

УДК 636.2.034:612.02

Л. Л. ЛЕТКЕВИЧ<sup>1</sup>, А. И. ГАНДЖА<sup>1</sup>, Е. Д. РАКОВИЧ<sup>1</sup>, Л. В. ГОЛУБЕЦ<sup>2</sup>,  
В. П. СИМОНЕНКО<sup>1</sup>, И. В. КИРИЛЛОВА<sup>1</sup>

**РЕГУЛЯЦИЯ Фолликуло- и Эмбриогенеза у коров  
IN VIVO и IN VITRO под влиянием Эндокринных факторов**

<sup>1</sup> Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству,

<sup>2</sup> Гродненский государственный аграрный университет

(Поступила в редакцию 26.06.2008)

Одним из резервов увеличения темпов селекции и производства продукции животноводства является повышение интенсивности воспроизводства стада на основе современных биотехнологий, к которым относится метод трансплантации реципиентам эмбрионов, полученных от высокопродуктивных животных путем гормональной стимуляции множественной овуляции яичников, а также посредством оплодотворения ооцитов, извлеченных из яичников убитых коров, вне организма.

Результаты наших предыдущих исследований, а также исследования ряда авторов [1–3] показали, что стимуляция множественного роста фолликулов с применением экзогенных гонадотропных препаратов не всегда достаточно эффективна, так как вызывает значительную вариабельность реакции яичников и не дает стабильных положительных результатов. Основной причиной этого можно считать изменение гормональных взаимодействий в организме животного на всех стадиях формирования полиовуляции.

В настоящее время для индукций суперовуляции применяются в основном гипофизарные фолликулостимулирующие препараты, эффективность которых определяется индивидуальной предрасположенностью организма донора отвечать на действие экзогенного гонадотропина [4, 5]. Однако их воздействие на нейрогуморальную систему животного имеет общие закономерности. Эндокринные механизмы формирования фолликулогенеза оказывают прямое влияние на процессы оогенеза, созревания яйцеклеток, их последующее оплодотворение, дробление и развитие ранних зародышей. Неадекватная стимуляция фолликулогенеза может привести к нарушению процессов овуляции и формирования желтого тела, увеличению числа аномальных гамет, что служит причиной полиспермного оплодотворения и эмбриональной смертности в дальнейшем [6]. В связи с этим возникла необходимость в проведении исследований по изучению влияния экзогенных гонадотропинов на развитие зародышей крупного рогатого скота *in vivo* и *in vitro* в сравнительном аспекте, так как анализ динамики дробления и развития клеток вне организма позволит выявить наиболее эффективные и безопасные фолликулостимулирующие препараты, устранить причины высокой вариабельности уровня полиовуляции и выхода жизнеспособных эмбрионов.

Для полноценного созревания и оплодотворения ооцитов в культуре *in vitro* необходимо создать условия, максимально соответствующие естественным, т. е. тем, в которых обеспечивается нормальное функционирование механизмов регуляции оогенеза и раннего эмбриогенеза *in vivo*. Для культивирования обычно применяют стандартную среду ТС-199 (*Sigma*). В качестве биологически активного фактора используют сыворотку крови, содержащую компоненты, способствующие выживанию и развитию клеток, среди которых инсулиноподобный фактор роста (ИФР) и факторы роста эпидермиса (ФРЭ), тромбоцитов (ФРТ) и фибробластов (ИФР). Помимо сыворотки крови нормальное созревание ооцитов обеспечивается введением в культуральную среду гипофизарных и половых гормонов [7–10]. Изучение эффективности использования в качестве

гормональных стимуляторов оогенеза экзогенных фолликулостимулирующих препаратов *in vivo* и в культуре *in vitro*, проведение сравнительного анализа эмбриогенеза позволит совершенствовать биотехнологические методы размножения высокоценных генотипов животных.

Цель работы – изучение влияния различных типов фолликулостимулирующих препаратов на процессы регуляции фолликулогенеза и эмбриогенеза у коров *in vivo* и *in vitro*.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводили в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных Института животноводства НАН Беларуси, в РСУП «Племзавод Кореличи» Гродненской и СПК «Рассвет» им. К. П. Орловского Могилевской областей на клинически здоровых коровах черно-пестрой породы 4–6-летнего возраста с 60-го по 90-й день после отела, живой массой 500–550 кг. Стимуляцию суперовуляции проводили на 10-й день полового цикла с использованием ФСГ-П (США) в общей дозе 50 мг, фолликотропина (Чехия) в общей дозе 480 ИЕ и фоллитропина (Литва) в общей дозе 1200 ед.

Для изучения влияния фолликулостимулирующих препаратов на эффективность получения эмбрионов вне организма в среды для созревания ооцит-кумулясных комплексов добавляли ФСГ-П в количестве 4 мкг/мл, фоллитропин – 0,1 ед/мл, фолликотропин – 0,0017 ИЕ/мл, фоллитропин – 4 мкг/мл, ФСГ-супер – 0,02 ед/мл. Для изучения биологической активности сыворотки крови коров, обработанных ФСГ-П общей дозой 50 мг, у трех коров брали кровь на 1, 2, 3 и 4-й дни введения препарата. В среду для созревания ооцитов ТС-199 (*Sigma*) добавляли 20% сыворотки: в I группе – с 1-го дня введения, II группе – со 2-го дня, III группе – с 3-го дня, IV группе – с 4-го дня введения ФСГ-П.

**Результаты и их обсуждение.** Успех индукции суперовуляции (выход достаточного количества жизнеспособных зародышей) зависит прежде всего от типа используемого гонадотропина и схемы его применения, что обусловлено их неодинаковым влиянием на процессы гормональной регуляции фолликулогенеза у коров. Из восьми коров-доноров, подвергнутых воздействию ФСГ-П (табл. 1), суперовуляцией реагировали 7 животных, или 87,5%, со средним числом овуляций на донора 10,3. На одного реагирующего донора получено 7,5 эмбрионов, в том числе пригодных к пересадке – 5,3; дегенерированных и отставших в развитии – 1,5; неоплодотворенных яйцеклеток – 0,7. Выход полноценных эмбрионов составил 70,6% от числа извлеченных. Девять коров-доноров обработали фоллитропином, суперовуляцией реагировали 7 животных, или 77,8%, со средним числом овуляций на донора 7,3. На одного реагирующего донора получено 5,1 эмбриона, в том числе пригодных к пересадке – 3,2; дегенерированных и отставших в развитии – 1,2; неоплодотворенных яйцеклеток – 0,7. Выход полноценных эмбрионов от числа извлеченных составил 57,1%. Для стимуляции полиовуляции семи коровам-донорам эмбрионов ввели фолликотропин, из них реагировали множественной овуляцией шесть животных, или 85,7%, со средним числом овуляций на донора 9,7. На одного реагирующего суперовуляцией донора получено в среднем 7,1 эмбриона, в том числе пригодных к пересадке – 5,5; дегенерированных и отставших в развитии – 1,0; неоплодотворенных яйцеклеток – 0,6. Выход ранних зародышей на преимплантационных стадиях составил 77,4% от числа извлеченных.

Т а б л и ц а 1. Эффективность вызывания суперовуляции у коров с применением различных гонадотропных препаратов

Показатель	ФСГ-П, 50 мг	Фолликотропин, 480 ИЕ	Фоллитропин, 1200 ед.
Всего обработано коров, <i>n</i>	8	7	9
Реагировало суперовуляцией, ( <i>n</i> – %)	7 – 87,5	6 – 85,7	7 – 77,8
Среднее число овуляций на донора, <i>n</i>	10,3 ± 2,3	9,7 ± 3,6	7,3 ± 0,9
Получено эмбрионов на донора, <i>n</i>	7,5 ± 1,2	7,1 ± 1,7	5,1 ± 0,7
в т. ч. пригодных к пересадке	5,3 ± 0,1***	5,5 ± 0,2***	3,2 ± 0,5
дегенерированных и отставших в развитии	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,3
неоплодотворенных яйцеклеток	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,3
Выход полноценных эмбрионов от числа извлеченных, %	70,6	77,4	57,1

\*\*\* $P \leq 0,001$ .

Таким образом, фолликулостимулирующие препараты ФСГ-П и фолликотропин в общих дозах 50 мг и 480 ИЕ, создавая оптимальный гормональный фон в организме животного, адекватный естественному половому циклу, обладают достаточно высокой активностью к фолликулярным ооцитам и обеспечивают высокий уровень полиовуляции и выход пригодных к трансплантации эмбрионов. Фолликулостимулирующая активность фоллитропина в наших исследованиях оказалась несколько ниже.

Наиболее эффективными в технологии *in vitro* оказались препараты ФСГ-П и фолликотропин как по числу дробящихся зародышей, так и по количеству жизнеспособных эмбрионов – 55,1, 40,6% и 52,9, 32,9% соответственно (табл. 2). Использование фоллитропина позволило получить 48,2% дробящихся зародышей и 28,6% жизнеспособных бластоцист, а ФСГ-супер – 45,7 и 30,0% соответственно. Наименее эффективным в наших исследованиях оказался фоллитропин: 46,9% дробящихся зародышей и 26,6% жизнеспособных бластоцист.

Т а б л и ц а 2. Эффективность использования гипофизарных препаратов в культуре *in vitro*

Наименование препарата	Кол-во яйцеклеток, поставленных на культивирование, <i>n</i>	Кол-во дробящихся зародышей, <i>n</i> – %	Кол-во жизнеспособных бластоцист, <i>n</i> – %
ФСГ-П, 4 мкг/мл	69	38 – 55,0	28 – 40,6
Фоллитропин, 4 мкг/мл	56	27 – 48,2	16 – 28,6
Фоллитропин, 0,1 ед/мл	64	30 – 46,9	17 – 26,6
Фолликотропин, 0,0017 ИЕ/мл	70	37 – 52,9	23 – 32,9
ФСГ-супер, 0,02 ед/мл	70	32 – 45,7	21 – 30,0

Анализируя динамику развития эмбрионов вне организма под влиянием используемых гормонов, следует отметить отсутствие неравномерно дробящихся зародышей в группе культивирования с ФСГ-П по сравнению с двумя другими. В среде культивирования с фолликотропином отмечается низкое количество морул-бластоцист к 7-му дню (28,6% против 44,4 и 35,6% в группах соответственно). К 8-му дню культивирования количество эмбрионов на стадии морула-бластоциста в I группе осталось на прежнем уровне, во II группе составило 42,2%, а в III группе – 34,3%. Однако количество жизнеспособных бластоцист к 11-му дню в группе с ФСГ-П составило 40,7, при культивировании с фоллитропином – 26,7, а фолликотропином – 31,4%.

Таким образом, фолликулостимулирующие препараты ФСГ-П, фоллитропин, фолликотропин обладают достаточно высокой гормональной активностью к фолликулярным ооцитам как *in vivo*, так и в культуре *in vitro*. Использование их для индукции суперовуляции позволяет получать 70,7, 62,7, 77,5% пригодных к пересадке эмбрионов, а в культуре *in vitro* – до 44,4, 42,2, 34,4% эмбрионов на преимплантационных стадиях соответственно.

Период полураспада экзогенных фолликулостимулирующих гормонов в организме коров составляет 4–6 ч, в связи с чем были разработаны 4-дневные схемы введения препаратов дважды в течение суток для стимуляции множественного роста фолликулов. Поскольку в крови таких животных содержатся высокие концентрации ФСГ и ЛГ, то введение сыворотки крови от животных в дни обработки в культуральные среды позволит моделировать вне организма стероидогенез и способствовать полноценному созреванию ооцитов.

Для изучения эффективности влияния сыворотки крови от коров, обработанных ФСГ-П, на созревание фолликулярных ооцитов в культуре *in vitro* в синтетические питательные среды добавляли сыворотку от животных каждого дня обработки ФСГ-П по 4-дневной схеме спустя 3 ч после утренней инъекции препарата. В качестве контроля служила фетальная сыворотка крови крупного рогатого скота. Сыворотку крови добавляли среду ТС-199, концентрация составила 20% от общего объема.

Из полученных данных (табл. 3) видно, что сыворотка крови коров в дни обработки фолликулостимулирующим препаратом оказывает положительное влияние на мейотическое созревание ооцитов *in vitro*. Если в контроле получено 22,2% ооцитов на стадии метафаза II, то при введении в среду сыворотки каждого из 4 дней обработки – от 25 до 38% созревших яйцеклеток.

Т а б л и ц а 3. Динамика созревания ооцитов коров в среде ТС-199 с 20%-ным содержанием исследуемых сывороток

Используемая сыворотка	Число прокультивированных ооцитов	% ооцитов на стадии		% дегенераций
		телофазы	метафазы II	
Фетальная сыворотка (контроль)	165	19,3	22,2	1,0
ФСГ-II: 1-й день введения	138	10,9	36,6	1,9
2-й день введения	86	9,8	30,5	1,6
3-й день введения	77	13,6	25	2,3
4-й день введения	90	15	38	2,0

Таким образом, введение в культуральную среду сыворотки крови индуцируемых ФСГ-II коров-доноров способствует оптимизации созревания ооцитов (25–38%) без использования дорогостоящих гормональных добавок и фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

Нами изучено влияние ФСГ (для культивирования эмбрионов *in vitro* фирмы «Sigma») на созревание, оплодотворение ооцитов и их дробление в искусственных условиях (табл. 4).

Основной питательной средой служила разработанная нами среда на основе ТС-199 («Sigma») с добавлением ФСГ в количестве 2, 5, 10, 15 и 20 мкг/мл, контролем служила среда без добавления фолликулостимулирующего гормона. Всего поставлено на культивирование 642 ооцита. В контроле стадии метафазы II достигли 28,7% клеток, выход морул и бластоцист составил 12,5 и 1,2% соответственно.

Добавление к питательной среде 2 мкг/мл ФСГ («Sigma») позволило повысить оплодотворяемость ооцитов на 7,8%, хотя выход зародышей на стадии морула-бластоциста остался практически на прежнем уровне и составил 13,9%.

Т а б л и ц а 4. Эффективность использования ФСГ в культуральной среде

Среда	Содержание ФСГ, мкг/мл	Оплодотворено ооцитов, n	Выход дробящихся зародышей	Выход Мо	Выход ВI	Выход Мо-ВI	Уровень трансформации морул в бластоцисты
ТС-199	2	115	42 – 36,5	14 – 12,2	2 – 1,7	16 – 13,9	2 – 12,5**
	5	110	54 – 49,1	20 – 18,2	6 – 5,4	26 – 23,6	6 – 23,1**
	10	115	54 – 46,9	18 – 15,6	2 – 1,7	20 – 17,4	2 – 10,0
	15	110	36 – 37,9	19 – 17,3	5 – 4,5	24 – 21,8	5 – 20,8*
	20	112	54 – 48,2	20 – 17,8	7 – 6,21	27 – 24,1	7 – 25,9***
Контроль	–	80	23 – 28,7	10 – 12,5	1 – 1,2	11 – 13,7	1 – 9,1

Увеличение содержания фолликулостимулирующего гормона до 5 мкг/мл повысило выход преимплантационных эмбрионов на 9,9%, а уровень трансформации морул в бластоцисты – на 14% ( $P < 0,01$ ) по сравнению с контролем. Однако концентрация ФСГ 10 мкг/мл, несмотря на значительно высокий процент (46,9%) оплодотворения ооцитов, снизила выход зародышей на преимплантационных стадиях развития на 6,2% по сравнению с предыдущей группой, хотя этот показатель был выше по отношению к контролю на 3,7%. Использование в среде 15 и 20 мкг/мл ФСГ позволило повысить оплодотворяемость на 9,2 и 19,5%, выход морул-бластоцист – на 8,1 и 10,4%, а уровень трансформации морул в бластоцисты – на 11,7% ( $P < 0,05$ ) и 16,8% ( $P < 0,001$ ). Наилучший результат получен при применении ФСГ в количестве 5, 15 и 20 мкг/мл.

Таким образом, использование ФСГ (для культивирования эмбрионов *in vitro* фирмы «Sigma») способствует получению 37,9–49,1% дробящихся зародышей и 17,4–24,1% морул-бластоцист.

## Выводы

1. Фолликулостимулирующие препараты ФСГ-П, фоллитропин, фолликотропин обладают достаточно высокой гормональной активностью к фолликулярным ооцитам как *in vivo*, так и в культуре *in vitro*. Использование их для индукции суперовуляции позволяет получать 70,7, 62,7, 77,5% пригодных к пересадке эмбрионов, а в культуре *in vitro* – до 44,4, 42,2, 34,4% эмбрионов на преимплантационных стадиях соответственно.

2. Введение в культуральную среду сыворотки крови индуцируемых ФСГ-П коров-доноров способствует оптимизации условий созревания ооцитов (25–38%) без использования дорогостоящих гормональных добавок и фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Использование ФСГ (для культивирования эмбрионов «Sigma») позволяет получать 37,9–49,1% дробящихся зародышей и 17,4–24,1% морул-бластоцист.

3. Проведенный сравнительный анализ эффективности различных гормональных препаратов *in vivo* и в культуре *in vitro* создает предпосылки для разработки теста по предварительной оценке фолликулостимулирующей активности гормональных препаратов и совершенствованию культуральных сред.

## Литература

1. Г о л у б е ц Л. В. Биотехнологические аспекты репродукции животных. Барановичи: РУПП «Барановичская укрупненная типография», 2001. 128 с.
2. Б у д е в и ч И. И., Ж у к Н. Ф., П а л я н с к а я М. В., З а р е м б а Н. Л. Биотехнологические критерии отбора и использования коров-доноров эмбрионов // Зоотехническая наука Беларуси: Сб. науч. тр. Минск, 2001. Т. 36. С. 24–29.
3. Л е б е д е в В. А., Л е б е д е в а И. Ю., К у з ь м и н а Т. И., Ш и п о в И. Ш. Роль метаболических гормонов в регуляции функции яичников у коров // Сельскохозяйственная биология. 2005. № 2. С. 14–19.
4. Ш п а к о в с к а я О. А. Влияние различных типов экзогенных гонадотропинов на стероидпродуцирующую способность яичников коров // НТИ и рынок. 1998. № 1. С. 30–33.
5. G o l u b e t s L. V., K u s a I. S. The influence of exogenous gonadotropins on the nature of endogenous hormones secretion // Baltic Anim. Breeding and Genetics Conference. Kaunas, 2002. P. 24.
6. Р е ш е т н и к о в а И. М. Фолликулогенез крупного рогатого скота при гормональной регуляции и различных формах нарушения воспроизводительной функции // Биология воспроизведения и биотехнологические методы разведения сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. М., 1989. С. 73–83.
7. А х м о л д а е в а А. М., С е р г е е в Н. И., П р о к о ф ь е в И. А. Созревание и оплодотворение *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота при действии биологически активных веществ // Сельскохозяйственная биология. 2003. № 6. С. 58–65.
8. Y u - H u n g L i n, J i a n n - L o u n g H w a n g, L e e - W e n H u a n g et al. Combination of FSH priming and hCG priming for *in vitro* maturation of human oocytes // Human Reproduction. 2003. Vol. 18. N 8. P. 1632–1636.
9. G o n g J. C. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle // Domestic Animal Endocrinologi. 2002. Vol. 23. N 1–2. P. 229–241.
10. D i s k i n M. G., M a s c k e y D. R., R o c h e J. F. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle // Animal Reproduction Science. 2003. Vol. 78. N 3–4. P. 345–370.

L. L. LETKEVITCH, A. I. HANJA, E. D. RAKOVICH, L. V. HALUBETS,  
U. P. SIMANENKA, I. V. KIRYLAVA

### REGULATION OF FOLLICULO- AND EMBRYOGENESIS OF COWS *IN VIVO* AND *IN VITRO* UNDER THE EFFECT OF ENDOCRINE FACTORS

## Summary

The effect of folliculostimulatory preparations on the processes of folliculogenesis and the early embryogenesis of cows *in vivo* and *in vitro* is studied. Comparative analysis of the efficiency of hormone preparations is given. It gives the premise for the development of a test on preliminary estimation of the folliculostimulating activity and perfection of cultural media.