

Концентрация Т-лимфоцитов в крови овец I группы через 12 ч после начала опыта снижалась с 67,89 до 61,36 %, В-лимфоцитов – увеличивалась с 20,81 до 22,42 %. У животных II группы концентрация Т- и В-лимфоцитов через 3 ч после введения кофеин-бензоата натрия увеличивалась соответственно с 68,17 до 74,14 % и с 21,49 до 22,34 % и была достоверно выше, чем в контроле.

Заключение. При стимуляции центральной нервной системы кофеин-бензоатом натрия у овец повышается неспецифическая резистентность, о чем свидетельствует увеличение общего количества и фагоцитарной активности лейкоцитов, иммуноглобулинов (IgG, IgA и IgM), Т- и В-лимфоцитов. Полученные нами данные могут быть использованы при проведении лечебно-профилактических мероприятий, а также для диагностики заболеваний животных.

Литература. 1. Корнеева, Е.А. Прогресс и изучение проблемы нейроиммунорегуляции / Е.А. Корнеева // *Нейроиммунорегуляция иммунного гомеостаза: тез. докл. IV Всесоюзного симпозиума, 5-7 мая 1986 г. - Ленинград, 1986.* – С. 10-12. 2. Завьялов, А.В. Корреляция функций вкусового анализатора и нейросаливаторного прибора / А.В. Завьялов, Г.В. Масленникова // *Корреляция физиологических функций в норме и патологии: сб. науч. тр. – Курск, 1978.* – С. 84-91. 3. Методы количественной оценки состояния функциональной системы организации физиологических функций в норме и патологии / Завьялов А.В. [и др.] // *Вычислительная диагностика и телеметрическая обработка медицинской информации.* – Горький, 1979. – С. 198-200. 4. Кузник, Б.И. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма / Б.И. Кузник, Н.В. Васильев, Н.Н. Цыбиков. – Москва, 1989. 5. Холод, В.М. Справочник по ветеринарной биохимии / В.М. Холод, Г.Ф. Ермолаев. – Минск, 1988. 6. Новиков, Д.К. Клеточные методы иммунодиагностики / Д.К. Новиков, В.И. Новикова. – Минск, 1979. 7. Плященко, С.И. Естественная резистентность организма животных / С.И. Плященко, В.П. Сидоров. – Москва, 1979. – 136 с.

УДК 636.2.034:612.02

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ СОЗРЕВАНИИ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА

Ракович Е.Д.

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

Применение бычьей сыворотки в комплексе с эмбриональной или фетальной сыворотками при культивировании ооцитов вне организма позволило получить 35,5–44,8% дробящихся клеток и 16,1–17,2% эмбрионов на стадии морула-бластоциста. Добавление 0,02 нг/мл гонадотропин-релизинг гормона (сурфагона) в среду для созревания ооцитов способствует повышению выхода созревших до стадии метафаза II яйцеклеток до 89,3%, увеличению выхода дробящихся зародышей после оплодотворения на 2,5%. Синтетический фитогормон эпибрассинолид может быть использован в качестве биологически активного фактора при получении ранних зародышей вне организма.

Application of the bull whey in a complex with embryonal or fetal wheys at cultivation oocists outside of an organism has allowed to receive 35,5–44,8 % of splitted up cells and 16,1–17,2 % of embryos at a stage morula-blastocistis. Addition of 0,02 ng/ml gonadotropini-reლის hormone (surfogoni) on Wednesday for maturing oocistis promotes increase of an output ripened up to a stage a metaphase II ovule up to 89,3 %, to increase in an output of splitted up germs after fertilisation has increased for 2,5 %. Synthetic fitogormone epibrassinolidis can be used as biologically active factor at reception of early germs outside of an organism.

Введение. Развитие биотехнологических методов размножения позволяет с большей эффективностью использовать репродуктивный и генетический потенциал высокоценных животных, что особенно актуально в скотоводстве в связи с его низкой плодовитостью и продолжительным интервалом между поколениями. В настоящее время в связи с интенсификацией ведения молочного скотоводства в хозяйствах республики резко снижается фертильность (оплодотворяемость) коров из-за преждевременной их выбраковки по разным технологическим причинам, главной из которых является нарушение репродуктивных качеств животных. Гормональное стимулирование полиовуляции не только не позволяет в полной мере использовать репродуктивный потенциал коров, но и вызывает физиологические нарушения, связанные с переизбыточным содержанием гормонов в крови животных. Решение данной проблемы возможно путем созревания и оплодотворения ооцитов вне организма и дальнейшего культивирования полученных таким образом зигот.

Известно, что созревание фолликулов и ооцитов в яичниках млекопитающих находится под контролем многочисленных факторов, поступающих в них из кровеносной системы или синтезируемых в яичниках [1]. Гормоны гипофиза и гипоталамуса (гонадотропин-релизинг гормон, фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны, прогестерон, эстрадиол 17_β) являются главными регуляторами овариальной функции [2].

В естественном половом цикле созревание ооцита приводит к взаимозависимым изменениям его ядра, цитоплазмы, плазматической мембраны и прозрачной оболочки. Однако эти процессы независимы, поэтому развитие ооцитов до метафазы II (стадии оплодотворения) не является достаточным показателем зрелости ооцита. Для возобновления мейоза в условиях *in vitro* достаточно извлечь ооциты, находящиеся в состоянии паузы развития на стадии диплотепа мейоза. Однако одного лишь извлечения из фолликула не всегда достаточно, чтобы ооцит завершил созревание и приобрел способность к оплодотворению и дальнейшему развитию. Даже в случае оплодотворения таких клеток и их развития в искусственных условиях до преимплантационных стадий (морула, бластоциста), уровень приживляемости будет достаточно низким, а возможность получения полноценного потомства практически сводится к нулю [3].

Моделирование систем дозревания ооцита – одна из важнейших задач в области клеточной репродук-

тивной технологии. Усовершенствование условий созревания и оплодотворения ооцитов *in vitro* с целью максимального приближения к условиям *in vivo* позволит обеспечить высокий выход способных к оплодотворению и дальнейшему развитию в эмбрионы до стадии морула – бластоциста яйцеклеток за счет сочетания биологически активных веществ в культуральных средах, соблюдения газового и температурного режимов. Известно, что в поддержке роста и питания клеток важную роль играет сыворотка за счет находящихся в ней белков, аминокислот, предшественников нуклеиновых кислот и витаминов. В настоящее время широко используются фетальная сыворотка теленка и эстральная сыворотка коров. По данным многих авторов, введение в среду для созревания фетальной сыворотки теленка ускоряет выделение первого полярного тельца. Другие авторы показали, что введение в среду для созревания фетальной сыворотки не повышает процент ядерного созревания ооцитов, в то же время эстральная сыворотка значительно повышает этот показатель. Ряд авторов утверждает, что тип сыворотки практически не сказывался на проценте ядерного созревания [4, 5, 6].

Кроме того, 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 фолликулов.

В последние годы в сельском хозяйстве как в нашей стране, так и за рубежом широко применяются фитогормоны и их синтетические аналоги в качестве ростовых стимуляторов, которые обладают достаточно большей биологической активностью при низких концентрациях.

В связи с вышесказанным представляется актуальным выполнение исследований, направленных на поиск наиболее эффективных систем созревания и оплодотворения яйцеклеток крупного рогатого скота вне организма, основанных на введении в среду сывороток различных типов, а также гонадотропин-релизинг гормона, в качестве ростового стимулятора—синтетического стероидного фитогормона эпибрассинолида.

Цель работы – усовершенствовать условия созревания ооцитов крупного рогатого скота вне организма.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в лаборатории генетики с.-х. животных РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству». Объектом исследований служили ооциты крупного рогатого скота и эмбрионы на ранних преимплантационных стадиях развития, полученные вне организма.

Яичники получали на мясокомбинате после убоя животного и доставляли в лабораторию в течение 1,5-3 часов в стерильных солевых растворах (Хенкса, Дюльбекко) с добавлением антибиотиков при температуре 28-38°C. Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) выделяли рассечением ткани яичников. Поиск и морфологическую оценку качества полученных ооцит-кумулюсных комплексов проводили микроскопическим исследованием с использованием микроскопа МБС-10 при увеличении в 32-56 крат. Для исследований отбирались ооциты, оцененные не ниже 4-5 баллов по пятибалльной шкале. Затем клетки помещали в среду для созревания ТС-199 с добавлением эстральной сыворотки суперовулировавших коров, фетальной сыворотки крупного рогатого скота, бычьей сыворотки, 25мМ/л буфера Нерес, 10ед./мл гентамицина, сурфагона и эпибрассинолида в различных концентрациях. В своих исследованиях мы использовали сыворотку крови быков в возрасте 18 мес., изготовленную в условиях лаборатории, а также фетальную и эстральную сыворотку коров. Сыворотку добавляли в количестве 10-15% к среде ТС-199. С целью преодоления блока дробления на стадии 8-16 клеток на третьи сутки культивирования в среду, содержащую бычью сыворотку, вводили 5% эстральной или фетальной сыворотки. Сурфагон добавляли в дозе 0,02 нг/мл к среде для созревания. В качестве контроля служила среда без добавления Гн-РГ. Эпибрассинолид добавляли к культуральной среде в количестве 2×10^{-4} ; 2×10^{-6} ; 2×10^{-7} ; 2×10^{-8} ; 2×10^{-9} моль/л. Контролем служила разработанная нами среда для созревания ооцитов. Созревание ооцитов проводили при температуре 39°C, содержании 5% CO₂ в воздухе, максимальной влажности под минеральным маслом в течение 24 часов. Затем ооциты оплодотворяли замороженно-оттаянной спермой, прошедшей капацитацию, в среде для оплодотворения эмбрионов. Эффективность оогенеза при получении преимплантационных зародышей вне организма определялась по уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей. Всего прокультивирована 821 клетка.

Результаты исследований. Введение в среду ТС-199 фетальной, эмбриональной и бычьей сывороток позволило получить уровень созревания от 81,9 до 84,1%, уровень дробления 32,8–44,9% и выход эмбрионов на преимплантационных стадиях 14,7–17,4% (таблица 1).

Таблица 1 — Влияние типа сыворотки на оогенез ооцитов крупного рогатого скота

Используемая сыворотка	Кол-во ооцитов, n	Созрело до метафазы 2, n-%	Уровень дробления, n-%	Морул-бластоцист, n-%
Бычья сыворотка (БС) 10%	61	50–81,9	20–32,8	9–14,7
Фетальная сыворотка (ФС) 15%	63	52–82,5	22–34,9	10–15,9
Эстральная сыворотка (ЭС) 15%	69	58–84,1	31–44,9	12–17,4
БС+ФС 5%	62	51–82,3	22–35,5	10–16,1
БС+ЭС 5%	58	48–82,8	26–44,8	10–17,2

Примечание: последние две графы – фетальная и эстральная сыворотка добавлены на 3-й день культивирования.

Исследования показывают, что при применении бычьей сыворотки до метафазы II созрело 81,9% ооцитов, поставленных на культивирование, при этом уровень дробления составил 32,8%, а выход морул-бластоцист — 14,7%. При применении фетальной или эстральной сыворотки через 24 часа созрело до метафа-

зы II 82,1 и 84,1% ооцитов, что незначительно превысило данный показатель в предыдущей группе – на 0,6 и 2,2% соответственно. В то же время уровень дробления при применении фетальной сыворотки был выше по сравнению с бычьей на 2,1%, а при применении эстральной – на 12,1%. Показатели выхода преимплантационных эмбрионов находились в аналогичной зависимости: использование фетальной сыворотки увеличивало их выход на 1,2%, а эстральной – 2,7%. Дополнительное введение в среду культивирования зародышей, содержащую бычью сыворотку, эстральной или фетальной сыворотки на 3-й день культивирования позволяет увеличить количество созревших до метафазы II яйцеклеток на 0,4–0,9%, уровень дробления на 2,7–12,0%, а выход морул-бластоцист – на 1,4–2,5% по сравнению с группой, культивирующейся с применением только бычьей сыворотки.

Таким образом, применение бычьей сыворотки в комплексе с эмбриональной или фетальной сыворотками позволило получить уровень дробления 35,5–44,8%, а выход эмбрионов на стадии морула-бластоциста составил 16,1–17,2% при культивировании ооцитов вне организма, что соответствует показателям культивирования в средах с эмбриональной и фетальной сыворотками.

Влияние гонадотропин-релизинг гормона (сурфагона) на эффективность созревания ооцитов при культивировании вне организма показано в таблице 2.

Таблица 2 — Результаты созревания ооцитов при включении в среду релизинг-гормона

Среда	Количество ооцитов, n	Созрело до метафазы 2, n-%	Уровень дробления, n-%	Выход морул-бластоцист, n-%
Контроль	75	62–82,7	32–42,7	11–14,7
Опыт (сурфагон)	84	75–89,3	38–45,2	15–17,9

Исследования показали, что применение сурфагона в среде для созревания ооцитов способствовало повышению уровня созревания на 6,6%, а выход дробящихся зародышей после оплодотворения увеличился на 2,5% по сравнению с контрольной группой. При этом выход морул-бластоцист увеличился на 3,2% и составил 17,9% от числа выделенных ооцитов.

Таким образом, применение гонадотропин-релизинг гормона в средах для созревания ооцитов способствует повышению выхода созревших до стадии метафаза II яйцеклеток. По всей видимости, добавление в культуральную среду вышеназванного гормона способствует регуляции процессов роста и развития ооцит-кумулясных комплексов и их дружному созреванию до стадии метафаза II.

В своих исследованиях мы изучали влияние эпибрассинолида (синтетического стероидного фитогормона) на созревание ооцит-кумулясных комплексов коров вне организма (таблица 3).

В результате исследований установлено, что высокая концентрация эпибрассинолида (2×10^{-4} моль/л) позволила получить 42,2% дробящихся зародышей и лишь 4,4% зародышей, пригодных для трансплантации, 57,8% клеток оказались неоплодотворенными. Снижение содержания фитогормона до 2×10^{-6} и 2×10^{-7} моль/л в культуральной среде положительно повлияло на уровень дробления – 48,6% и 46,4%, выход морул-бластоцист увеличился на 6,4 и 9,8% соответственно. Дальнейшее снижение концентрации гормона до 2×10^{-8} моль/л позволило получить 55,0% дробящихся клеток и 16,2% зародышей на стадии морула-бластоциста, что оказалось выше на 1,7% и 1,2% по сравнению с контролем соответственно. При содержании эпибрассинолида 2×10^{-9} моль/л наметилось незначительное снижение показателей.

Таблица 3 — Влияние эпибрассинолида на эффективность созревания ооцитов крупного рогатого скота вне организма

Количество эпибрассинолида, моль/л	Поставлено на культивирование ооцитов, n	Результаты созревания		
		Неоплодотворенных яйцеклеток, n-%	Дробящихся, n-%	Морул-бластоцист, n-%
$2 \cdot 10^{-4}$	45	26-57,8	19-42,2	2-4,4
$2 \cdot 10^{-6}$	37	19-51,4	18-48,6	4-10,8
$2 \cdot 10^{-7}$	56	30-53,6	26-46,4	8-14,2
$2 \cdot 10^{-8}$	80	36-45,0	44-55,0	13-16,2*
$2 \cdot 10^{-9}$	71	34-47,9	37-52,1	11-15,5*
Контроль	60	28-46,7	32-53,3	9-15,0**

Примечание. * P<0,01; ** P<0,05

Таким образом, синтетический фитогормон эпибрассинолид может быть использован в качестве биологически активного фактора при получении ранних зародышей вне организма в концентрациях 2×10^{-7} – 2×10^{-9} моль/л, что позволит получать 46,4–55,0% дробящихся клеток и 14,2–16,2% преимплантационных эмбрионов.

Заключение. 1. Применение бычьей сыворотки в комплексе с эмбриональной или фетальной сыворотками при культивировании ооцитов вне организма позволило получить 35,5–44,8% дробящихся клеток и 16,1–17,2% эмбрионов на стадии морула-бластоциста.

2. Добавление 0,02нг/мл гонадотропин-релизинг гормона (сурфагона) в среду для созревания ооцитов за счет регуляции процессов роста и развития ооцит-кумулясных комплексов способствует повышению выхода созревших до стадии метафаза II яйцеклеток до 89,3%. При этом выход дробящихся зародышей после оплодотворения увеличился на 2,5% по сравнению с контролем и составил 45,2%.

3. Синтетический фитогормон эпибрасинолид может быть использован в качестве биологически активного фактора при получении ранних зародышей вне организма в концентрациях 2×10^{-7} - 2×10^{-9} моль/л, что позволит получать 46,4-55,0% дробящихся клеток и 14,2-16,2% преимплантационных эмбрионов.

Литература. 1. Лебедева, И.Ю. Участие клеток гранулезы в опосредовании действия пролактина и соматотропина на ооцит-кумуляные комплексы коров *in vitro* / И.Ю. Лебедева, Т.В. Кабардина, Т.И. Кузьмина // Цитология. – 2005. - № 10. – С. 882-887. 2. Молекулярная биология клетки. В 5 т. Т.1. / Б. Албертс [и др.]. – М.: Мир, 1987. – 231 с. 3. Колесникова, А.А. Стимуляция развития ооцитов млекопитающих *in vitro* / А.А. Колесникова, В.А. Шагимова // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: материалы 6-ой Международной конференции. 19-20 декабря 2006 г., ВИЖ. – Дубровицы, 2006. – С. 85-87. 4. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / под ред. М.В. Зубец, В.П. Буркат. – Киев 1997. – С. 640-650. 5. Завертяев, Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / Б.П. Завертяев.—Л.: Агрпромпиздат, 1989.— 255 с. 6. Сметанина, И.Г. Влияние некоторых экзогенных факторов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*: автореф. дис.... канд. биологических наук / И.Г. Сметанина. – Боровск, 2001. – 27 с.

УДК 636:612.015

К ВОПРОСУ ОЦЕНКИ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Холод В.М., Баран В.П.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Проанализированы и обсуждены возможности и условия использования биохимических тестов в клинической практике.

Discussed and analyzed are possibilities and condition for using biochemical tests in clinical practice.

Лабораторные биохимические исследования могут оказать существенную помощь в диагностике заболеваний только в случае соблюдения некоторых основных условий:

- Правильной постановки задачи исследования и, в зависимости от этого, выбора соответствующих тестов (показателей).
- Выбора соответствующих целям исследования методов определения изучаемых показателей.
- Квалифицированного технического выполнения биохимических исследований.
- Грамотной оценки результатов и объективности сделанных выводов.

Не секрет, что часто выбор биохимических показателей никак не связан с целью исследования и подбирается по принципу «авось что-нибудь обнаружится» или служит просто неким «украшением», единственной целью которого является создание видимости более глубоких исследований.

Выбор биохимических тестов должен определяться в первую очередь их чувствительностью, специфичностью и селективностью. Под чувствительностью понимают способность теста обнаруживать патологическое состояние. Для его выражения часто используют процент положительных результатов к общему числу исследованных животных с данной патологией. Например, активность аспартатаминотрансферазы оказалась повышена у 20 животных из 25 больных гепатитом (чувствительность $20:25 \cdot 100\% = 80\%$).

Специфичность теста определяется его способностью не давать изменений, характерных для патологического состояния у здоровых животных. Она также может выражаться в процентах. Например, если амилаза не дает высоких значений, характерных для острого панкреатита, ни у одного из исследованных здоровых животных, то специфичность теста 100%.

Под селективностью понимают способность теста давать положительный результат только при наличии конкретного заболевания. Например, фермент орнитинкарбоамилаза вырабатывается только в печени, а трипсин - в поджелудочной железе. Резкое увеличение их содержания в крови свидетельствует о поражении соответственно печени или поджелудочной железы. К сожалению, высокоселективных показателей мало.

Если целью исследования является обнаружение особей, имеющих отклонение от нормы (проведение диспансеризации), то следует выбирать наиболее чувствительные, но малоселективные тесты, такие как, например, содержание гемоглобина, общего белка, СОЭ, снижение щелочного резерва и аналогичные показатели. Наличие таких отклонений говорит о нарушении биохимического гомеостаза, причину которого еще предстоит определить.

Если данные анамнеза и клинического исследования позволяют подозревать какую-то определенную патологию, то цели исследования и выбор показателей должны быть иными. Показатели должны быть специфичными и селективными. Например, существует целый ряд гепатозависимых, панкреозависимых и иных биохимических тестов, которые и должны использоваться при патологии печени или поджелудочной железы. При подозрении на беломышечную болезнь вполне естественно исследовать содержание селена и селенозависимых ферментов, а не калий и натрий и т.д.

Определившись с направлением исследований, необходимо выбрать наиболее подходящие методы их реализации. Выбрав малочувствительный, неспецифический или не связанный с целью исследования метод, трудно получить достоверную информацию. Например, до сих пор в некоторых случаях пытаются получить данные о кислотно-основном балансе крови путем титрования ее кислотой, хотя давно существуют объективные и точные физико-химические методы, позволяющие получить данные обо всех основных компонентах буферных систем крови (рСО₂, СБО, СБ, БО).