedeva // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2021. – Vol. 14(7). – P. 684.

УДК 636.4.082:519.6

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТАТИСТИЧЕСКИХ ТЕНДЕНЦИЙ СЕЛЕКЦИОННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВИНЕЙ ПОРОДЫ ЛАНДРАС

Соляник В.В., Соляник С.В.

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Жодино, Республика Беларусь

*Моделирование статистических тенденций учитываемых селекционных показателей свиней породы Ландрас в границах минус / плюс две сигмы, показало, что масса гнезда при отъеме, как и масса поросенка при отъеме, имеют достоверное различие в паре среднее значение и $M + 2\sigma$. Для товарного свиноводства нет необходимости использовать комплексные индексы в племенной работе, так как это не дает существенного экономического эффекта. **Ключевые слова:** зоотехния, свиньи, порода Ландрас, статистика, компьютерное моделирование*