

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

***ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
В РАЗВЕДЕНИИ И СЕЛЕКЦИИ
ПЛЕМЕННОГО СКОТА***

МОНОГРАФИЯ

*Гродно
ГГАУ
2019*

УДК 636.2:612.64.089.67

Голубец, Л. В. Инновационные технологии в разведении и селекции племенного скота: монография / Л. В. Голубец и др. – Гродно : ГГАУ, 2019. – 430 с. – ISBN 978-958-537-148-0

В монографии обобщены результаты научных исследований применения инновационных биотехнологических технологий в разведении и селекции племенного скота. Анализируются собственные данные авторов о впервые проведенных в Республике Беларусь исследованиях по изучению биологических факторов прямого и опосредованного влияния на эффективность получения эмбрионов крупного рогатого скота.

Монография предназначена для научных и практических работников зоотехнии и ветеринарной медицины, аспирантов, специалистов центров, пунктов трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, а также может быть использована в учебном процессе преподавателями и студентами сельскохозяйственных вузов и колледжей.

Табл. 147, рис. 3.

Рекомендовано к изданию Советом УО «Гродненский государственный аграрный университет».

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор В. В. Малашко;
доктор сельскохозяйственных наук, профессор Ю. А. Горбунов

ISBN 978-958-537-148-0

© Коллектив авторов, 2019
© УО «ГГАУ», 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	8
Глава 1. Значение биотехнологии в скотоводстве.....	10
Глава 2. Биотехнологические основы трансплантации эмбрионов.....	14
2.1. Оптимизация получения и подбора коров-доноров для трансплантации эмбрионов.....	14
2.1.1. Желательный тип скота и направление селекции.....	14
2.1.2. Признаки отбора коров-доноров и методы их оценки.	18
2.1.3. Организация выращивания и раздоя первотелок.....	20
2.1.4. Получение высокопродуктивных животных и отбор потенциальных коров-доноров.....	22
2.2. Синхронизация половой охоты у коров-доноров и телок-реципиентов.....	27
2.2.1. Программы по синхронизации:.....	28
2.2.1.а с использованием простагландинов.....	28
2.2.1.б с использованием прогестагенов.....	29
2.2.2. Факторы, обуславливающие успех программ по синхронизации охоты.....	30
2.2.3. Влияние синхронности охоты на эффективность эмбриотрансплантации.....	32
2.2.4. Синхронизация охоты у доноров и реципиентов с использованием простагландинов в сочетании с СЖК.....	35
2.2.5. Синхронизация охоты у доноров и реципиентов с учетом дня эстрального цикла и состояния яичников.....	37
2.2.6. Влияние стресс-фактора на синхронизацию охоты у телок-реципиентов.....	39
2.2.7. Результаты синхронизации охоты различными простагландинами.....	43
2.3. Основы гормональная регуляция фолликуло- и эмбриогенеза у коров-доноров.....	47
2.3.1. Эндогенная регуляция фолликуло- и эмбриогенеза....	47
2.3.2. Особенности эндогенной регуляции фолликуло- и эмбриогенеза при трансплантации эмбрионов.....	56

2.3.3. Вызывание множественной овуляции и факторы ее обуславливающие.....	61
2.3.4. Влияние экзогенных гонадотропинов на процессы фолликулогенеза.....	72
2.3.5. Динамика гормональной секреции у коров в зависимости от типа применяемого гонадотропина.....	78
2.3.6. Прогнозирование эффективности гормональной стимуляции суперовуляции у коров-доноров.....	87
Глава 3. Факторы, влияющие на эффективность гормональной обработки.....	94
3.1. Кратность и интервал между обработками.....	94
3.2. Суперовуляторная реакция коров-доноров различных пород.....	106
3.3. Влияние возраста донора и длительности сервис-периода на эффективность гормональной обработки.....	108
3.4. Результативность полиовуляции в зависимости от сезона года.....	110
Глава 4. Извлечение эмбрионов.....	113
4.1. Эффективность нехирургических методов вымывания эмбрионов.....	113
4.1.1. Влияние катетера и эффективность извлечения эмбрионов.....	113
4.1.2. Влияние количества промывной среды на выход эмбрионов.....	117
Глава 5. Влияние множественной овуляции и нехирургического извлечения эмбрионов на продуктивность и воспроизводительные качества коров-доноров и телок-реципиентов.....	118
Глава 6. Оценка жизнеспособности половых клеток крупного рогатого скота.....	123
6.1. Биологические основы получения качественных эмбрионов.....	123
6.1.1. Фолликулогенез.....	123
6.1.2. Оогенез.....	128
6.1.3. Сперматогенез.....	131

6.1.4. Оплодотворение.....	134
Глава 7. Предимплантационное развитие морфологическая оценка качества ооцитов и эмбрионов.....	140
7.1. Общие подходы к оценке качества клеток.....	143
7.2. Временные параметры развития эмбрионов.....	144
7.3. Морфологическая оценка качества ооцитов <i>in vitro</i>	144
7.4. Морфологическая оценка качества ооцитов <i>in vivo</i>	147
7.5. Эмбрионы.....	147
7.5.1. Общая оценка.....	147
7.5.2. Нормально развитые (полноценные) эмбрионы.....	147
7.5.3. Частично-дегенерированные эмбрионы.....	148
7.5.4. Дегенерированные эмбрионы.....	148
7.5.5. Морфологическая характеристика эмбрионов после их извлечения.....	148
7.5.6. Оценка жизнеспособности эмбрионов методом культивирования.....	151
7.5.7. Морфологическая оценка качества половых клеток...	154
7.5.7.а Ооциты <i>in vitro</i> (после извлечения из фолликула).....	154
7.5.7.б Ооциты и яйцеклетки <i>in vivo</i>	156
7.5.7.в Эмбрионы на ранних стадиях развития.....	161
7.5.7.г Морулы.....	165
7.5.7.д Бластоцисты.....	173
Глава 8. Биотехнологические аспекты криоконсервирования эмбрионов.....	189
8.1. Влияние различных способов криоконсервирования и деконсервации эмбрионов на их сохранность.....	211
8.2. Влияние некоторых факторов при замораживании и оттаивании эмбрионов на их приживляемость.....	213
Глава 9. Пересадка эмбрионов.....	226
9.1. Влияние различных факторов на приживляемость эмбрионов.....	229
9.1.1. Порода.....	229
9.1.2. Источник эмбрионов.....	232

9.1.3. Реципиент: корова или телка?.....	233
9.1.4. Возраст реципиента.....	234
9.1.5. Лактационный статус.....	234
9.1.6. История репродуктивного статуса.....	235
9.1.7. Кормление.....	235
9.1.8. Сезон года и климат.....	235
9.1.9. Стрессы.....	236
9.1.10. Стимуляция эструса.....	236
9.1.11. Квалификация специалиста.....	237
9.1.12. Глубина пересадки.....	238
9.1.13. Сторона пересадки.....	238
9.1.14. Метод пересадки.....	239
9.1.15. Уровень прогестерона.....	239
9.1.16. Лекарственные препараты и гормоны.....	239
9.1.17. Качество желтого тела.....	241
9.1.18. Влияние биопсии при определении пола на результативность эмбриопересадки.....	241
Глава 10. Биотехнологические методы получения телят- двоен.....	248
10.1. Пересадка одного эмбриона предварительно осемененному реципиенту.....	251
10.2. Пересадка двух эмбрионов одному реципиенту.....	257
10.3. Пересадка замороженно-оттаянных эмбрионов мясных пород телкам-реципиентам черно-пестрой породы.	264
10.4. Получение монозиготных телят-двоен.....	265
Глава 11. Биотехнологический метод получения эмбрионов in vitro.....	271
11.1. Факторы, влияющие на эффективность технологии in vitro.....	293
11.1.1. Взаимосвязь морфофункционального состояния яичников и способа выделения ооцитов с эффективностью получения эмбрионов in vitro.....	293

11.1.2. Влияние температуры среды и длительности кратковременного хранения яичников на выход и качество ранних зародышей.....	297
11.1.3. Влияние физиологического состояния доноров яичников на эффективность получения эмбрионов вне организма.....	298
11.2. Использование биологически активных веществ в культуральных системах <i>in vitro</i>	304
11.2.1. Эффективность использования фолликулярной жидкости в культуральных системах <i>in vitro</i>	304
11.2.2. Эффективность использования эстральной сыворотки в культуре <i>in vitro</i>	308
11.2.3. Оценка эффективности получения эмбрионов в системе <i>in vitro</i> в условиях разной концентрации CO ₂ в атмосфере.....	314
11.2.4. Влияние плотности ооцитов на единицу объема и площади при получении эмбрионов <i>in vitro</i>	318
11.3. Влияние условий оплодотворения на его эффективность.....	321
11.4. Сравнительная эффективность получения эмбрионов путем трансцервикальной аспирации (ОРУ) и из яичников доноров убитых на мясокомбинате.....	324
Глава 12. Продуктивные признаки и физиолого-этологические показатели телят-трансплантантов.....	331
12.1. Динамика живой массы и среднесуточные приросты..	331
12.2. Гематологические показатели и естественная резистентность.....	333
12.3. Физиолого-зоотехнические и этологические показатели.....	340
12.4 Показатели мясной продуктивности.....	345
Глава 13. Оценка быков-трансплантатов по спермопродукции.....	350
Глава 14. Рост, развитие и продуктивные качества телок и коров-трансплантантов.....	354
Библиографический список.....	401

ВВЕДЕНИЕ

За прошлое столетие в репродуктивных технологиях крупного рогатого скота произошли огромные изменения в сторону увеличения эффективности использования биологических возможностей сельскохозяйственных животных.

Так, 30-е – 40-е годы ознаменовались разработкой метода искусственного осеменения, которое совместно с методом криоконсервации спермы производителей сыграло неоценимую роль в развитии и селекции крупного рогатого скота, повысив интенсивность отбора быков и точность их оценки, это в свою очередь ускорило темпы селекции в 2-3 раза.

Обнаружение в крови жеребых кобыл сильного стимулятора половых гонад самок – гонадотропного гормона СЖК, установление циклорегулирующих свойств прогестерона, открытие простагландинов и гонадотропного релизинг - гормона позволило разработать основы гормональной регуляции воспроизводительных функций сельскохозяйственных животных.

Разработка радио и иммунологического методов оценки концентрации гормонов в сыворотке крови, а так же метода ультрасанографии заложили основы ранней диагностики беременности.

Открытие СЖК и установление ее роли в симуляции фолликулярного роста способствовали не только гормональной регуляции полового цикла но и послужили основой для разработки и внедрению в практику технологии трансплантации эмбрионов, открывшей новый этап в работе по повышению эффективности использования репродуктивного и генетического потенциала высокоценных животных. С возросшей интенсивностью использования матерей быков поднялась возможность более точной оценки их племенной ценности и создания семейств, создания криобанка эмбрионов редких и исчезающих видов животных; упростилась процедура международного обмена генетическими ресурсами.

80-е и 90-е годы отмечены разработкой методик клонирования животных, в результате использования которых стало рождение овцы Долли. В этот же период закладываются основы технологии получения потомства в культуре *in vitro*.

С ее разработкой открылись новые возможности не только по использованию репродуктивного потенциала животных но и по созданию вспомогательных репродуктивных технологий, направленных на создание животных с заранее запрограммированными качествами, способными производить необходимую для человека продукцию, являющуюся сырьем не только для молочной и для фармацевтической промышленности но и для биомедицины.

Материалы представленной работы направлены в первую очередь на удовлетворение интересов специалистов и научных работников занятых в области получения эмбрионов крупного рогатого скота или интересующихся данной проблемой и ее развитием.

ГЛАВА 1. ЗНАЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В СКОТОВОДСТВЕ

Две третьих быков-производителей, используемых для искусственного осеменения в странах с развитым животноводством, Северной Америке и Западной Европе, получены методом трансплантации эмбриона, а на некоторых станциях искусственного осеменения, их доля достигает 80-90%.

Маточное поголовье через своих сыновей оказывает значительное влияние на крупные популяции скота. Естественным путем от коровы получают по одному теленку в год при вероятности рождения 50% бычков. В связи с этим большое значение приобретает получение быков-производителей от меньшего числа, но более ценных в генетическом отношении коров. На что и направлена трансплантация эмбрионов.

Генетический эффект от трансплантации достигается прежде всего за счет улучшения точности оценки племенной ценности матерей, на основе повышения интенсивности отбора среди матерей отцов и матерей матерей.

При использовании данной технологии для получения следующего материнского поколения можно из популяции отобрать лишь 10% лучших коров, в то время как при традиционных способах воспроизводства матерями следующего поколения является 100% коров. Сокращение доли матерей с 100% до 10% в результате использования эмбриотрансплантации возможно при условии ежегодного получения до 10 телят от каждой коровы-донора. При таком отборе интенсивность селекции может увеличиваться в 9 раз.

Еще более значительное ускорение темпов воспроизводства высокопродуктивных племенных животных можно получить при использованием таких биотехнологических методов как: микрохирургическое деление и клонирование эмбрионов, определение пола, оплодотворение ооцитов *in vitro* /305/.

Таким образом, биотехнологические методы могут быть использованы:

- для ускоренного создания высокопродуктивных селекционных стад;
- для ускоренного создания выдающихся семейств коров-рекордисток в целях использования их как будущих матерей быков-родоначальников линий;
- для интенсивного размножения маточного или бычьего поголовья путем пересадки эмбрионов определенного пола;
- для увеличения выхода телят путем пересадки двух эмбрионов, с целью получения двоен (в основном в мясном скотоводстве);
- для получения идентичных двоен;
- для сохранения, быстрого и широкого распространения редких и исчезающих пород;
- для создания банка эмбрионов и накопления генетического материала с последующей трансплантацией.

При интенсивном использовании коров в крупных общественных стадах ежегодно до 30% животных выбывает из основного стада по целому ряду причин. В число таких коров нередко попадают и очень ценные животные. Метод трансплантации эмбрионов и в этом случае может дать неоценимую пользу, так как позволяет от таких генетически ценных животных дополнительно получать племенную продукцию. При использовании таких коров до 4...5 раз в год, можно иметь не менее 10-12 телят.

Даже при такой сравнительно небольшой интенсивности использования выдающейся по продуктивности коровы в качестве донора эмбрионов, всего лишь за 2 года от нее можно заложить высокоценное семейство и иметь достаточное количество племенных быков.

Несложные расчеты показывают, что, отобрав 50 коров, в прошлом рекордисток стада, и используя их в течение нескольких лет, только в качестве доноров, можно ежегодно от каждой получать минимум 16 полноценных эмбрионов и при

приживляемости 50%, от этой группы коров, можно иметь 180 телочек и 180 быков в год.

Таким образом, за очень короткий период времени от 50 рекордисток можно создать высокопродуктивное селекционное молочное стадо численностью 360-540 коров. При этом госплемпредприятие (элевёр) может быть пополнено таким же количеством высокоценных в племенном отношении ремонтных бычков.

В последние годы в мировой практике и в науке, биотехнологии уделяется много внимания как одному из фундаментальных биологических методов исследования воспроизводительных функций у животных. Животные, полученные биотехнологическим путем и имеющие общую наследственность представляют исключительную ценность и позволяют более точно анализировать проблемы физиологии, биохимии, генетики, иммунологии, воспроизводства, изучать влияние генетических кормовых факторов на эмбриональное развитие зародыша, определять причины гибели эмбрионов в предимплантационный и имплантационный периоды.

Использование в животноводстве метода получения идентичных и разнородных близнецов позволяет повысить выход потомства, дает возможность максимально использовать ценных коров-доноров, разрешить задачу точной оценки быков-производителей по качеству потомства, снизить себестоимость метода трансплантации эмбрионов.

Получение животных желательного пола является важной проблемой и имеет большое практическое значение. Это особенно важно для молочного скота, где главный признак молочной продуктивности – относится к признакам ограниченному полом и проявляется лишь у коров. Поэтому возникает задача регулирования соотношения полов.

Первые опыты в этом направлении были проведены в 1988 году. Точность оценки при этом составляла около 50%, а уже через 10 лет использование ДНК-технологий позволило повысить точность метода до 93-98%.

Уже с момента внедрения искусственного осеменения в сельскохозяйственное производство ученые и практики задумывались о возможности разделения по полу семени. А вот практическое исследование разделений по полу спермы стало возможным в 2003 году, когда американские ученые разработали соответствующую технологию разделения. Основанный на этой технологии метод размножения крупного рогатого скота позволяет получать на 100 отелов 90 телочек и приносить на каждый вложенный рубль до 3-хрублей прибыли, обеспечивать получение достаточного количества племенного молодняка для ремонта стада.

Параллельно развитию и совершенствованию метода трансплантации велись работы по изучению возможностей дальнейшего увеличения эффективности использования генетического потенциала маток, который по разным данным насчитывает около 700 тыс. потенциальных яйцеклеток. По результатам проведенных исследований было установлено, что ооциты, извлеченные из фолликулов и помещенные в соответствующие условия (температура, влажность, питательная и газовая среды и ряд других факторов) могут возобновлять свое развитие и созреть до стадии оплодотворения, оплодотворяться и доходить в своем развитии до предимплантационных стадий. После пересадки таких эмбрионов реципиентам рождаются полноценные телята.

ГЛАВА 2. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ

2.1. Оптимизация получения и подбора коров-доноров для трансплантации эмбрионов

2.1.1. Желательный тип скота и направление селекции

В хозяйствах Республики Беларусь разводят скот черно-пестрой породы, характеризующийся высокой молочной и хорошей мясной продуктивностью. По различным причинам мясное скотоводство широкого развития не получило. Нет оснований утверждать, что в обозримом будущем ситуация существенно изменится. Следовательно, основным источником получения говядины и единственным – молока остается скот двойного направления продуктивности.

Поэтому, желательно иметь таких животных, которые в молодом возрасте давали бы высокие приросты живой массы (от рождения до 18 мес. 850...950 г), при хорошем убойном выходе (56...58%) и выходе мяса в туше (80...82%), а коровы, начиная с первой лактации, показывали бы высокие удои (5...5,5 тыс. кг молока) при повышенном содержании жира (3,9...4,0%) и белка (3,2...3,3%).

Удои полновозрастных коров в популяции желательно поддерживать на уровне 6 тыс. кг молока за лактацию. Такую продуктивность можно получить от хорошо развитых животных (живая масса 580...630 кг) при относительно полноценном кормлении доброкачественными травянистыми кормами и сравнительно небольшом расходе концентратов (30% в годовом рационе). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что бычки, выращенные в условиях комплексов промышленного типа, отвечают вышеназванным параметрам по мясной продуктивности, а коровы отдельных племенных хозяйств и ферм – по молочной продуктивности. Однако в среднем по подконтрольному поголовью удои коров значительно ниже. Значит, в популяции черно-пестрого скота селекцию нужно

вести в направлении повышения молочной и сохранения на достигнутом уровне мясной продуктивности. Анализ селекционно-генетических параметров активной части популяции черно-пестрого скота в Беларуси показывает, что как фенотипическая, так и генетическая изменчивость основных признаков достаточна для успешного ведения селекции при чистопородном разведении с использованием лучшего генофонда родственных пород Западной Европы и Северной Америки.

Современный голштинский скот североамериканской селекции – лучшая специализированная молочная порода, которую широко используют во многих странах мира для улучшения местных популяций /104,253,257/. Живая масса коров составляет 650...700 кг, высота в холке – 142...145 см, быков, соответственно, 1100...1200 кг и 160...165 см. Коровы молочного типа, имеют хорошую форму вымени, приспособлены к двухразовому доению. Животные отличаются крепостью конечностей и копыт.

По молочной продуктивности коровы голштинской породы не имеют конкурентов среди других пород мира. В ряде исследований/138/ отмечается, что в 1980 году средний удой на корову по 1880 стадам составил 7716 кг молока с содержанием жира 3,67%. Средний удой 265,5 тыс. коров, записанных в племенную книгу в 1986 году составил 8534 кг молока с содержанием жира 3,63%, а 256,7 тыс. коров в 1987 году – 9117 кг /307/.

Мировые рекорды по молочной продуктивности также принадлежат коровам голштинской породы. Наивысший суточный удой (110,9 кг) зарегистрирован на Кубе у коровы Убре Бланке. Ею установлен и мировой рекорд годового удоя, равный 27674кг молока, или 1051 кг молочного жира. Рекорд по выходу молочного жира за лактацию и за всю жизнь (соответственно 1912 и 7153 кг) принадлежит корове из США Бризвуд Пэтси Понгиак; наивысший пожизненный удой (189 т за 17 лет) был у коровы № 289 из Канады /77/. О потенциальных возможностях голштинской породы свидетельствует и новый

рекорд по содержанию жира в молоке. От коровы Бренвуд Ангие Марлин в возрасте 5 лет за 305 дней лактации надоили 9325 кг молока, жирностью 9,8%, или 900 кг молочного жира /6/.

Одной из особенностей голштинской породы, которую необходимо учитывать при использовании и для улучшения отечественных пород, является сравнительно невысокая жирномолочность. В ряде исследований /188/ установлена отрицательная корреляция между жирностью молока и удоем. По данным Stout Y. /251/ среди шести молочных пород, разводимых в США, последнее место по жирномолочности занимают коровы голштинской породы. Американские селекционеры считают, что селекция по удою в большей степени сопровождается повышением выхода молочного жира и других питательных веществ за лактацию, чем селекция на процентное содержание их в молоке.

В исследованиях отдельных ученых /21,66/ отмечается, что у отдельных помесей снижается жирность молока, однако большинство исследователей считают, что в стадах со средней жирномолочностью содержание жира в молоке помесных коров не изменяется или несколько возрастает /6,115/.

Скрещивание черно-пестрого скота с голштинской породой оказывает существенное влияние на изменение типа телосложения и промеров статей полученных потомков. По данным Погодаева С.Ф., Гречко Ю.Ф. /70/, число коров, отнесенных к молочному типу, среди 1/4-кровных животных составило 37%, полукровных – 68, 3/4-кровных – 78 и 7/8-кровных – 100%. Анализ промеров статей экстерьера животных показывает, что по мере увеличения доли кровности по голштинской породе увеличиваются высотные промеры, растянутость туловища, и, как правило, обхват и глубина груди, улучшаются качественные характеристики молочной железы /34,114/.

Многих селекционеров мира привлекли высокие качества голштинского скота американской и канадской селекции в целях совершенствования местных молочных пород.

Согласно сообщениям Пелехатого Н. /66/, Прозоры К.И. и др. /74/, разводимый в Голландии черно-пестрый скот по уровню продуктивности соответствует современному европейскому голштинизированному типу скота при относительно высокой жирномолочности. При разведении голландского скота особое внимание уделяется максимальному использованию выдающихся чистопородных и помесных голштинских быков (более 63% от всего поголовья), повышению интенсивности отбора по составу молока, оценке воспроизводительных качеств производителей и их потомков. За 10 лет удой коров черно-пестрой породы в Нидерландах повысился на 1003 кг, содержание жира в молоке – на 0,09%, белка – на 0,04%.

На ближайшую перспективу поставлена задача довести среднегодовой удой на корову до 6500 кг молока при содержании жира 4,25% и белка – 3,75%.

Средняя степень голштинизации черно-пестрых быков ФРГ составляет 76,3%, нетелей – 53,5% /65/. У коров новой популяции немецкого черно-пестрого скота по сравнению со старым типом увеличились удой на 16%, выход молочного жира – на 23% и белка – на 17% при уменьшении расхода кормов на 10%.

Доминирующими породами в Англии (89,7% поголовья) являются голштинская и британо-фризская /255/. В процессе прилития крови голштинов специалисты тщательно отбирают животных наиболее желательного типа с тем, чтобы не терять положительных качеств британских фриз.

Таким образом, многочисленный опыт по преобразованию черно-пестрых пород скота западных стран показал, что селекцию животных необходимо вести не только в направлении повышения молочной продуктивности, но и в направлении улучшения типа скота, сохранения мясных качеств, повышения скороспелости, уменьшения расхода кормов и др. Эти качества в большей или меньшей степени были закреплены с использованием голштинского скота в британо-фризской, немецкой, датской и других западно-европейских породах.

2.1.2. Признаки отбора коров-доноров и методы их оценки

Основным селекционным признаком молочного скота является удой коров за стандартную (305 дней) или укороченную законченную лактацию (не менее 240 дней). Важное экономическое значение имеет жирность и белковость молока. Во многих странах Западной Европы цены на молоко формируются в зависимости от этих показателей. По-видимому, в ближайшем будущем и в Республике Беларусь белкомолочность станет экономически важным признаком молочной продуктивности. Поэтому уже сейчас в высокопродуктивных племенных стадах необходимо, наряду с жирностью молока, определять содержание в нем белка и учитывать величину его массовой доли при отборе коров-доноров /192/.

Величина удоя измеряется один раз в месяц за полный день путем контрольных доений, в процессе которых отбираются пробы молока для определения в них массовой доли жира и белка. Анализы выполняют независимые лаборатории на стандартизированных приборах типа Милко-Скан, Промилк, Милкотестер и др. Первый контрольный удой проводят через 10...20 дней после отела коровы, последний -за 10...20 дней до запуска.

В условиях индустриального производства молока важным селекционным признаком является интенсивность молокоотдачи. Ее определяют на 2...3 месяцах лактации после 1-го и 3-го отелов путем деления количества надоенного молока (кг) на затраченное при этом время (мин.). Контрольное доение проводят один раз в сутки не ранее 12 часов от предыдущего доения.

Взвешивание коров и оценку экстерьера проводят на 2...3 месяцах лактации. Оценку экстерьера и конституции коров проводит глазомерно после 1-го и 3-го отелов по 100-бальной шкале с обязательным указанием основных недостатков по отдельным статьям. Признаки породы и выраженность молочного типа коровы оценивается до 5 баллов, грудь – до 5,

холка, спина и поясница – до 5, зад – до 5 баллов. Обращается внимание на объем тела (длина, глубина, ширина) и высоту животного. Для получения высокой оценки корова должна иметь пропорциональное телосложение, крепкую конституцию и хорошо выраженный тип породы. Голова должна быть легкая, шея длинная прямая, с тонкой складчатой кожей. Грудь широкая, глубокая без перехвата и западин за лопатками; холка ровная, высокая; спина широкая, длинная, прямая; поясница широкая, прямая, плоская; зад широкий, длинный, прямой.

Вымя коровы оценивается до 40 баллов, в т.ч. за объем, форму и строение не более 15 баллов, переднюю часть вымени и прочность прикрепления к брюшной стенке – не более 10, за соски, их длину и толщину, расположение на вымени – не более 5 баллов. Наибольшую оценку за эту статью получает корова с большим железистым выменем с равномерно развитыми долями, чашеобразной формы, симметричное, умеренной длины, широкое и глубокое, без деления на четверти по бокам, имеющее тонкую, эластичную кожу, горизонтальное дно, широкие извилистые вены; передние четверти умеренной длины, ширины с прочным прикреплением к брюшной стенке, задние четверти пропорционально развиты, высоко подняты с прочным прикреплением; соски средней длины (6...8 см) и толщины, широко расположенные по квадрату, направлены вниз.

Передние и задние конечности оцениваются не более 15 баллов, в т.ч. передние не более 5, задние не более 5, и копыта не более 5 баллов. Учитывается крепость костяка, постановка ног, угол копыт и т.д. Лучшую оценку получают коровы с ногами средней длины, прямые, широко расставленные, имеющие прочные бабки; копыта широкие, правильно поставленные (передний угол 45°), копытный рог плотный, узкая копытная щель передних и задних ног.

2.1.3. Организация выращивания и раздоя первотелок

Одним из ведущих приемов в создании стад высокопродуктивных животных является выращивание молодняка. Забота о приплоде начинается с создания оптимальных условий для стельных, особенно сухостойных коров. Их кормят по полноценным рационам, рассчитанным на коров с суточным удоем не ниже 15 кг. Этот уровень обеспечивает нормальное развитие плода в утробный период и создает у коровы необходимый запас питательных веществ на предстоящую лактацию. После рождения ремонтные телки получают в среднем за молочный период 400 кг цельного молока и 500...600 кг обрат. Цельное молоко выпаивают до 80-дневного возраста, а обрат со второго месяца после рождения. До 6-месячного возраста каждому теленку скармливают 22 кг овсянки, 145 кг других концентратов, до 500 кг свеклы, 280 сенажа, 360 силоса и 100 кг сена.

Большое внимание уделяется выращиванию телок в послемолочный период, когда питательность суточного рациона составляет 5...7 корм. ед. В рацион телок до года входят: концентраты 1,5...2 кг, сено – 2,5...3, сенаж – 5...8, силос – 5...10 кг. Рацион телок старше года общей питательностью 7,5...8,5 корм. ед. содержит: концентраты 2,5...3 кг, сено – 2...2,5, сенаж – 10...20, силос – 10...15 кг. При этом на 1 корм. ед. приходится 95...100 г переваримого протеина.

Такое кормление обеспечивает нормальное развитие телок: в полгода живая масса их должна составлять 170...180 кг, в год – 290...300, в полтора – 390...400 кг. Телок осеменяют в 16...18-месячном возрасте при живой массе не ниже 380 кг.

За три месяца до отела из нетелей формируют специальные группы, которые закрепляют за лучшими доярками. В этот период животных особенно хорошо кормят (на уровне коров с суточным удоем 15 кг) и готовят к отелу. Ежедневно проводят массаж вымени, который прекращают за месяц до отела. После отела первотелок интенсивно раздоявают.

Раздаивание коров следует начинать после того, как их молочная железа придет в норму и рацион будет доведен до полного уровня в соответствии с удоями. На раздой выдают дополнительные корма (1...3 корм. ед.). Если на добавочный корм корова отвечает прибавкой суточного удоя, то количество кормов вновь увеличивают. Кроме того первотелка должна получать дополнительно 2,5...3 корм. ед. на прирост живой массы, из расчета 500 г в сутки. Принцип раздаивания взрослых коров остается тот же, что и первотелок.

При выращивании высокопродуктивных животных необходимо стремиться к тому, чтобы их живая масса превышала стандарт породы на 15...20%. Следовательно, живая масса коров-первотелок черно-пестрой породы должна составлять 550...570 кг, взрослых – 600...650 кг. Высокие требования предъявляются к экстерьеру коров и пригодности к машинному доению. Интенсивному раздоя подлежат только коровы, высоко оцененные по этим признакам.

В 1994 году в совхоз «Мухавец» Брестского района была завезена партия нетелей черно-пестрой породы немецкой селекции в количестве 25 голов. По первой лактации было раздоено 23 коровы (таблица 1).

Таблица 1 - Эффективность использования коров немецкой селекции

Группа животных	Кол-во гол.	Продуктивность					
		I лактация			II лактация		
		удой, кг	жир, %	белок, %	удой, кг	жир, %	белок, %
1. Черно-пестрые, импорт	23	5574	3,78	3,26	8138	4,2	3,4
2. Черно-пестрые, 1-й экологической генерации	10	6534	3,96	3,29			
3. Черно-пестрые, импорт	29	5740	4,11	3,17			
4. Симментальские, импорт	27	4706	4,08	3,35			

Средняя продуктивность по группе составила 5574 кг молока, жирностью 3,78% и белковостью 3,26%. Учитывая

адаптационный период, животные не смогли проявить полностью свой генетический потенциал, к тому же в хозяйстве не было опыта работы с таким высокопродуктивным скотом, что вызывало затруднения в создании для животных технологических условий содержания и кормления.

По второй лактации данные животные в среднем по группе дали 8138 кг молока, жирностью 4,23% и белковостью 3,40%. Из них 20 голов были взяты на учет как потенциальные быкопроизводящие коровы с продуктивностью в среднем по группе 8585 кг молока, жирностью 4,20% и белковостью 3,40%. Из этой группы 6 коров имели продуктивность в пределах 7...8 тыс. кг молока, 7 коров – 8...9 тыс. кг, 5 коров – 9...10 тыс. кг и 2 коровы с продуктивностью 10170 и 11141 кг молока, жирностью 3,90 и 4,13% соответственно.

Животные первой экологической генерации, полученные от завезенных нетелей, также имели достаточно высокие показатели по первой лактации. Так, средний удой по группе десяти первотелок составил 6534 кг молока, жирностью 3,96%, что выше средней продуктивности по группе матерей на 581 кг молока и 0,06% жира.

В 1996 году в племхоз хозяйство «Видомля» Каменецкого района также была завезена партия нетелей черно-пестрой и симментальской пород немецкой селекции в количестве 34 и 33 голов, соответственно. Как и в первом случае, период адаптации оказал отрицательное влияние на продуктивные показатели животных и не позволил проявить их генетический потенциал. Так, 29 коров черно-пестрой породы по первой законченной лактации дали в среднем по 5740 кг молока, жирностью 4,11% и белковостью 3,17%, 27 коров симментальской породы – 4706 кг молока, жирностью 4,08% и белковостью 3,35%.

2.1.4. Получение высокопродуктивных животных и отбор потенциальных коров-доноров

Высокопродуктивных коров – потенциальных доноров эмбрионов можно получить в племенных хозяйствах, в которых

ведется постоянная целенаправленная работа по разведению скота, отработана технология содержания и полноценного кормления маточного поголовья, имеются подготовленные кадры животноводов.

На получение коров-рекордисток большое влияние оказывают методы подбора пар. Наибольшая вероятность получить высокопродуктивную корову будет в том случае, если в ее родословной имеются животные с рекордными удоями. Чем больше в родословных животных-рекордисток, тем богаче генетический потенциал стада, тем выше возможность получить новых рекордисток. Для получения будущих коров-доноров нужно вести подбор быков-производителей, обладающих высокоценным генотипом. При подборе таких быков следует обращать внимание на наличие в его родословной, особенно в первых двух рядах, коров с выдающимися удоями, высокой жирностью и белковостью молока, а также на результаты их оценки по качеству потомства. Необходимо подбирать быков с гарантированным улучшающим эффектом по молочной продуктивности и типу телосложения, либо по одному из важнейших селекционных признаков.

В селекционно-племенной работе по выведению высокопродуктивных коров применяют в основном внутрилинейный подбор пар с использованием инбридинга различных степеней на выдающихся предков. Кросс линий допускается по мере необходимости, в основном при использовании быков улучшающих пород северо-американской и западно-европейской селекции.

Для получения донорского стада в хозяйствах, не имеющих достаточного опыта и условий по выведению высокопродуктивных животных, необходимо выделить группу лучших коров в отдельное помещение, поручить их наиболее квалифицированным дояркам, обеспечить кормами из расчета 6...7 тыс. корм. ед. в год, сбалансировать рацион по важнейшим элементам питания. При возможности завести группу телок из племенных заводов республики или из-за рубежа. Организовать индивидуальный подбор к ним лучших быков-производителей.

Коровы-доноры нужны, главным образом, для получения ремонтных быков, поэтому к ним предъявляются самые высокие требования, как по основным, так и по второстепенным признакам.

Для использования в качестве доноров коров отбирают по следующим основным критериям: селекционные признаки, воспроизводительный статус, состояние здоровья и возраст.

Селекционные признаки. Отбор коров проводят по результатам их оценки. Учитывая современные возможности племенных хозяйств и ферм целесообразно на ближайшие годы установить следующие минимальные требования к величинам селекционных признаков: удой – на 90%, содержание жира – на 0,2% и белка – на 0,1% выше стандарта пород. Значит, для коров черно-пестрой породы удой по 1 лактации должен составлять не менее 6180 кг, по II- 6840, по III и старше – 7600 кг молока с содержанием жира 3,8%, белка 3,2% и более; для коров симментальской породы – 5150, 5900 и 6700 кг, 4,0 и 3,4% соответственно. Скорость молокоотдачи – 1,8 кг/мин., оценка экстерьера – 80 баллов и более для коров обеих пород.

Отбор в группу доноров проводят в два этапа, начиная с первотелок. После их раздоя (всех в сходных условиях) отбирают коров, которые по молочной продуктивности приближаются к минимальным требованиям. Согласно приведенным выше формулам определяют абсолютную и относительную племенную ценность коров. Устанавливают классы животных по относительной величине продуктивного индекса (относительная племенная ценность), интенсивности молокоотдачи и балльной оценке экстерьера. В группу коров-доноров зачисляют животных, получивших классы выдающийся и элита-рекорд. Животных, получивших классы элита и 1, зачисляют в группу потенциальных матерей. И тех и других раздаивают по второй и третьей лактациям до более высоких удоев (8...9 тыс. кг молока), по третьему отелу вновь оценивают по экстерьеру и скорости молокоотдачи. По результатам раздоя и оценки селекционируемых признаков вновь комплектуют группу доноров.

При этом весьма желательно, чтобы по всем вышеуказанным признакам они отвечали требованиям классов выдающийся и элита-рекорд. В исключительных случаях определяющей является величина класса относительной племенной ценности по молочному жиру коровы.

У всех коров-доноров происхождение должно быть подтверждено данными генетической экспертизы. Коров с сомнительным происхождением в группу доноров не включают.

Воспроизводительный статус. Этот критерий – один из важнейших, поскольку корова, слабо реагирующая на гормональную обработку и дающая менее 4-х биологически полноценных эмбрионов за одно вымывание, не может быть использована в качестве донора из чисто экономических соображений. Исключение составляют особо выдающиеся животные.

Часто, отбираемые для трансплантации коровы имеют различные нарушения воспроизводительной функции: эндометрит, пиометрит, кисты яичников, гипофункция, сальпингит, многократное безрезультатное осеменение, неустойчивый или укороченный половой цикл и другие. Отбор среди таких животных связан с определенным риском и должен проводиться строго индивидуально с учетом генетической ценности коровы. О нормальном функционировании яичников свидетельствуют длительность полового цикла в пределах 17...24 дней. В случае продолжительного отсутствия признаков возбуждения проводят ректогенитальное обследование и гормонотерапию. Новотельных коров подвергают суперовуляции не ранее чем через 2 мес. после отела при отсутствии послеродовой патологии. В противном случае их лечат до проведения суперовуляции или бракуют.

Учитывая индивидуальные особенности суперовуляции, выявление доноров среди коров, подошедших по остальным признакам, проводится путем пробной гормональной обработки и вымывания. При отсутствии положительной реакции корову не переводят в доноры.

Состояние здоровья и возраст. В отличие от заболеваний воспроизводительной системы неосложненная патология других органов не препятствует получению от коровы нормальных эмбрионов. В качестве доноров могут быть использованы коровы после выбраковки по возрасту, в случае заболевания вымени и конечностей.

Таких коров относят к проблемным и, если они представляют интерес в генетическом отношении, принимают меры по их оздоровлению.

Возрастные рамки для доноров строго не ограничены. В Канаде в качестве доноров используют животных в возрасте от 20 мес. до 21 года. Однако предпочтительный возраст от 2...4 лактаций до 7...8 лет. У доноров 3...9 лет средний выход пригодных эмбрионов составляет 6,9, а 10...22 лет – 1,9 на донора. Кроме того, после 10-летнего возраста выживаемость эмбрионов снижается вследствие старения эндометрия.

Для получения ценного в племенном отношении потомства к донорам подбирают наилучших в популяции быков. Эту работу проводят комиссионно силами селекционеров хозяйств, племобъединений и селекционного центра. При закреплении быков руководствуются программой крупномасштабной селекции с белорусской популяцией черно-пестрого скота и планами племенной работы.

Подбираемая для региона группа коров-матерей быков должна быть генеалогически дифференцирована не менее чем на 4 неродственных группы с учетом возможности ротации быков.

Коров-доноров для криоконсервации эмбрионов локальных, исчезающих пород отбирают, исходя из задачи сохранения диапазона внутривидового генетического развития.

Особенности кормления коров-доноров. Рацион доноров в зависимости от наличия или отсутствия лактации мало отличается от рациона дойной или сухостойной коровы.

Для лактирующих животных особенно важно обеспечить полноценное сбалансированное кормление в период запуска, и в первые 3...4 месяца после отела, так как эти периоды соответственно совпадают с максимальным увеличением массы

плода и наивысшей молочной продуктивностью, на что расходуется большое количество питательных веществ.

При длительном использовании коров в программе трансплантации большинство из них со временем прекращают лактацию. Вследствие того, что многие доноры получают избыток концентратов, а технологические причины трансплантации требуют привязного содержания и ограничивают моцион, возрастает вероятность их ожирения. Это резко ухудшает эмбрио-продуктивность и затрудняет работу. Дозирование концентратов необходимо сочетать с неограниченным выпасом или дачей сена вволю. Общий принцип составления рациона для нелактующих доноров: поддерживающее кормление между суперовуляциями и усиленное при проведении суперовуляции (табл. 2). При суперовуляции норма концентратов для доноров соответствующей упитанности такая же, как для доноров тощей упитанности (в зависимости от живой массы).

Таблица 2 - Суточная норма концентратов для доноров в период между суперовуляциями, кг

Упитанность	Живая масса, кг		
	454...544	545...726	более 726
Ожирение	0	0	0
Соответствующая	2,3	2,7	3,6
Тощая	5,4	7,3	8,2

Умеренное кормление в сочетании с обязательным ежедневным моционом – залог длительного и эффективного срока эксплуатации коров-доноров.

2.2. Синхронизация половой охоты у коров-доноров и телок-реципиентов

Синхронизация охоты у доноров и реципиентов – важный элемент подготовки животных к получению и пересадке

эмбрионов /203,239/. При этом появляется возможность программировать всю работу по воспроизводству и трансплантации эмбрионов.

По технологии трансплантации в момент прихода в охоту донора необходимо иметь с таким же сроком от 5 до 10 реципиентов на каждого донора. Понятно, что подобрать такое количество реципиентов в спонтанной охоте в течение суток возможно лишь при наличии большого стада реципиентов. При малом числе реципиентов охоту необходимо стимулировать.

2.2.1. Программы по синхронизации

2.2.1a Использование простагландинов

- Двукратная инъекция простагландина не зависимо от дня полового цикла с интервалом 11-13 дней с двумя фиксированными осеменениями через 72 и 96 часов или одним осеменением через 80 часов после второй инъекции простагландина. Телок осеменяют на 10 часов раньше коров.

Смысл такой обработки состоит в том, чтобы ко второй инъекции простагландина иметь в фазе диэструса максимальное количество животных. При обычных обстоятельствах в любой, конкретный промежуток времени, примерно две трети животных стада находиться в фазе проэструса. Следовательно, большинство коров должно среагировать на первую инъекцию. У этих коров охота наступит через 2-5 дней после инъекции. На 11-13 день они будут находиться на 6-9 день цикла, а оставшиеся будут находиться на 6-15 дне цикла. Большинство из этих коров будет иметь в яичнике желтое тело, и вторая инъекция индуцирует синхронный эструс.

Данная программа используется в дойном стаде в тех случаях, когда нет возможности выявления коров в охоте или такие возможности ограничены. Она также хорошо зарекомендовала себя при работе с мясным скотом. 2-кратное введение препарата с интервалом в 10...12 дней между инъекциями позволяет стимулировать охоту у 90% телок. Особенно широко простагландины используются для вызывания

синхронизированной охоты у доноров и реципиентов при трансплантации эмбрионов, когда требуется максимальный приход животных в охоту в течение суток.

- *инъекция простагландина при наличии в одном из яичников желтого тела.*

Данный подход при стимуляции охоты приемлем в том случае если есть возможность фиксирования охоты, поскольку однократной инъекции простагландина недостаточно для осеменения животного в фиксированное время, без выявления охоты. При однократной инъекции простагландина приход в охоту составляет около 65%.

- *в первый день обрабатываются все циклирующие (не стельные) животные.* Те животные, которые приходят после обработки в охоту осеменяются, а оставшиеся на 12 день обрабатываются повторно и по приходу в охоту осеменяются.

Отличие этой программы от первой заключается в удешевлении стоимости обработки пропорционально числу животных, осемененных после первой инъекции простагландина.

- *в течение первых пяти дней осеменяют всех животных, которые в этом промежутке приходят в охоту. На 6-ой день всем оставшимся животным инъецируют простагландин и по приходу в охоту осеменяют.*

При использовании данной методики синхронизации охоты, в первые 10 дней приходит в охоту и осеменяется около 80% циклирующих животных. Данная программа выгодна и с экономической точки зрения: сокращается количество использованных простагландинов (гормональной обработке подвергается около 75% животных), не требуется ректальной пальпации, сокращается сервис–период.

2.2.16 Использование прогестагенов

Прогестагеновые препараты (в виде вагинальных спиралей или ушных имплантов), действуя как искусственное желтое тело, предотвращают выброс ЛН и овуляцию, способствуют формированию собственного желтого тела. После того как на 8-

12 день имплант удаляется гипофиз освобождается от ингибирующего действия прогестагенов и у животного через 24-36 часов наступает охота.

- **Ушной имплант.** День инъекции ушного импланта в сочетании с внутримышечной инъекцией норгестамета и эстрадиола валерата считается нулевым днем. На 9-10 день имплант удаляется при этом фиксированным временем охоты считается 48 и 56 часов после удаления импланта. Для повышения эффективности синхронизации за 48 часов до удаления импланта необходимо сделать внутримышечную инъекцию простагландина, что значительно повышает оплодотворяемость. С этой же целью при удалении импланта нециклирующим животным делается инъекция гонадотропина в дозе 400-600МЕ.

- **Вагинальная спираль (PRID, CIDR).** Использование вагинальных спиралей аналогично использованию ушных имплантов, с инъекцией или без простагландинов и гонадотропинов. Вагинальная спираль вставляется во влагалище на 8-12 дней.

Использование того или иного импланта зависит от возможности фиксации животного. Для инъекции ушного импланта необходимо наличие двух человек и фиксирующего станка, для вставки вагинальной спирали достаточно всего лишь прогона. Однако даже при гипотетической опасности заноса инфекции через кровь при вставке ушного импланта предпочтительней вставлять именно его, поскольку при вагинальных спиралях существует большая вероятность возникновения эндометрита.

2.2.2. Факторы, обуславливающие успех программ по синхронизации охоты

С целью получения максимальной выгоды, при выполнении программ по синхронизации охоты у коров и телок необходимо обратить пристальное внимание на следующие, эффектообразующие факторы:

- кормление. Недостаточное и не сбалансированное кормление приводит к потере веса (особенно в зимне-стойловый период), проблемам с возобновлением полового цикла после отела и как следствие – к анэструсу. Нехватка энергии в после отельный период приводит к снижению уровня оплодотворяемости от первого осеменения.

- сезон года. Наиболее благоприятным периодом года для проведения программ по синхронизации охоты является время, когда продолжительность дня составляет не менее 12-14 часов, а температура наиболее комфортна

для животного.

- кондиции животного. Лучше всего телок использовать в возрасте 14-15 месяцев с живой массой, составляющей 65% от массы взрослого животного (для голштинов). Для этого специалистам необходимо обеспечить соответствующий уровень кормления животного в первую очередь с рождения до 6-ти месяцев, поскольку проблемы с кормлением в этот период в последствии могут обернуться проблемами с оплодотворяемостью.

- интервал после отела. Коровы до 50-го дня после отела должны быть исключены из программ по синхронизации. Оптимальный промежуток это 60-70 дней. У молодых коров (первого и второго отела), по сравнению с половозрелыми, этот промежуток должен быть еще более продолжительным.

- условия отела. Во избежание после отельных осложнений санитарно-гигиеническое состояние места отела также как и санитарно-гигиеническое состояние фермера и ветврача должны соответствовать установленным нормам. Тяжелые отелы, как правило, сопровождаются задержанием последа, что становится причиной возникновения метритов.

- состояние стада. Перед проведением синхронизации должно быть оценено общее клиническое состояние всего стада

- наличие стрессов. Стрессы действуют достаточно негативно, когда случаются в лютеальную фазу цикла. При этом ингибируется секреция гормона ЛН, следовательно, и последующая овуляция, а также увеличивается эмбриональная

смертность. Поэтому, в течение трех недель до и после осеменения желательно животных не вакцинировать, не обезжировать, не дегельментизировать и не изменять рацион кормления.

- наличие пространства. Наилучшие результаты при синхронизации охоты достигаются при наличии просторного, свободного от ненужного хлама, не загроможденного посторонними предметами и хорошо освещенного помещения (пространства), где животные могли бы свободно передвигаться и общаться.

2.2.3. Влияние синхронности охоты на эффективность эмбриотрансплантации

Результаты приживляемости эмбрионов значительно повышаются при синхронности эстрального цикла донора и реципиента день в день или совпадении возраста эмбриона с днем эстрального цикла реципиента. При отставании возраста эмбриона от дня эстрального цикла реципиента на один день их приживляемость составляет 72%, на 2 дня 70%, на 3 дня 7%. При опережении возраста эмбриона на 1 день приживляемость составляет 65%, на 2 дня 50% и на 3 дня – 4% /183/.

В исследованиях Roria et.(2002) было установлено улучшение приживляемости эмбрионов у реципиентов с синхронизацией цикла по отношению к донору + 12 часов (таблица 3).

Schneider et. al. (1980) установил более высокий уровень приживляемости при хирургической трансплантации у реципиентов, охота у которых была на 12 часов раньше доноров по сравнению с теми, охота у которых была на 12 позже доноров. Hasler (1987) анализируя результаты 7000 пересадок не установил разницы по приживляемости у реципиентов с охотой плюс 36 часов по сравнению с донором или минус 12 часов. Значительно ухудшалась приживляемость при асинхронности циклов минус 24 часа и более. Такое влияние асинхронности половых циклов в ряде публикаций объясняется тем-то при суперовуляции эмбрионы развиваются немного быстрее, нежели

при обычном воспроизводстве. В более поздних исследования Hasler (2001) уже не отмечает разницы, при нехирургических пересадках при асинхронности цикла ± 24 часа ни при пересадке свежих, ни при пересадке заморожено оттаянных эмбрионов. При этом впервые было отмечено то, что требования по синхронности половых циклов являются одинаковыми как для молочного скота, так и для мясного, как для телок реципиентов, так и для реципиентов коров.

Таблица 3 - Синхронизация половых циклов донора и реципиента и приживляемость эмбрионов

Синхронность циклов (ч)	Кол-во пересадок	Уровень стельности
(-12) – (-24)	37	51,4 + 8,2
0 – (-12)	67	58,2 + 6,1
0	9	56,7 + 16,6
0 – (+12)	78	61,5 + 5,6
(+12) – (+24)	37	48,6 + 8,2
0 + 12	126	62,7 + 4,4
+12 - +24	102	50,0 + 4,9

Особенности синхронизации половых циклов доноров и реципиентов при работе с эмбрионами *in vitro* связаны с тем, что при определении охоты у реципиентов при трансплантации эмбрионов рефлекс неподвижности определяется как день -0. В системе же *in vitro* нулевым принято считать день оплодотворения. Поэтому нулевой синхронизацией является пересадка 7-дневных эмбрионов 8-дневным реципиентам, при этом синхронизация охоты 6-дневного реципиента по отношению к 7-дневному реципиенту будет – 48 часов, а не 24. И, как результат уровень приживляемости у 6-дневных эмбрионов значительно ниже по сравнению с 7-ми и 8-ми дневными (Hasler, 1998). В исследования Aoki et. al. (2004) пересадка *in vitro* эмбрионов 8-ми дневным реципиентам была более результативна по сравнению с пересадками 7-ми и 6-ти дневным реципиентам. По результатам многочисленных

исследований Lamb (2005) установил значительную разницу между 8-ми и 6-ти дневным реципиентам при пересадке экспандированных бластоцист. В то время как другие исследователи абсолютной точности в синхронизации охоты не придерживаются. Так как большинство эмбрионов собирается на 7 -й день. Поэтому во многих случаях практики определяют только является ли реципиент 6, 7, или 8-го дня цикла. При таком подходе понятие синхронности охоты будет определяться более широкими пределами и может находиться в пределах 1.5 и более дня. Поэтому другим подходом в определении синхронности заключается в подборе стадия развития эмбриона возрасту реципиента, а не возраста эмбриона - возрасту реципиента. В большинстве случаев возраст эмбриона очень точно и хорошо коррелирует с его возрастом, но в то же время от одного и того же донора часто получаются эмбрионы на разных стадиях развития. Данные об уровне их приживляемости при пересадке реципиентам разного дня цикла говорят о том, что поздние морулы показывают более высокую приживляемость при пересадке реципиентам с асинхронностью полового цикла в 24 часа по сравнению с бластоцистами 5-го или 6-го дня. При этом бластоцисты 6-го дня имеют относительно более низкую приживляемость при их пересадке реципиентам 6-го дня.

Таблица 4 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от синхронности эстрального цикла у донора и реципиента

Показатель	Синхронность эстрального цикла		
	+ 1	0	- 1
Число реципиентов	71	133	59
Пересаженных эмбрионов	71	133	59
Стельных реципиентов	50	108	33
Процент стельности	70,4	81,2	55,9

В наших исследованиях при точно синхронизированной охоте у реципиента с донором, приживляемость составила

81,2%, когда день эстрального цикла реципиента опережал на один день цикл донора, данный показатель составил 70%, а когда на день отставал - 55,9% (таблица 4).

2.2.4. Синхронизация охоты у доноров и реципиентов с использованием простагландинов в сочетании с СЖК

Многие исследователи для повышения эффективности синхронизации охоты комбинируют схему обработки коров-доноров и телок-реципиентов следующим образом: Вначале, без учета фазы полового цикла, всех отобранных животных обрабатывают прогестероном, а через 48 часов вводят простагландин. Большинство животных (86,8%) при этой схеме обработки приходят в охоту в течение 60 часов/280/.

Однако, несмотря на довольно высокую эффективность этого метода, значительное число животных выбраковываются, и в качестве реципиентов не используется в связи с отсутствием или слаборазвитым желтым телом.

В наших исследованиях, с целью преодоления этого фактора, сделана попытка применить простагландин в сочетании с СЖК. В племзаводе "Луч" Брестской области для этого было отобрано две группы телок черно-пестрой породы, достигших случного возраста.

Телкам-реципиентам первой группы на 9-15 день полового цикла вводили СЖК в дозе 400-500 И.Е. Через 48 часов инъецировали простагландин в дозе 500 мкг.

Вторую (контрольную) группу животных обрабатывали простагландином двукратно с интервалом между инъекциями 11 дней (табл. 5).

Отмечена некоторая разница между группами по числу животных, пришедших в охоту. В контрольной группе телок этот показатель был на 5,7% ниже по сравнению с опытной. При этом через 48 часов в опытной группе в охоту пришло 72,6% животных, а в контрольной на 21,6% меньше (51,0%).

Таблица 5 - Результаты индуцирования охоты различным способом

Показатель	Группы животных	
	СЖК+ простагландин (опыт)	Простагландин (контроль)
Обработано животных	79	113
Число животных, проявивших признаки охоты (n - %)	73-92,4	98-86,7
в том числе:		
через 24 часа (n - %)	2-2,7	5-5,1
через 48 часа (n - %)	53-72,6	50-51,0
через 72 часа (n - %)	18-24,7	43-43,9
Число животных, не проявивших признаки охоты (n - %)	6-7,6	15-13,3

Аналогичные результаты наблюдались по качеству желтых тел в яичниках у телок-реципиентов и по приживляемости эмбрионов после нехирургической пересадки (табл. 6).

Таблица 6 - Качество желтых тел и приживляемость эмбрионов в зависимости от способа синхронизации охоты у телок-реципиентов

Показатель	Группы животных	
	СЖК+ простагландин (опыт)	Простагландин (контроль)
Число животных в охоте	73	98
Количество животных с активным желтым телом в яичнике (n - %)	67-91,8	74-75,5
в том числе:		
отличного качества (n - %)	48-71,6	41-55,4
хорошего качества (n - %)	9-13,4	14-18,9
удовлетворительного качества (n - %)	10-14,9	19-25,7
Отсутствовали желтые тела в яичнике (n - %)	6-8,3	24-24,5
Пересажено эмбрионов	64	44
Стельных реципиентов (n - %)	39-60,9	20-45,5

Данные таблицы показывают, что животных с наличием желтого тела в одном из яичников в первой группе было больше на 16,2%, а число животных с отличным и хорошим желтым телом на 10,7%.

Уровень приживляемости эмбрионов в опытной группе превышал контроль на 15,4% .

Приведенный выше материал свидетельствует о том, что применение СЖК в сочетании с простагландином в период с 9-го по 15-й день полового цикла лучше активизирует эндокринную функцию яичников, и как следствие повышается количество животных с отлично развитыми желтыми телами. При этом 71,6% этих животных приходят в охоту через 48...72 часа.

2.2.5. Синхронизация охоты у доноров и реципиентов с учетом дня эстрального цикла и состояния яичников

Как упоминалось, выше при однократном введении простагландинов без учета дня полового цикла обеспечивается приход в охоту не более 65% животных, что связано со стадией развития желтого тела. С целью преодоления этого фактора, имеется целый ряд сообщений об эффективности практического применения двукратного введения простагландина с интервалом 10-11 дней независимо от дня полового цикла.

Эффективность второго способа определяется тем, что животные, не пришедшие в охоту после первой инъекции, перед повторным введением достигают середины полового цикла. Благодаря этому после двукратного введения простагландина через 48 часов 70% животных приходит в охоту и еще около 20...25% через 72 часа. Однако двукратное введение простагландина увеличивает гормональную нагрузку на половую функцию животных. Во избежание этого нами длительное время в условиях производства проводились исследования по изучению эффективности синхронизации охоты у телок с известным половым циклом дня полового цикла путем ректального исследования состояния яичников /63/. Для

выяснения эффективности этого способа и взаимосвязи состояния яичников перед введением простогландина и результатами синхронизации нами было отобрано три группы коров в зависимости от состояния яичников. В первую группу были включены животные с наличием четко выраженного функционирующего желтого тела, во вторую группу – животные с наличием желтого тела и со зреющим или уже созревшим фолликулом. В третью группу вошли животные с наличием в яичнике только фолликула или фолликула желтого тела предыдущего цикла (табл. 7).

Большее количество животных пришедших в охоту оказалось в первой группе 93,1%, незначительно ниже во 2-й группе 90,9%. Животные же с наличием в яичнике фолликула либо фолликула с желтым телом предыдущего цикла проявили признаки охоты хуже – 65,7%, что на 27,4% ниже, чем коровы первой группы и на 25,2%, чем второй. В первой группе через 48 ч. признаки охоты проявили 87,3%, во второй 69,3%, в третьей 49,3% животных. Остальные животные через 72 и более часов, причем по группам соответственно 5,8; 21,6; 16,4%. Количество коров, не проявивших охоту составило по группам 6,9; 9,1; 34,3%, соответственно.

Таблица 7 - Результаты синхронизации охоты у коров и телок в зависимости от функционального состояния яичников

Коровы			Телки		
Обработано, (n-%)	Пришло в охоту (n-%)	Не проявили признаков охоты (n-%)	Обработано, (n-%)	Пришло в охоту (n-%)	Не проявили признаков охоты (n-%)
29-100	27-93,1	8-9,6	148-100	141-95,3	7-4,7
33-100	30-90,9	3-9,1	107-100	89-83,2	18-16,8
35-100	23-65,7	12-34,3	93-100	58-62,4	35-37,8

По всем трем группам, телок количество животных пришедших в охоту от числа обработанных было различным. Разница между 1-й и 3-й группами составила 32,9% в пользу 1-й.

Большинство телок пришло охоту через 48 часов. В 1-ой группе через 48 часов проявили признаки охоты 91,1% телок, во второй и третьей 71,9; 55,7%, соответственно. Число животных проявивших признаки охоты через 72 ч. было незначительным и по группам составило: 4,2; 11,3; 6,7% соответственно. Не проявили признаков охоты в 1-ой группе 7 голов или 4,7%, несколько больше во второй группе – 18 голов или 16,8% и больше всего телок не пришло в охоту в третьей группы 35 голов или 37,8%.

Таким образом, наиболее целесообразно допускать к синхронизации животных с наличием в одном из яичников активно функционирующего желтого тела.

2.2.6. Влияние стресс-фактора на синхронизацию охоты у телок-реципиентов

При интенсивном и длительном воздействии различных стресс-факторов организм животных мобилизует защитные механизмы с целью сохранения состояния гомеостаза и поддержания основных жизненных функций на определенном уровне, за счет второстепенных функций /113/. При этом одной из первых страдает половая система.

Развитие половых желез и их функция регулируются тремя гонадотропными гормонами передней доли гипофиза. Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) регулирует развитие зародышевого эпителия. У самцов он поддерживает сперматогенез, у самок рост фолликулов и синтез эстрогенов. Лютеинизирующий гормон (ЛГ) стимулирует интерстициальные клетки, способствует завершению созревания яйцеклеток, вызывает овуляцию и образование желтого тела у самок и способствует секреции тестостерона, обуславливающего развитие вторичных половых признаков у самцов. Лютеотропный гормон (ЛТГ), или пролактин, участвует в образовании желтого тела. Основное назначение его – обеспечение секреции молока.

Половой цикл у животных помимо гормональной стимуляции подвержен также влиянию центральной нервной системы. Передняя доля гипофиза функционально тесно связана с гипоталамусом, в котором кроме центров регуляции размножения расположены также центры обмена веществ. Этими связями обусловлено стимулирующее или тормозящее влияние органов чувств и коры полушарий головного мозга на половые процессы. Гипоталамические центры, управляющие размножением, очень чутко реагируют на все отрицательные стимулы как метаболического, так и психического характера. Когда при мобилизации защитных механизмов гипофиз в состоянии стресса увеличивает секрецию адренокортикотропного гормона, необходимого для поддержания жизнеспособности организма, неизбежно снижается выработка других гипофизарных гормонов. Это связано с тем, что в такой критический период потребность в них организма резко снижается или совсем исчезает. К их числу относятся и половые гормоны. В результате стресса половые железы резко снижают свою активность. При этом в яичниках в период половой зрелости не созревают яйцеклетки, а овуляция не сопровождается признаками охоты или они выражены настолько слабо, что остаются незамеченными. Вследствие этого животные вовремя не осеменяются, в результате чего удлиняется сервис-период, возрастает процент яловости. Кроме того, следствием недостаточной гонадотропной активности может быть неполная имплантация зиготы, эмбриональная смертность, аборт, осложненные роды, задержание последа, эндометриты, метриты, приводящие в конечном итоге к бесплодию.

Перемещение животных из одного места в другое является одним из стресс образующих факторов и складывается из многих факторов: беспокойной обстановки при погрузке, в случае перевозки (крик, шум, необычный запах, подгон животных, большая мышечная и психологическая нагрузка), напряжения при движении (тряска, толчки), недостатка воды, корма и т. д.

Сила стрессовой реакции животных при транспортировке зависит от многих факторов: величины физической, психической и вестибулярной нагрузки, расстояния, продолжительности транспортировки и качества дорожного покрытия, климата, изменения привычного суточного стереотипа и др. Перечисленные факторы приводят к глубоким изменениям физиологических функций, к перенапряжению организма. О наступлении стресса при транспортировке животных свидетельствуют сдвиги в гормональной активности гипофиза и надпочечников, щитовидной железы, а также изменения морфологического и биохимического состава крови и показателей деятельности многих других органов систем.

Первые часы транспортировки характеризуются ярко выраженным возбуждением животных, которое постепенно сменяется сильным угнетением. При этом нарушается гомеостатическое равновесие многих физиологических процессов, происходят значительные сдвиги в обмене веществ. В крови повышается уровень гормонов гипофиза и надпочечников.

Опыты по определению влияния стрессов механического и физического характера на синхронизацию охоты и приживляемость эмбрионов, были проведены на 73 телках черно-пестрой породы /79/. Синхронизацию охоты проводили путем двукратного введения простагландина с интервалом между инъекциями 11 дней (табл. 8).

Животные были разбиты на две группы по 43 и 30 голов. Реципиентов второй группы за 12...24 часа до ожидаемой охоты перевозили автотранспортом на расстояние 4 км во вновь строящееся помещение. Первая группа телок оставалась на месте, и перевозились лишь на пятый день после охоты.

Из 30 телок второй группы с хорошо выраженными признаками охоты оказалось 21 или 70%, в первой группе соответственно, 39 телок из 43 или 90,7%. Существенной разницы во времени прихода в охоту в обеих группах не наблюдалось. Основная масса телок обеих групп пришли в

охоту через 48...72 часов (95%). Продолжительность проявления признаков охоты различалась незначительно.

Таблица 8 - Результаты синхронизации охоты и приживляемость эмбрионов с учетом влияния стресс-фактора

Показатель	Группы (n-%)	
	I	II
Количество животных в группе	43	30
Число телок:		
с хорошими признаками охоты	39-90,7	21-70,0
слабо выраженной охотой	2-4,6	1-3,3
охота отсутствовала	2-4,6	8-26,7
Качество желтого тела у телок на 7-й день цикла:		
отличное	24-58,5	10-45,5
хорошее	4-9,8	3-13,6
удовлетворительное	2-4,9	2-9,1
Желтые тела отсутствовали	9-21,9	7-31,8
Пересажено эмбрионов	12	10
Стельных реципиентов	7-58,3	3-30,0

Число животных с отлично развитыми желтыми телами в яичниках было на 13% выше в пользу телок первой группы. Отмечена тенденция увеличения числа удовлетворительных и хорошо развитых желтых тел в яичниках у животных второй группы.

На 7-й день полового цикла 12 телкам первой группы и 10 второй с отлично развитыми желтыми телами пересадили замороженно-оттаянные эмбрионы. Все эмбрионы были удовлетворительного качества. По истечению двух месяцев было установлено, что уровень стельности в группе телок, подвергшихся стрессу за день до ожидаемой охоты, оказался на 28,3% ниже, чем в первой группе.

Полученные результаты дают основание утверждать, что накануне предполагаемой охоты стресс оказывает

неблагоприятное влияние на приход в охоту, развитие и функцию желтого тела, и также снижает приживляемость эмбрионов после нехирургической пересадки.

2.2.7. Результаты синхронизации охоты различными простагландинами

В таблице 9 представлены результаты синхронизации охоты различными простагландинами. Всего было обработано 612 голов. Из данных таблицы видно, что с наиболее выгодной стороны проявили себя Эстрофан и Анипрост. После однократной обработки в первом случае в охоту пришло 67,6% реципиентов, стельными из которых стало 60 голов или 48,4%, во втором эти показатели составили 179гол. (67,6%) и 41гол. (56,2%), соответственно. Что касается синхронизации охоты с использованием Эстуфалана, то эффективность данного мероприятия значительно снизилась и составила 51,7% и 30,5%, соответственно.

Таким образом, использование для синхронизации охоты у реципиентов эстрофана и анипроста позволило повысить количество животных пришедших в охоту по сравнению с эстуфаланом на 15,9 %, а уровень стельности на 17,9% и 25,7%, следовательно, перед использованием простагландина его необходимо проверить на эффективность.

Таблица 9 - Синхронизация охоты различными простагландинами

Показатели	Простагландины		
	Эстрофан	Анипрост	Эстуфалан
Кол-во опытов, п	11	10	10
Обработано голов, всего	259	179	174
Пришли в охоту, п- %	175-67,6	121-67,6	90-51,7
Пересажено эмбрионов, п	124	73	72
Сильных реципиентов	60-48,4	41-56,2	22-30,5

В последнее время на рынке республики появился целый ряд препаратов нового поколения, регулирующих половой цикл животных и отличающихся как по эффективности, и четкости прихода в охоту в определенных временных рамках так и по их применению.

С целью синхронизации охоты у телок – потенциальных реципиентов нами использовались такие препараты как просольвин, биоэстровест и эструмат. Как показал анализ результатов исследований, представленных в таблице 10.

Таблица 10 - Эффективность и качество синхронизации охоты у телок-реципиентов

Показатели	Просольвин	Биоэстровест	Эструмат
Обработано голов, всего, п--%	91-100	106-100	32-100
Проявили признаки охоты, п-%	65-71,4	79-74,5	29-90,6
Продолжительность охоты, ч	10,6	14,5	10,0
Не проявили признаков охоты, п-%	26-28,6	27-25,5	3-9,4
Количество животных с наличием желтого тела в одном из яичников	39-60,0	50-63,3	19-65,5
в т.ч.			
отличное	16-41,0	15-30	5-86,3
хорошее	16-41,0	17-34	2-10,5
удовлетворительное	7-17,9	18-36	12-63,2
в среднем	4,55	3,9	3,6
Желтое тело с фолликулом в одном из яичников	18-27,7	10-12,6	5-17,2
Количество животных с кистозным преобразованием яичников	8-12,3	12-15,1	3-10,3
в т.ч.			
фолликулярная киста	4-50,0	2-16,7	2-66,7
лютеиновая киста	4-50,0	10-83,3	1-33,3

Стимуляция половой охоты эструматом позволяет повысить количество животных, проявивших признаки охоты после однократной инъекции до 90,6%, что выше по сравнению с просальвином на 19,2% и по сравнению с биоэстровестом на 16,1% при достоверной разнице $P \leq 0,001$, в то же время как по

количеству животных с наличием в одном из яичников желтого тела показатели находились практически на одном уровне (87,8, 88,6, 82,7% соответственно). При этом следует отметить тот факт, что при обработке всеми стимуляторами в одном из яичников на равне с желтым присутствовал фолликул таких животных при использовании просольвина оказалось на 7,6%, а при использовании экструмата на 10,4% выше. Такие животные к пересадкам не допускались. Те животные, у которых в одном из яичников имелось желтое тело подразделялись на три группы: животные с отличным желтым телом хорошим и удовлетворительным. Анализ полученных данных показывает, что в отличие от показателей эффективности стимуляции (количество животных, пришедших в охоту) качество охоты (качество желтого тела), эструмат показал результаты обратно пропорциональные. Так животных с отличным желтым телом при его использовании оказалось на 26,9 и 24,1 % меньше по сравнению с аналогичными показателями при инъекции просольвина и биоэстрвета, соответственно при высокой достоверной разнице ($P \leq 0,001$). В то время как количество животных с удовлетворительным желтым телом наоборот достоверно ($P < 0,001$) возрастало на 45,3% против 17,9 и 27,2% при обработке просольвином и биоэстрветом, соответственно.

Известно, что открытие, производство и использование синтетических аналогов простагландина F22 внесло существенные коррективы в технологии воспроизводства сельскохозяйственных животных и в первую очередь крупного рогатого скота. В частности с появлением синтетических аналогов появилась возможность целенаправленного регулирования и коррекции полового цикла маточного поголовья.

Однако наряду с положительными моментами использования синтетических простагландинов аналогов F2L существует и определенная негативная сторона их использования. Внешнее вмешательство в механизм эндогенной гормональной регуляции жизнедеятельности организма животного в т.ч. и половой функции может иметь

отрицательные последствия. Проявляющиеся в виде кистозного преобразования в яичниках вследствие дисбаланса гормонального фона животных. Как показывают результаты наших исследований при обработке животных разными био-ганадотропинами общее количество животных с кистами находилось примерно на одном уровне (10,3-15,1%).

При дисбалансе половых органов животного могут возникать двоякое нарушение фолликулогенеза и процессов овуляции. При отсутствии соответствующей концентрации ЛГ (пика) в предовуляторный период сопровождается дальнейшим развитием фолликула и его превращением в фолликулярную кисту или же противоположный процесс фолликул не овулирует, но внутри фолликула начинает образовываться частичное желтое тело (лютеиновая киста или ановуляторный фолликул).

Различие этих двух форм кистозного преобразования в яичнике заключается в том, что в случае фолликулярной кисты животное из потенциальных реципиентов исключается, в то время как в случае ановуляторного фолликула (в связи с высокой секрецией прогестерона) реципиенту можно пересаживать эмбрионы с достаточно высокой гарантией приживаемости.

Так вот в нашем случае при обработке биоэстровеом количество животных с фолликулярными кистами было ниже по сравнению с просольвином и эструматом на 33,3 и 50% соответственно. Тоже самое можно сказать о количестве животных с лютеиновыми кистами, но здесь лучшие показатели получены при использовании эструмата, который оказался ниже просольвином на 16,7 и 50% соответственно. Однако низкая выборка не позволяет сделать какие-либо конкретные выводы, хотя тенденция явно прослеживается. Таким образом, подводя итог эффективности синхронизации охоты потенциальных телок реципиентов, следует отметить, что при обработке животных просольвином пригодными к пересадке из пришедших в охоту признано 43 головы или 66,2%, биоэстровеом – 60 (80%) и при обработке эструматом - 20 (69,0%), следовательно, выбраковано

22 голов при использовании биоэстрвета 12 (15,2) и эстромата - 7 (17,2%).

Продолжительность охоты при обработке биоэстрветом оказалось на 3,9 и 4,5 часа выше по сравнению с просольвином и эструматом.

2.3. Основы гормональная регуляция фолликуло- и эмбриогенеза у коров-доноров

2.3.1. Эндогенная регуляция фолликуло- и эмбриогенеза

Широкому распространению и успешному применению в практике разведения крупного рогатого скота метода трансплантации эмбрионов существенно способствовали экспериментальные исследования, посвященные изучению закономерностей фолликулярного роста в яичниках млекопитающих. В результате этих исследований в настоящее время сложилось определенное представление о динамике фолликуло- и гаметогенеза, на основе которого разработаны схемы гормональной стимуляции функции яичников, позволяющие получить большое число синхронно развивающихся предовуляторных фолликулов.

Высшим регулирующим центром размножения является центральная нервная система с гипоталамусом, который морфофункционально связан с гипофизом и через инкреты его передней и задней долей оказывает влияние на все эндокринные железы, участвующие в соматических и вегетативных реакциях, обеспечивающих функцию размножения [17,147]. В многочисленных работах показано, что секреция гипоталамических нейrogормонов, также как и секреция гонадотропных гормонов гипофиза, контролируется по принципу обратной связи гормонами тех периферических эндокринных желез, функции которых она регулирует [25,76.]. Изменение динамического равновесия гормонов в организме самок вызывает у них нарушение воспроизводительной способности.

Образующийся в гипоталамусе гонадотропин-рилизинг-фактор вызывает высвобождение из передней доли гипофиза гонадотропных гормонов: фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ). Под влиянием тонической секреции ЛГ и ФСГ происходит созревание фолликулов, образование в них полости. Появляется фолликулярная жидкость, формируются оболочки фолликулов, превращаясь в Граафовы пузырьки. ФСГ стимулирует выработку внутренней текой фолликулов эстрогенных гормонов, а под совместным влиянием ФСГ и ЛГ происходит предовуляторное созревание фолликула и овуляция [23].

ФСГ у коров с нормальным половым циклом поступает в кровь непрерывно, однако уровень его концентрации в течение всего полового цикла (в зависимости от его фаз) имеет волнообразный характер. Так, Сорокин В.И [97] обнаружил, что содержание ФСГ увеличивается на 9-11-й дни цикла и объясняет это вероятным стимулирующим влиянием ФСГ на развитие фолликулов, которые начинают созревать при повторной гонадотропной стимуляции [79]. В последующем увеличение концентрации ФСГ происходит за 1-2 дня до охоты и в первые 12 часов охоты. Максимальный уровень ФСГ, наблюдаемый перед охотой, был $12,2 \pm 0,7$ мг/100 мл сыворотки. Другие исследователи наблюдали пик ФСГ примерно через 28 ч после предовуляторного выброса ЛГ [124]. Этому пику отводят роль инициатора созревания новых фолликулов в следующем цикле. Леткевич Л.Л. и др. [112] показывают, что содержание ФСГ в плазме крови коров в период охоты было $1,64 \pm 0,52$ нг/мл. К 6-му дню цикла оно снижалось до $1,36 \pm 0,56$ нг/мл, а затем увеличивалось и к 19-му дню цикла достигало $1,92 \pm 1,02$ нг/мл.

Динамика концентрации ФСГ в крови коров в исследованиях Алиева А.А. [1] имела пульсирующий характер. При этом отмечено три волны ФСГ: первая - на 4-6-й дни после окончания охоты ($1,4 \pm 0,3$ нг/мл); вторая на 9-10-й дни и достигает такой же величины. Наибольшую величину ($1,8 \pm 0,3$ нг/мл) имела третья волна секреции ФСГ (15-18-й дни цикла)

после чего концентрация ФСГ снижалась до базального уровня ($0,5 \pm 0,1$ нг/мл) и затем происходил предовуляторный выброс гормона, совпадающий по времени с выбросом ЛГ.

По данным ряда авторов [25, 75, 76] содержание ЛГ в крови коров в первые 3 дня цикла остается на низком уровне. Затем его концентрация с некоторыми колебаниями в сторону уменьшения к 7-му дню резко повышается, достигая значительной величины к 9-му дню цикла. С 13 по 17-й дни содержание ЛГ вновь снижается. Последний его подъем происходит перед началом эструса, достигая выше средней величины, и резко снижается через 12 часов, что свидетельствует о прошедшей овуляции. Начало фазы желтого тела сопровождается низкой амплитудой ($0,3 - 1,8$ нг/мл), середина фазы – амплитудой $1,2 - 7,0$ нг/мл [17]. Другими исследователями [24] показано, что концентрация ЛГ в период охоты составила $4,4 \pm 0,67$ нг/мл и к 6-му дню повысилась до $5,3 \pm 0,78$ нг/мл, а к 15-му дню отмечалось снижение до $4,5 \pm 0,13$, к 19-му - до $5,0 \pm 0,28$ нг/мл. Исследования, проведенные Алиевым А.А. и др. [1], свидетельствуют о том, что концентрация ЛГ достигает пика во время стадии возбуждения ($9,5 \pm 4,5$ нг/мл), затем резко снижается до базального уровня ($1,0 \pm 0,3$ нг/мл). Примерно на 8-е сутки полового цикла она кратковременно повышается (до $2,8 \pm 1,2$ нг/мл), затем вновь поддерживается на базальном уровне.

Максимальная концентрация ЛГ достигается перед овуляцией (предовуляторный пик ЛГ) и составляет по разным данным $8,7$ нг/мл, 19-35 [256], 50-65 или даже 100 нг/мл. Предовуляторный выброс ЛГ вызывает лютеинизацию клеток зернистого слоя и внутренней теки фолликула. В это же время созревает ядро ооцита. Овуляция у коровы начинается примерно через одинаковый интервал после естественного пика ЛГ [244]. Этот интервал соответствует времени, необходимому для завершения созревания ядра ооцита.

Роль пролактина в регуляции половой цикличности у коров до конца не изучена.

Давно обнаружено, что при добавлении в среду для культивирования ФСГ, последний индуцирует появление в клетках гранулезы рецепторов к пролактину. При этом под действием ЛГ количество рецепторов к пролактину повышалось, а введение самого пролактина увеличивало скорость образования рецепторов к ЛГ [39]. Предполагают, что пролактин тормозит регуляторные процессы в теке и гранулезе фолликула [215]. Сорокин В.И. [97] отметил, что у телок, отличающихся гиперсекрецией пролактина, не отмечено ни одного случая развития фолликула, закончившегося овуляцией. При этом показано, что у нормально циклирующих коров эструс реализуется при минимальных уровнях пролактина (1,8-4,1 нг/мл). Высокий уровень пролактина в фолликулярной жидкости коррелирует с низким содержанием ФСГ и эстрогенов. При этом вдвое уменьшается содержание клеток гранулезы на фолликул, 75% ооцитов имеют признаки дегенерации и неспособны к реинициации мейоза [214].

Следует отметить, что в настоящее время сложилось определенное представление о том, что действие пролактина на ткань яичника сопровождается модификацией ряда процессов цитодифференцировки фолликулярных клеток, как правило, сопровождающееся нарушением гаметогенеза [39].

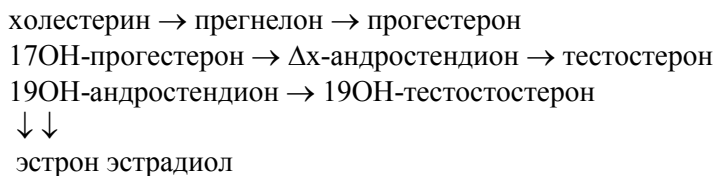
Количество пролактина в крови лактирующих животных тесно связано с функциональным состоянием молочной железы. Однако некоторыми исследователями [102] установлено, что пролактин оказывает влияние не только на молочную железу, но и на многие другие органы, изменяя и направляя общий обмен веществ в организме. Пролактин, поступивший из аденогипофиза в кровь, частично связывается с сывороточными белками. При этом связанный пролактин не поглощается молочной железой, в то время как свободный, взаимодействуя с молочной железой, через 15 минут распадается в ней. Роль связанного с γ -глобулином крови пролактина не ясна.

Рост и развитие фолликулов протекают под контролем гонадотропных гормонов гипофиза с момента образования 4-го слоя гранулезных клеток. С развитием фолликула

эпителиальные клетки гранулезы, дифференцируясь, начинают секретировать фолликулярную жидкость, которая по мере накопления формирует полость. С момента образования полости фолликул начинает секретировать половые гормоны, концентрация которых достигает максимального уровня в организме на стадии его полного созревания [23].

Исходным материалом для биосинтеза всех половых гормонов является холестерин. Основным этапом в процессе биосинтеза половых гормонов является образование из холестерина прегненолона. Прегненолон и образующийся из него прогестерон служат исходными соединениями для двух различных путей образования в яичниках эстрогенов и андрогенов. Следует отметить, что их образование из прогестерона осуществляется в основном гранулезными клетками фолликулов, а из прегненолона - в тека клетках [23].

Схема синтеза половых гормонов из холестерина выглядит следующим образом:



Профиль половых гормонов в течение эстрального цикла коровы характеризуется подъемом уровня прогестерона в лютеиновую фазу и эстрогеновым пиком в фолликулярную фазу.

По времени появления пиков эстрадиола в цикле выделяют 3 критических периода: лютеотропный, лютеолитический и предовуляторный. В течение этих периодов повышение уровня эстрадиола по обратной положительной связи стимулирует секрецию гонадотропинов гипофиза [40,97]. Так, Шамаров А.В. и др., Callesen H. et al. [24] обнаружили увеличение концентрации эстрадиола к 9-му дню полового

цикла с $0,16 \pm 0,02$ нг/мл до $0,19 \pm 0,09$ нг/мл. Второй максимальный подъем ($0,25 \pm 0,02$ нг/мл) был на 17-й день полового цикла, и третий перед овуляцией – составил $0,16 \pm 0,01$ нг/мл. По данным Шановой О.Н. [108], пик эстрадиола наблюдается в день перед очередной охотой – $39,3 \pm 2,8$ пг/мл. В день охоты концентрация гормона была $22,6 \pm 1,6$ пг/мл, затем наблюдалось снижение концентрации эстрадиола-17 β до $12,7 \pm 1,7$ пг/мл. На 5-й и 10-й дни отмечены подъемы, равные $21,3 \pm 1,5$ и $22,6 \pm 3,4$ пг/мл соответственно. В остальные дни полового цикла содержание гормона было в пределах $13,5 \pm 2,1$ пг/мл – $17,1 \pm 1,7$ пг/мл. Другими исследователями [1] отмечается предовуляторное повышение секреции эстрадиола за 1-2 суток до наступления стадии возбуждения (до $19 \pm 4,7$ пг/мл), затем снижение до базального уровня ($5,1 \pm 1,5$ пг/мл) и волнообразное повышение на 5-7-е сутки ($10,7 \pm 3,2$ пг/мл) после охоты. Нежданов А.Г. и др. [15] сообщают, что в период проявления всех феноменов стадии возбуждения, концентрация эстрадиола в крови коров составляет от 15 до 35 пг/мл. Более высокий уровень эстрадиола (30-55 пг/мл) выявляется в начале формирования стадии возбуждения.

На поздних стадиях фолликулогенеза эстрадиол синергично с ФСГ вызывают образование в клетках гранулезы рецепторов к ЛГ. Фолликулы, имеющие недостаточное число рецепторов ФСГ и продуцирующие мало эстрадиола, не способны реагировать на ЛГ и овулировать, что приводит к их атрезии [78,147].

Андрогены, в частности тестостерон, продуцируются текой и гранулезой фолликула. Их биологическое значение в процессе регуляции овариальной функции у коров изучено недостаточно. По-видимому, андрогены являются важным субстратом ароматизации в микросомах гранулезы в эстрогены [78].

Некоторые исследователи отмечают, что ФСГ, действуя через мембранные рецепторы гранулезы клеток, стимулирует активность фермента ароматазы, превращая андрогены в

эстрогены, что сопровождается ростом малых антральных фолликулов до преовуляторных [14]. ЛГ через аналогичные рецепторы действует на клетки тека-интерна, интерстициальные или стромальные клетки, стимулируя синтез андрогенов, которые диффундируют в гранулезу для последующего превращения в эстрогены.

В динамике секреции тестостерона у коров отмечается низкое содержание гормона в течение полового цикла. На 11-13 дни после эструса отмечается кратковременный пик тестостерона [97]. Шамаровым А.А. и др. [24] отмечается снижение концентрации тестостерона с $0,19 \pm 0,01$ нг/мл в период охоты до $0,15 \pm 0,02$ и $0,14 \pm 0,01$ нг/мл к 9-12-му дням полового цикла, соответственно. К 17-му дню цикла концентрация его возрастает до $0,17 \pm 0,01$ с последующим снижением до $0,14 \pm 0,01$ и увеличением в период охоты до $0,18 \pm 0,01$ нг/мл. Другие исследователи отмечают, что содержание тестостерона в период охоты равняется $960,0 \pm 133,0$ пмоль/мл или 45-120 пг/мл [17].

Фолликулярная фаза полового цикла завершается овуляцией доминирующего фолликула. Специфическим стимулом для разрыва фолликула служит повышение внутрифолликулярного давления, истончение стенки Граафова пузырька и раздражение нервных рецепторов, индуцирующих выброс окситоцина из задней доли гипофиза, который стимулирует сокращение стенок фолликула и обеспечивает его разрыв. Установлено, что стенка фолликула, выступающая над поверхностью яичника, истончается под влиянием лизосомальных энзимов и гиалорунидазы, одним из источников которых является матка.

Крупный фолликул секретирует также и некоторое количество прогестерона. Увеличение концентрации эстрогенов в сочетании с малыми дозами прогестерона обуславливает выброс ЛГ, что ведет к овуляции и образованию желтого тела [23]. ЛГ стимулирует дифференцировку лютеиновых клеток и биосинтез прогестерона. Эффект ЛГ на процесс лютеинизации усиливается пролактином. Пролактин способствует

образованию рецепторов ЛГ и, тем самым, обеспечивает высокую чувствительность лютеиновых клеток к низким концентрациям ЛГ, выявляемым в данной фазе цикла [81,256].

Таким образом, на месте лопнувшего фолликула образуется желтое тело, которое с 3-4-го дня начинает активно секретировать прогестерон. Среди половых гормонов прогестерон является преобладающим в течение большей части полового цикла коровы. Содержание прогестерона в период охоты невелико (0,1-0,8 нг/мл) [15, 150] и повышается в фазу желтого тела в среднем до 5 нг/мл, достигая максимума 6-7 нг/мл в ее конце [150,174]. Данные опытов некоторых исследователей свидетельствуют о резком падении уровня гормона в крови коров за 1-4 дня до начала охоты [144,148]. Это падение начинается между 16-м и 19-м днями цикла. У некоторых коров концентрация прогестерона в крови снижалась с 10 до < 1 нг/мл за полдня, у других этот процесс длится не менее 2-х дней. Содержание гормона сохраняется на том же уровне до формирования желтого тела во время овуляции [11].

Другими исследователями [24] показано, что в период активной половой охоты концентрация прогестерона составляет $2,5 \pm 0,59$ нг/мл. В дальнейшем его содержание увеличивается и к 9-му дню цикла составляет $9,96 \pm 0,9$ нг/мл. Наивысший уровень прогестерона отмечается на 12-й день цикла ($12,24 \pm 0,71$ нг/мл), после чего содержание его на 19-й день резко снижается (в 12,7 раза) перед незначительным подъемом в фазу охоты ($1,86 \pm 0,39$ нг/мл). Сорокин В.И. [97] отмечает, что уровень секреции прогестерона с 7-го до 15-го дня полового цикла, при наличии хорошо пальпируемого желтого тела был наивысшим и составил 3,8 - 6,0 нг/мл. Алиев А.А. и др. [1] обнаружили резкое снижение концентрации прогестерона за 3-4 дня до наступления стадии возбуждения (с $7,6 \pm 1,6$ до $0,99 \pm 0,54$ нг/мл). Содержание этого гормона в период охоты и около 4-х суток после нее было $1,85 \pm 0,76$ нг/мл, а на 9-10-е сутки составило $5,3 \pm 0,5$ нг/мл. Нейфельд В.Г. [60] в своих исследованиях показал, что максимальная концентрация прогестерона у коров обнаружена

на 11-й день полового цикла и составила $5,3 \pm 0,85$ нг/мл. В исследованиях Хилькевича С.Н. и др. [12] начало формирования желтого тела сопровождалось увеличением концентрации прогестерона к 7-му дню полового цикла до 1,8 нг/мл.

Большую роль в регуляции гормональной функции яичников играет кора надпочечников, функция которой контролируется адrenокортикотропным гормоном (АКТГ) гипофиза. Полагают, что он действует на энзимные системы, под влиянием которых происходит превращение холестерина в прегненолон и секреция андрогенов [23]. Избыточная продукция гипофизарных гонадотропинов оказывает стимулирующее влияние на функцию коры надпочечников, в частности, при выключении гормональной функции яичников.

Анализ данных по содержанию кортизола в крови телок в течение эстрального цикла показывает, что в день охоты концентрация этого гормона не превышает $45,1 \pm 5,8$ нг/мл, а к 6-му дню снижается в 2,8 раза. Наивысший подъем кортизола отмечается на 17-й день цикла ($45,9 \pm 9,94$ нг/мл) с последующим снижением до $22,4 \pm 5,18$ нг/мл к периоду, предшествующему охоте. Ко времени половой охоты отмечается новая волна подъема уровня кортизола до $38,0 \pm 5,3$ нг/мл [24]. Сорокин В.И. [97] и Бриль Э.Е. [7] показали, что максимальное содержание кортизола наблюдалось в крови телок в период охоты (10,9 нг/мл). Медведев Г.Ф. и др. [57] в своих исследованиях отмечают связь уровней прогестерона и кортизола.

Для полноценной реализации действия половых гормонов необходимо нормальное функционирование щитовидной железы [83]. По сообщениям ряда авторов, при гипотиреозе оказываются блокированными многие ферменты, регулирующие процесс метаболизма эстрогенов. Имеются указания на снижение чувствительности яичников к гонадотропинам при недостаточности функции щитовидной железы. В литературе содержатся сообщения [49], что при удалении щитовидной железы у самок частично или полностью нарушается процесс

овуляции и созревания желтого тела, задерживается рост и развитие фолликулов.

Концентрация тироксина в период охоты находится в пределах $54,7 \pm 4,7$ нг/мл. К 6-му дню цикла его количество в крови коров снижается до $43,2 \pm 1,9$ нг/мл, а к 9-12-му дням увеличивается до $49,5 \pm 2,7$ нг/мл. Второй пик отмечается на 19 день цикла ($53,0 \pm 0,25$ нг/мл) [24].

Таким образом, регуляция репродуктивных процессов у коров осуществляется на основе взаимодействия гормонов гипофиза, половых желез, надпочечников, щитовидной железы. Уровни секреции этих гормонов являются источником информации о функциональной активности соответствующих желез внутренней секреции в различные периоды полового цикла. Следует отметить недостаточное число работ об одновременном изучении количественного состава гонадотропных гормонов, стероидов яичника, гормонов щитовидной железы и надпочечников в крови коров в течение полового цикла. Мало данных о значении и динамике секреции тестостерона и пролактина. Кроме того, невозможно сделать убедительных заключений об уровнях тех или иных гормонов в крови подопытных животных, так как авторы применяют различные методики их определения. Все это послужило причиной для изучения влияния экзогенных гонадотропинов на особенности секреции эндогенных гормонов.

2.3.2. Особенности эндогенной регуляции фолликуло- и эмбриогенеза при трансплантации эмбрионов

Характерной особенностью любого живого организма является его способность к саморегуляции всех жизненных процессов, которая осуществляется за счет деятельности нервно-эндокринной системы, посредством которой она реагирует на изменения внешней и внутренней среды. Хотя в этом отношении половая система до определенной степени является автономной (имеет свои эндокринные железы), она

подчиняется общим закономерностям регуляции жизненно важных функций организма [17]. Любое вмешательство из вне вносит в этот процесс определенный дисбаланс. В связи, с чем особый интерес вызывает изучение механизма гормональных взаимодействий и гормональной секреции у коров, подвергнутых обработке гонадотропными препаратами с целью вызывания суперовуляции. Изучение этого вопроса будет способствовать выявлению механизмов стимуляции множественного роста фолликулов у этих животных /79/.

С этой целью нами был проведен опыт по изучению особенностей эндогенной секреции у доноров в период предшествующий гормональной обработке (спонтанный половой цикл), во время гормональной обработки и в период формирования суперовуляторной реакции (табл.11).

Как показали результаты проведенных исследований динамика секреции прогестерона, кортизола, тироксина и ФСГ в спонтанный и стимулированный половые циклы имела тождественный характер.

Так концентрация прогестерона как в одном так и во втором случае с 0-го по 7-й день увеличивалась с 0,28 мг/мл до 1,74 мг/мл (т.е. в 6,2 раза) и с 0,29 до 8,68 мг/мл (29,9 раза), соответственно.

Концентрация кортизола, тироксина и ФСГ на 6-й день по отношению к 0 дню уменьшалась с следующим увеличением к 7 дню. Что касается эстрадиола, тестостерона ЛГ и пролактина характер их секреции в спонтанный и стимулированный цикл имел существенные различия. Так, концентрация эстрадиола в период предшествующий гормональной обработке увеличивалась с 27,2 до 47,6 пг/мл в то время как в стимулированный его значение падало с 66,2 до 61,5 пг/мл с последующим увеличением до 76,1 пг/мл., уровень тестостерона в спонтанный цикл практически не изменялся и оставался на уровне 0,15 пг/мл. на шестой день индуцированного полового цикла его концентрация по сравнению с днем охоты увеличилась практически в 2 раза, оставаясь на таком же уровне и на 7-ой день. Спонтанный цикл в отличии от ЛГ

характеризуется снижением его уровня к шестому дню с последующим ростом к седьмому. В то время как в период после гормональной обработки уровень ЛГ постоянно снижался.

Таблица 11 - Общая динамика секреции гормонов до, в период и после стимуляции множественного роста фолликулов

Гормон	Половой цикл									
	До стимуляции (спонтанный)			В период стимуляции				После стимуляции		
	Дни полового цикла									
	0	6	7	10	11	12	13	0	6	7
Прогестерон, мг/мл	0,28	1,33	1,74	4,11	3,89	3,22	0,36	0,29	6,81	8,68
Эстрадиол, мг/мл	27,2	35,79	47,5	69,0	65,1	61,1	75,8	66,2	61,5	76,89
Тестостерон, мг/мл	0,15	0,15	0,15	0,19	0,18	0,25	0,24	0,25	0,31	0,3
Кортизол, мг/мл	8,82	5,02	6,5	5,63	17,5	13,4	14,8	13,3	6,09	7,99
Тироксин, мг/мл	39,2	32,4	34,5	36,7	36,6	39,0	39,2	41,86	33,7	35,21
ФСГ, МЕ/л	0,76	0,39	0,57	-	0,34	0,8	0,93	0,87	0,45	0,67
ЛГ, МЕ/л	1,51	1,11	1,48	-	1,19	0,97	1,16	1,56	1,08	0,97
Пролактин, мг/мл	1,83	2,6	1,97	-	1,47	2,01	2,05	1,99	1,12	1,36

Характер секреции пролактина в спонтанный половой цикл нашел свое зеркальное отражение в стимулированном. В первом случае на шестой день цикла концентрация гормона превышала его концентрацию в 0 день и на 7 ой на 31,9%, во втором наоборот было ниже нулевого дня на 43,7% и седьмого на 17,6%. Еще необходимо отметить тот факт, что формирование и рост нескольких фолликулов, а затем и желтых тел изменяло не только характер динамики секреции гормонов в стимулированный половой цикл, но и их концентрацию в кровь. Так, уровень прогестерона был выше в 5 раз эстрадиола (в зависимости от дня цикла) в 1,6-2,4 раза, тестостерона в 1,7-2,0 раза, кортизола на 22-51% концентрация остальных гормонов хотя и не так показательно, однако тоже увеличивалась.

Обнаружена отрицательная корреляционная зависимость реакции яичников коров на экзогенные гонадотропины и количества жизнеспособных эмбрионов от уровня секреции эстрадиола на 6-й день спонтанного полового цикла ($r=-0,49$; $P<0,05$) (табл.12), что согласуется с данными Nakajima A. /222/. Содержание тестостерона в крови подопытных животных увеличивалось с 0 до 10-го дня спонтанного полового цикла с 3 до 0,19 нг/мл.

Отмечено незначительное снижение количества тестостерона до 0,18 нг/мл на 11-й день полового цикла. К 12-му дню уровень тестостерона достиг 0,25 нг/мл и не снижался до дня ожидаемой охоты после стимуляции. Количество тестостерона к 6-7- му дням стимулированного полового цикла увеличилось и составило 0,31 и 0,3 нг/мл соответственно.

Увеличение уровня тестостерона в крови подопытных коров в соответствии с подъемами эстрадиола, положительная корреляционная зависимость между уровнями тестостерона и эстрадиола в течение всего периода исследований ($r=0,42$; $P<0,01$), а также зависимость реакции яичников коров на экзогенные гонадотропины и количества жизнеспособных эмбрионов на донора от уровня тестостерона в день спонтанной охоты ($r=0,52$; $P<0,01$), свидетельствует о том, что тестостерон играет значительную роль в процессе гормональной регуляции фолликулогенеза у коров и подтверждает данные Голубева А.К. и др. /68/ о том, что андрогены в организме самки являются предшественниками эстрогенов.

Обнаружена отрицательная корреляционная зависимость Между количеством эстрадиола и тироксина в крови подопытных животных в течение всего периода исследований ($r=-0,17$; $P<0,05$).

Зависимость реакции яичников коров на экзогенные гонадотропины от концентрации кортизола в крови подопытных коров ($r=0,14$; $P<0,05$) в течение всего периода исследований и на 6-й день стимулированного цикла ($r=-0,48$; $P<0,05$), а также положительная корреляционная взаимосвязь уровней секреции прогестерона и кортизола в день спонтанной охоты ($r=0,52$;

$P < 0,05$) свидетельствуют о согласованности функции коры надпочечников и яичников /47/.

Таблица 12 - Корреляционная связь между изучаемыми показателями

Сочетаемые показатели	Период полового цикла	г	Р
Реакция яичников - эстрадиол	6-й день спонтанного цикла	-0,49	0,05
Реакция яичников - тестостерон	0-й день спонтанного цикла	0,52	0,01
Реакция яичников - кортизол	весь период исследований	-0,14	0,05
	6-й день стимулированного цикла	-0,48	0,05
Тестостерон - эстрадиол	весь период исследований	0,42	0,01
Прогестерон - кортизол	0-й день спонтанного цикла	0,52	0,05
ЛГ-ФСГ	11-й день полового цикла	-0,78	0,01
Пролактин - ЛГ	7-й день стимулированного цикла	-0,65	0,05
Эстрадиола - ФСГ		-0,59	0,05
Эстрадиол - тироксин	весь период исследований	-0,17	0,05

Обнаружена отрицательная корреляция ($r = -0,78$; $P < 0,01$) между уровнями секреции ЛГ и ФСГ на 11-й день полового цикла, что характерно для этого периода в естественном половом цикле.

Наличие отрицательной корреляции между уровнем секреции пролактина и ЛГ ($r = -0,65$; $P < 0,05$), эстрадиола и ФСГ ($r = -0,59$; $P < 0,05$) на 7-й день стимулированного полового цикла свидетельствует о нарушении эндокринных взаимодействий в организме коров в результате суперовуляции, так как исследования Китаева Э.М., Никитина А.Н. /39/ показывают синергичное взаимодействие пролактина и ЛГ, эстрадиола и ФСГ у спонтанно циклирующих самок.

2.3.3. Вызывание множественной овуляции и факторы ее обуславливающие

Важнейшим требованием для более широкого практического применения трансплантации эмбрионов является наличие надежных методов получения в достаточном количестве биологически полноценных эмбрионов.

Одним из первых идея трансплантации эмбрионов была высказана Неаре W. /171, 172/.

Теоретические и практические основы гормонального вызывания суперовуляции у крупного рогатого скота были разработаны еще в 30-х годах группой советских ученых под руководством академика М.М.Завадовского /42, 28, 29/.

Однако и сегодня она является наиболее важным и непредсказуемым этапом в технологии трансплантации эмбрионов. Несмотря на многочисленные исследования во всем мире, попытки прогнозирования результатов реакции на введение экзогенных гонадотропинов не увенчались успехом. Это касается не только животных, впервые подвергаемых суперовуляторной обработке, но и проверенных, потенциальных доноров. Многие исследования подтверждают тот факт, что получение от коровы-донора большого числа зародышей не гарантирует повторения результата при последующих гормональных обработках, хотя и предполагает такую возможность.

Так, Хаслер в 1992 году заявил о том, что за последние 15 лет не было какого-либо заметного улучшения в технике вызывания суперовуляции у крупного рогатого скота. Восемнадцать лет спустя данное заявление по-прежнему остаётся в силе. Данные, подтвержденные как Американской так и Канадской ассоциациями по трансплантации эмбрионов говорят о том, что средний показатель эмбриопродуктивности на донора колеблется в пределах 5-7 и не меняется уже в течении многих лет (табл.13).

Таблица 13 - Результаты извлечения эмбрионов в США с 2002 по 2008 год

Год	Кол-во извлечений	Кол-во эмбрионов	Кол-во эмбрионов на одно извлечение
2002	28109	172118	6,1
2003	34896	205441	5,9
2004	40701	248469	6,1
2005	48233	305129	6,3
2006	51802	319984	6,2
2007	54080	332486	6,1
2008	52804	329171	6,2

Эмбриопродуктивность мясного скота несколько выше по сравнению с молочным примерно на 1-1,5 эмбриона на вымывание. Так поданным Looney (1986) от 2048 мясных доноров было получено 6,6 эмбриона на извлечение. От 1000 коров голштинской породы получено 5,1 хороший эмбрион на каждое извлечение (Hasler et. al., 1983). Как видим, ни у мясного ни у молочного скота средний уровень извлеченных эмбрионов за предшествующие годы не изменился.

На выход эмбрионов влияет целый ряд субъективных факторов, трудно поддающихся систематизации. Поэтому их учет при подборе доноров и организации работы в некоторой мере оказывают влияние на эффективность суперовуляции /63, 90/.

Известные в настоящее время способы индуцирования суперовуляции у коровы-донора не дают желаемого результата у значительного числа животных. Около 20-25% животных не реагируют на гормональную обработку, а у некоторых реагировавших животных на гонадотропин наблюдается минимальное или чрезмерное число овуляций, что также не гарантирует получение достаточного числа нормальных эмбрионов. Престимуляция яичников и получение большого числа овуляций сопровождается снижением оплодотворяемости, повышением числа дегенерированных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток.

Для гормональной обработки коров с целью вызывания суперовуляции применяются препараты, полученные либо из сыворотки крови беременных животных (сывороточные гонадотропины), либо из гипофизов самок (гипофизарные гонадотропины). Основной недостаток сывороточных гонадотропинов – растянутость овуляционного процесса и возможность возникновения у обработанных животных фолликулярных кист вследствие длительного лютеолитического эффекта. Кроме того, сывороточные гонадотропины химически соединены с сиаловыми кислотами и имеют нерегулируемый длительный период распада. Гипофизарные препараты представляют собой очищенную от белков вытяжку из задней доли гипофиза и содержат смесь ФСГ и ЛГ.

Длительная инактивация СЖК в крови животных создает определенные затруднения при вызывании суперовуляции у коров-доноров.

Некоторые исследователи заметили, что наличие СЖК в крови коровы после овуляции может оказывать отрицательное влияние на развитие зародыша. Остающиеся после вызывания суперовуляции гонадотропины вызывают рост второй волны фолликулов, которые не овулируют, а превращаются в кисты, что приводит к выделению значительного количества эстрогенов в организме. Поэтому при вымывании на 7...8 день после осеменения получают значительное число дегенерированных эмбрионов.

Для нейтрализации и прекращения действия гонадотропина СЖК начали использовать сыворотку, содержащую антитела против СЖК. При введении антисыворотки в дозе 600...1000 ИЕ через 105...106 часов после инъекции СЖК от 58 коров в среднем было получено по 4,9 эмбриона, пригодных для трансплантации, против 3 в контрольной группе (51 корова).

Введение антисыворотки на СЖК в день осеменения коров-доноров повышает количество овуляций на 24,5% и на 30% снижает вариабельность в числе овуляций в расчете на каждого донора. Антисыворотка нейтрализует остаточную ФСГ-

активность СЖК, прекращает дальнейший рост фолликулов, нормализует эстрогенный фон в организме и значительно сокращает продолжительность проявления эструса у животных-доноров.

Еще одной немаловажной причиной низкой эффективности СЖК для вызывания суперовуляции по данным некоторых авторов является соотношение фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов.

Для получения удовлетворительных результатов гормональную обработку проводили в разные фазы полового цикла. При этом применение СЖК в лютеиновую фазу оказалось безуспешным, а при его использовании в фолликулярную, на 16-17 день, множественная овуляция хотя и наблюдалась у большинства животных, однако выход жизнеспособных эмбрионов был крайне низким.

В некоторых опытах для вызывания суперовуляции применяли многократное введение ГСЖК. Но такое применение гонадотропина так же не имела преимуществ по сравнению с однократной обработкой: охота у коров часто наступала преждевременно.

J.M.Screenan /251/ в течение 9...10 дней инъецировали донорам прогестерон, который на фоне эстрогенов обеспечил синхронный лизис желтого тела, а в сочетании с ГСЖК, удовлетворительный уровень овуляции. Однако, наряду с хорошим суперовуляторным эффектом наблюдалось снижение уровня приживляемости полученных эмбрионов.

Применение ГСЖК в сочетании с хориогонинами /88/ и эстрадиол-бензоатом обеспечивало получение в среднем по 15 эмбрионов на донора с высоким процентом дегенерированных зародышей до 70%.

В результате многочисленных работ по стимулированию суперовуляции установлено, что с увеличением дозы гонадотропина СЖК увеличивается средний уровень суперовуляции. Так, после введения 1000 ИЕ и даже 2000 ИЕ СЖК не реагирует суперовуляцией от 33,5 до 63,4%,

соответственно, тогда как при 3000 ИЕ СЖК процент животных, реагирующих суперовуляцией, повышается до 80,0%.

С повышением дозы СЖК до 4000 ИЕ среднее число овуляций повышалось до 19,9 с одновременным снижением качества эмбрионов. Дальнейшее повышение дозы СЖК до 6000...7000 ИЕ сопровождалось уменьшением числа реагирующих животных до 36,2% и увеличением числа неовулировавших фолликулов и снижением оплодотворяемости яйцеклеток до 18,9%. В результате сделан вывод, что оптимальной дозой СЖК является 3000 ИЕ.

По данным литературы, часто практикуется многократное использование коров в качестве доноров эмбрионов, однако, повторное введение ГСЖК вызывает у отдельных животных иммунный ответ образование антител, ингибирующих ее действие. В исследованиях Gordon J. et al. /163/ были проведены две обработки коров препаратом СЖК и после первой получили 15,6, а после второй 11,3 овуляции на донора.

При повторных обработках коров препаратом СЖК с 6-недельным перерывом было отмечено снижение числа овуляций. Так, после первой обработки получено в среднем 10, второй – 7, третьей – 2 и четвертой – 0,8 овуляций на одного реагирующего донора.

Несмотря на общую тенденцию снижения числа овуляций с увеличением числа обработок наблюдается повышение индивидуальной изменчивости по этому показателю. Повидимому, повторные инъекции ГСЖК не у всех животных стимулируют образование антител на ГСЖК и тем самым инактивируют его действие.

Применяя СЖК в сочетании с антисывороткой стабильные результаты можно получить после двух обработок 7,8 и 8,2 овуляций и соответственно 6,8 и 7,7 пригодных для пересадки эмбрионов. Дальнейшее увеличение кратности обработок СЖК+антисыворотка не снижает число овуляций (8,8) на одного реагирующего донора, но уменьшает число коров, реагирующих суперовуляцией с 90 до 50% и выход нормальных эмбрионов с 6,8 до 2,8 на донора.

Следовательно, обрабатывать препаратом СЖК+антисыворотка более двух раз нецелесообразно. В этом случае суперовуляцию следует вызывать препаратом ФСГ-п. При многократной обработке (5...6 и более раз) доноров ФСГ-п число овуляций и нормальных эмбрионов не снижается, а у отдельных коров даже повышается. Кроме того, улучшается качество эмбрионов и их приживляемость, по сравнению с СЖК или СЖК+антисывороткой.

В литературе имеются сообщения о применении СЖК в сочетании с рилизинг-гормоном (Гн-РГ), который инъецировали под второе осеменение. Оказалось, что Гн-РГ заметно снижает число неовулировавших фолликулов и тем самым повышает уровень овуляций. И тем самым способствует повышению оплодотворяемости яйцеклеток и увеличению выхода нормальных эмбрионов, сокращает период овуляции и охоты. Препарат действует непосредственно на гипофиз и обеспечивает дополнительный выброс в кровь лютеинизирующего гормона (ЛГ) и тем самым компенсирует его недостаток.

В последнее время подавляющее большинство исследователей во всем мире отмечают преимущество гипофизарных гонадотропинов перед плацентарными при вызывании суперовуляции у крупного рогатого скота /113/. Это связано, главным образом, с длительностью инактивации ГСЖК (6 дней и более).

Гонадотропины гипофизарного происхождения в крови животных инактивируются через 5...6 часов и поэтому обычно их вводят животным 2 раза в день с интервалом между инъекциями 12 часов в течение 4...5 дней. Предпринимаются попытки упростить такой трудоемкий режим вызывания суперовуляции без снижения результативности. С этой целью применяли однократную инъекцию ФСГ с пролонгаторами, такими как карбоксиметил, целлюлоза и поливинил-пирролидон, но они оказались малоэффективными. В других исследованиях была получена одинаковая реакция яичников на ФСГ при вдвое меньшем числе инъекций (5 из 10 или 4 из 8) при использовании его в 3,2% растворе желатина.

Во многих странах применяются препараты с соотношением ФСГ к ЛГ (5:1). Однако Гордон А. /11/ утверждают, что хроматографически очищенный ФСГ обеспечивает получение до 7,0 нормальных эмбрионов на донора. При применении коммерческого ФСГ получают в среднем по 4,5 качественных эмбрионов. Добавление к очищенному ФСГ препарата ЛГ уменьшает число качественных эмбрионов с 7,8 до 4,4. Уровень прогестерона в крови в день охоты после применения коммерческого ФСГ в среднем составляло 0,88 нг/мл, а очищенного ФСГ – 0,45 нг/мл. В то же время Greve T. /164/ и др. установили, что сочетание ФСГ и ЛГ обеспечивает в 2 раза больше овуляций, чем применение только ФСГ, при этом повышается качество эмбрионов.

При использовании ФСГ также отмечается изменчивость в уровне суперовуляции, что объясняется, вероятно, колебанием уровня эндогенных гонадотропинов. В литературе часто появляются данные о вызывании суперовуляции в разные дни полового цикла без учета уровня эндогенных гормонов в крови коров на день гормональной обработки.

Гордон А. /11/ вызывала суперовуляцию на 9...13 день полового цикла и не выявила существенных различий в числе и качестве полученных эмбрионов

По данным Н.И. Сергеева /90/ вызывание суперовуляции лучше всего начинать с 10...11 дня полового цикла. При этом уменьшается число дегенерированных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток, повышается выход полноценных эмбрионов.

В работе Niemann H. и др. /226/ по определению оптимальной дозы ФСГ, установлено, что использование ФСГ в дозах, превышающих 28 мг, снижает число эмбрионов с 14,9 до 6,8 на донора. С увеличением дозы ФСГ до 60 мг уменьшается число эмбрионов, пригодных для пересадки с 57 до 40%. При этом достоверно возрастает число «нулевых» вымываний.

В исследованиях L.D. Nelson et al. /223/ отмечено, что повышение дозы ФСГ от 32 мл до 48 мл вызвало увеличение среднего числа овуляций с 9,5 до 12,6 и выход эмбрионов с 6,1

до 6,9. Так была выявлена зависимость числа эмбрионов от дозы гонадотропина. Оптимальными дозами ФСГ для вызывания суперовуляции оказались 40, 42 и 48 мг. Другие авторы не наблюдали существенных различий в реакции яичников на введение 30 и 40 мг ФСГ.

Savage N.C. /243/ в конце обработки ФСГ коровам-донорам дополнительно инъецировали ЛГ, что несколько увеличило выход полноценных эмбрионов в сравнении с контролем. Эффективность применения неочищенных препаратов ЛГ была выше, чем чистого ЛГ.

Другого мнения по влиянию ЛГ на качество эмбрионов придерживается Scalon P.T. /245/. Он считает, что инъекция ЛГ не вызовет овуляцию. Если корова обнаружена в эструсе, эндогенная концентрация ЛГ вполне достаточна для обеспечения овуляции. Введение экзогенного ЛГ не увеличивает эффект. Более того, у суперовулировавшей коровы неизвестно когда действует овуляторная доза ЛГ и неизвестна овуляторная связь с началом возможного эструса. Очевидно, фолликулы могут овулировать в течение длительного периода. В связи с этим большое количество яйцеклеток может быть неоплодотворенными.

Различные препараты ФСГ, производимые в разных странах, отличаются степенью очистки, соотношением ФСГ- и ЛГ-компонентов и некоторыми другими свойствами, которые обуславливают их различную эффективность [85, 96].

Сравнительная оценка препаратов ФСГ показывает, что фоллитропин по своему действию несколько уступает ФСГ производства США и Чехии [139]. По числу реагирующих животных разница между группами была несущественной (89,1; 100,0 и 84,2% для ФСГ-П, фолликулотропина и фоллитропина соответственно). Заметно больше овуляций получено у коров, обработанных ФСГ-П (США) (11,6 против 9,4 и 8,5). По числу нормальных зародышей преимущество отмечено у животных, обработанных фолликулотропином (5,7 против 5,2 при обработке ФСГ-П и 4,7 при обработке фоллитропином).

В свою очередь Шириев В.М. и др. [109] отмечают преимущество фоллитропина, по сравнению с фолликулотропином (Чехия), по числу жизнеспособных зародышей ($4,2 \pm 0,8$ против $4,0 \pm 0,8$), однако подчеркивают высокую индивидуальную изменчивость овуляторной реакции при применении фоллитропина.

При сравнении эффективности различных препаратов ФСГ, Смыслова Н.И. [94] не отмечает существенной разницы по числу реагирующих животных. По числу овуляций на донора преимущество имел ФСГ-П по сравнению с фоллитропином и фолликулотропином ($11,5 \pm 0,8$; $8,9 \pm 0,8$ и $7,7 \pm 0,8$ соответственно), в то время как большее количество нормальных эмбрионов получено от коров, обработанных ФСГ-П и фолликулотропином ($5,4 \pm 0,5$ и $4,3 \pm 0,5$ против $3,1 \pm 0,3$ при стимуляции множественной овуляции фоллитропином).

Мишуковская Г.С. [59] в своих опытах также подчеркивает преимущество ФСГ-П (США) как по числу овуляций на донора, так и по числу нормальных эмбрионов по сравнению с фолликулотропином и фоллитропином (10,2 и 5,7 против 8,1 и 4,8; 8,2 и 4,0 соответственно).

Следует отметить, что все вышеперечисленные исследователи отмечают самое низкое количество дегенерированных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток при использовании для вызывания суперовуляции фолликулотропина (Чехия). Кроме того, у коров, обработанных этим препаратом, отмечается максимальная оплодотворяемость яйцеклеток (86,4%) по сравнению с ФСГ-П и фоллитропином (78,2 и 79,9 соответственно). Отличных, безупречных в морфологическом отношении эмбрионов получено больше в группах животных, обработанных ФСГ-П и фолликулотропином - 33%, фоллитропином – 19% [59].

Преимущество фолликулотропина при вызывании суперовуляции отмечается и в других исследованиях [89], в которых, при сравнительной оценке ФСГ-П, фоллитропина и фолликулотропина, получено 9,93; 9,86 и 11,1 овуляций на донора,

соответственно. По числу жизнеспособных эмбрионов животные различались следующим образом: 3,96; 4,27 и 6,2 при обработке ФСГ-Р, фоллитропином и фолликотропином соответственно.

В опытах по оценке ФСГ-Б (БелНИИЖ) [9] установлено, что его применение стимулирует множественный рост фолликулов у 74,2% доноров, в том числе позволяет получать 8,3 овуляции на одно животное.

Как видно из вышесказанного, среди исследователей нет единого мнения об эффективности того или иного фолликулостимулирующего препарата.

В таблице 14 представлены результаты проведенной нами гормональной обработки коров-доноров разными фолликулостимулирующими гонадотропинами.

Количество животных, реагирующих на экзогенное введение гонадотропинов, находилось примерно на одинаковом уровне (от 82% при использовании прегмагона (сывороточный гонадотропин) до 90% при использования ФСГ-п и фоллитропина). Среднее число овуляций колебалось также незначительно за исключением сывороточного гонадотропина (7,8 овуляций на донора).

Наиболее высокий выход эмбрионов на донора, так же, как и выход жизнеспособных эмбрионов, получен при использовании в качестве фолликуло-стимулирующего гормона фоллитропина (9,0 и 5,8 эмбриона) ФСГ-п (9,5 и 6,7 эмбрионов*, -соответственно). Разница у ФСГ-п достоверна по отношению к прегмагону ($P<0,001$), фолликотропину ($P<0,5$), фоллитропину ($P<0,001$). У фоллитропина достоверная разница отмечена только по отношению к прегмагону.

Самый низкий выход жизнеспособных зародышей оказался в группе доноров, обработанных прегмагоном - 50,7%, в то время, как в других группах этот показатель колебался в пределах от 61,2% (фолликотропин) до 70,5% (ФСГ-п). В этой же группе наиболее высоким был выход дегенерированных и отставших в развитии эмбрионов, а также неоплодотворенных яйцеклеток - 32,0 и 17,3%, соответственно.

Таблица14 - Эффективность обработки коров-доноров разными гонадотропинами

Показатели	Гонадотропины					
	Фоллтр опин, 400 мг	ФСГ-п, 50 мг	Прегма- гон, 2500 ИЕ	Фолли ко- тропи н, 480 М.Е.	Фолли- тропин, 1200 Е.Д.	ФСГ- Супер, 50 ед. по Арм. ст.
Обработано животных, гол.	50	50	50	50	50	50
Реагировало суперовуляцией, гол.	44	45	41	43	45	42
% от числа обработанных	88,0	90,0	82,0	86,0	90,0	84,0
Среднее число овуляций на донора	10,1±0,3	11,3±0,3	7,8±0,92	9,3±0,37	9,9 ±0,29	9,5 ±0,36
Получено в среднем на донора эмбрионов и яйцеклеток	9,0±0,27	9,5 ±0,2	7,5 ±0,35	8,0 +0,19	7,8 ±0,3	8,4 +0,12
в т.ч. нормальных эмбрионов	5,8±0,4	6,7±0,41	3,8 ±0,48	4,9 +0,72	5,0 ±0,25	5,6 +0,48
% от общего числа	64,4	70,5	50,7	61,2	64,1	66,7
дегенерированных	2,5±0,45	2,3±0,93	2,4 ±0,72	2,3 ±0,91	1,8 +1,32	2,2 ±1,38
% от общего числа	27,8	24,2	32,0	28,7	23,1	26,2
яйцеклеток	0,7±0,51	0,5±0,83	1,3 +0,38	0,8 ±1,87	1,0 ±1,41	0,6 ±1,37
% от общего числа	7,7	5,3	17,3	10,0	12,8	7,1
оплодотворяемость, %	92,2	94,7	82,7	90,0	87,2	92,8

Рядом исследователей проведено сравнительное исследование эффективности действия ГСЖ и ФСГ-п. Так, J.Nahn et al. /168/ применили на двух группах коров-доноров ГСЖК и ФСГ и установили, что полиовуляция, вызванная ГСЖК и ФСГ не имела точных пределов, часто наблюдались нежелательные реакции яичников, некоторые животные вообще

не реагировали на гонадотропины, либо развившиеся фолликулы не овулировали.

В последующих экспериментах по сравнительное изучению действия СЖК (фоллигон) и ФСГ отмечено преимущество применения ФСГ. Так, в опытах Бугрова А. др. /8/ при применении ФСГ наблюдалось увеличение числа коров, реагирующих суперовуляцией: 72,6% против 60, 8% при использовании СЖК (фоллигон). В других исследованиях после применения ФСГ суперовуляцией реагировало 95,6% коров-доноров, а после инъекций фоллигона только 54,0%.

Аналогичные результаты были получены и по числу овуляций на донора ($6,1 \pm 0,3$ против $3,1 \pm 0,5$). Другие авторы указывают на незначительные различия в числе овуляций после применения ФСГ и СЖК (7 против 6 овуляций на донора). В опытах ряда исследователей /8,10/, проведенных на 150 телках не выявлено разницы по числу овуляций и извлеченных эмбрионов при применении СЖК, ФСГ, однако процент пригодных для пересадки эмбрионов был выше при применении ФСГ (58,3 против 42,9%). Вероятно, более правильно эффективность гонадотропных препаратов следует определять не по числу овуляций, а по выходу пригодных к пересадке эмбрионов.

2.3.4. Влияние экзогенных гонадотропинов на процессы фолликулогенеза

Различная эффективность экзогенных гонадотропинов может зависеть от многих причин, однако основным фактором принято считать индивидуальную изменчивость ответной реакции яичников подопытных животных на стимуляцию. Поэтому, для разработки методов коррекции процесса суперовуляции с целью снижения вариабельности реакции яичников на гонадотропные препараты, большое значение имеет изучение изменений секреторной активности участвующих в регуляции воспроизводительной функции коров желез

внутренней секреции в период формирования суперовуляторной реакции.

Стимуляция яичников гонадотропными препаратами представляет собой вмешательство в сложные эндокринологические процессы развития фолликулов, созревания яйцеклеток и овуляции, так как инъекции фолликулостимулирующих препаратов в середине лютеальной фазы эстрального цикла влекут за собой сильное увеличение ФСГ- и ЛГ-активности гипофиза в течение нескольких дней.

Некоторые исследователи показывают, что у 15-20% всех коров, используемых в качестве доноров, не получают пригодных к пересадке эмбрионов [178]. Считается, что это явление – следствие гонадотропной стимуляции, так как не стимулированные животные в большинстве случаев продуцируют только жизнеспособные эмбрионы [266]. Многими исследователями показано, что экзогенные гонадотропины оказывают влияние на завершающие стадии созревания ооцитов, фолликулярный стероидогенез [177, 179, 218,], транспорт спермы, оплодотворение и развитие эмбрионов в яйцеводах и матке до их извлечения. Некоторые из этих изменений отражаются в концентрации прогестерона и ЛГ [117, 165,] в периферической плазме.

Bevers M. и Dieleman S. [125] выделяют три стадии фолликулярного развития, когда могут возникнуть описанные нарушения:

- период между инициацией суперовуляции и введением простагландина. В этот период первичная стимуляция фолликулярного роста проходит на фоне увеличения концентрации прогестерона из-за инъекции гонадотропина;

- период между введением простагландина и пиком лютеинизирующего гормона. Эта стадия включает в себя развитие фолликулов с преовуляторными свойствами. Этот период часто укорачивается по сравнению с необработанными животными;

- период между эндогенным пиком ЛГ и овуляцией. В течение этой стадии у нормально циклирующих коров

завершается фолликулярное развитие и созревание ооцитов. Эти процессы осуществляются путем последовательных изменений метаболизма фолликулярных стероидов [40,143,144]. У обработанных животных эти процессы происходят в окружении более высокой концентрации ФСГ и ЛГ.

Обнаружены преждевременное отклонение в секреции прогестерона, следующее за введением гонадотропина, или высокие уровни прогестерона во время ожидаемой охоты. Оба эти состояния не совместимы с нормальным предовуляторным высвобождением ЛГ и наиболее часто приводят к развитию поврежденных ооцитов и, в конечном счете, к снижению качества эмбрионов [165,].

Domeki I. [149] обнаружил, что коровы, от которых получены хорошие по качеству эмбрионы, имели уровень прогестерона во время охоты меньше 1 нг/мл, а те, от которых получили дегенерированные эмбрионы – около 2 нг/мл. Хилькевич С.Н. и др. [12] отмечают резкое повышение концентрации прогестерона, начиная с 3-го дня стимулированного полового цикла, обусловленное значительной общей массой лютеальной ткани, образовавшейся в результате овуляции большого числа фолликулов, достигшей максимума на 7-й день полового цикла. Этими же авторами подчеркивается, что недостаточный или неполный лизис желтых тел после воздействия экзогенных простагландинов является важнейшей причиной отсутствия позитивных показателей в реакции яичников на гонадотропин, так как остаточная активность желтого тела отрицательно влияет на развитие и оплодотворение яйцеклеток.

При использовании ФСГ-П (США) Пасицкий М.Д. и др. [64] обнаружили, что к 3-му дню полового цикла уровень прогестерона возрастает в 8 раз (6,2 нг/мл). На 7-й день содержание прогестерона увеличилось до 13,5 нг/мл.

По данным Миненко Г.В. и др. [58], уровень прогестерона до введения простагландина составил 2,63 нмоль/л, через 24 ч после введения – 3,38. За сутки этот показатель снизился до 2,05 нмоль/л, на 2-й день содержание гормона возросло до 4,84

нмоль/л, а к 3-4-му дням снизилось до 1,9 нмоль/л. Максимальное количество прогестерона в крови было достигнуто на 5-й день – 14,55 нмоль/л. Другими исследователями [100] показано, что уровень прогестерона в начале гормональной обработки был от 2 нмоль/л до 4 нмоль/л, после введения простагландина падал ниже 1 нмоль/л, а затем поднимался в зависимости от реакции яичников на экзогенный гонадотропин.

Некоторые исследователи [225, 232] считают, что резкое падение концентрации прогестерона после введения простагландина, является признаком ожидаемой хорошей реакции животного на гормональную обработку. При гормональной обработке телок на 10-й день полового цикла уровень прогестерона увеличивается от 0,3 нг/мл во время эструса до $17 \pm 2,83$ нг/мл и $24,2 \pm 2,57$ нг/мл на 7-й и 8-й дни соответственно.

Имеются также сообщения о наличии связи между уровнем прогестерона на 4-5-й дни после осеменения и появлением аномалий зародышей, извлеченных на 6-8-й день [275].

У нормально циклирующих коров интервал между началом регрессии желтого тела и пиком ЛГ составляет 58 ч [144].

Пик ЛГ в связи с введением простагландина F2 α обработанным гонадотропином животным, продолжается 42 часа, а интервал от пика ЛГ до овуляции – 24-27 часов [123, 124]. Изменение описанных временных интервалов, частичное или полное подавление подъема ЛГ перед стимулированной овуляцией также может привести к нарушениям созревания ооцитов и к снижению качества эмбрионов. Исследования пульсирующей секреции эндогенного ЛГ у суперовулировавших коров недостаточны. Domeki I. [149] отмечает, что уровни ЛГ были ниже у суперовулировавших животных, чем у контрольных. Самыми низкими были уровни ЛГ у животных, от которых не были получены эмбрионы. Выброс лютеинизирующего гормона происходил в разные сроки в

зависимости от типа гонадотропина, которым обрабатывались доноры. При обработке ФСГ выброс ЛГ происходил позднее, чем после обработки СЖК, хотя величина выброса была примерно одинаковой (в среднем $23,8 \pm 2,1$ нг/мл после введения ФСГ и $17,1 \pm 2,1$ нг/мл после введения СЖК). Bevers M.M. [125] показывает, что у 16,7% телок, подвергнутых суперовуляционной обработке, не обнаруживается предовуляторного пика ЛГ.

Концентрация эстрадиола в крови коров, подвергнутых суперовуляционной обработке, достигает более высоких уровней, чем у не стимулированных животных. Многие исследователи отмечают положительную корреляцию между концентрацией эстрадиола в период охоты и уровнем овуляции [167, 205]. Время проявления пика эстрадиола может зависеть от используемого гонадотропного препарата, обычно он проявляется на 24 ч раньше пика ЛГ. Увеличение концентрации эстрадиола после ЛГ-пика изменяет нормальную секрецию и двигательную способность яйцевода, что приводит к отклонениям транспорта гамет и изменяет условия развития эмбрионов в матке [176].

Гетце М. И. др. [106] обнаружили, что гормональная стимуляция яичников коров вызывает общее увеличение содержания стероидов в фолликулах, что особенно наглядно проявлялось в фолликулах диаметром меньше 5 мм. Гормональная обработка вызывала в каждом классе фолликулов по сравнению с животными со спонтанным эструсом, четкий сдвиг гормонального профиля. В маленьких фолликулах (меньше 5 мм) особенно повышалась концентрация эстрона и эстрадиола-17 β , в средних (6-10 мм) эстрадиола-17 β , в крупных (11-15 мм) – эстрадиола и прогестерона.

Маас А.О. [53] отмечает, что уровень эстрадиола у коров увеличивается со 2-го дня обработки до дня индуцированной охоты и составляет 0,3 нмоль/л. В исследованиях Миненко Г.В. и др. [58] уровень эстрадиола в крови доноров до введения простагландина был равен 3,37 нмоль/л, через 24 часа после

введения простагландина составил 5,08 нмоль/л с колебаниями от 4,0 до 7,4 нмоль/л, за сутки он снизился до 1,26 нмоль/л. В первый и второй дни цикла уровень эстрадиола составил 0,21-0,23 нмоль/л, а на 3-4-й и 5-й день был на одном уровне 0,13-0,11 нмоль/л.

Челецкий М.М. и др. [16] отмечают значительную вариабельность концентрации эстрадиола в крови суперовулировавших коров, что указывает на неравномерность созревания фолликулов. В период роста и развития множественных фолликулов концентрация эстрадиола имела тенденцию к увеличению (в 5-15 раз). Этими же авторами подчеркивается значительная роль тестостерона в процессе суперовуляции. С появлением желтых тел его концентрация возрастала в 2-3 раза. В исследованиях Dieleman S.J. [143] описано снижение концентрации эстрадиола в периферической крови после пика ЛГ, что является результатом ингибирования пиком ЛГ синтеза андростендиона, который у коров является важнейшим субстратом ароматизации в эстрогены.

Имеются данные [360], что повышенный уровень пролактина или кортизола во время стимуляции суперовуляции могут ингибировать секрецию гонадотропинов и, тем самым, отрицательно влиять на реакцию яичников.

В исследованиях Леткевич Л.Л. [50] отмечается существенное отличие содержания кортизола и тироксина в естественном и стимулированном половом цикле. В суперовуляционном цикле наблюдается увеличение содержания кортизола в крови (19,82 против 9,95 нг/мл) и тироксина (4,18 против 2,91 мкг/100 мл).

Как показывают результаты многих исследований, экзогенное введение гонадотропинов с целью стимуляции множественной овуляции у коров, вызывает изменения секреторной активности желез внутренней секреции, участвующих в регуляции репродуктивной функции. Большинство работ посвящены изучению динамики прогестерона, эстрадиола и ЛГ у коров в период гормональной стимуляции яичников. В доступной нам литературе мы не

обнаружили данных о тонической секреции ФСГ, пролактина, тестостерона, кортизола, тироксина в период формирования суперовуляторной реакции, хотя эти гормоны играют значительную роль в регуляции фолликулогенеза у коров.

2.3.5. Динамика гормональной секреции у коров в зависимости от типа применяемого гонадотропина

В контроле эффективности действия экзогенных гонадотропинов, применяемых с целью вызывания множественной овуляции у коров, важную роль играет изучение изменений гормонального статуса коров доноров эмбрионов в период стимуляции.

В наших опытах изучалось влияние ФСГ-П, фолликотропина, ФСГ-Б и фоллитропина на стероидопродуцирующую способность яичников, функцию гипофиза, коры надпочечников и щитовидной железы, а также возможность прогнозирования результатов стимуляции множественной овуляции у коров на основе анализа динамики секреции гормонов яичника, гипофиза, щитовидной железы и надпочечников в исследуемые периоды.

Животные были разделены на четыре группы:

I – обработанные ФСГ-П (США), n=8;

II – обработанные ФСГ-Б (БелНИИЖ), n=10;

III – обработанные фолликотропином (Чехия), n=7;

IV – обработанные фоллитропином (Литва), n=9.

Достоверные различия концентрации исследуемого гормона обнаружены на 10 день полового цикла до введения гонадотропина у животных I и II, II и III групп ($P<0,05$); через 3 часа после введения гонадотропина на 10 день полового цикла между I и IV, II и IV группами ($P<0,05$); на 11-й день полового цикла между II и IV группами; в день охоты стимулированного цикла между I и II, II и III, II и IV группами ($P<0,05$); на 6-й день стимулированного цикла между I и II, II и IV, III и IV группами

($P < 0,05$; $0,01$; $0,001$); на 7-й день стимулированного цикла между I и IV, III и IV группами ($P < 0,05$; $0,01$).

Анализ уровня секреции прогестерона в период, предшествующий гормональной обработке (0, 6, 7 и 10-й дни полового цикла) не показал прямой достоверной зависимости реакции яичников коров на вводимые гонадотропные препараты от концентрации прогестерона. Так, наилучший результат по количеству овуляций достигнут при использовании ФСГ-П (США), в то время как содержание прогестерона у животных этой группы не превышало $2,59 \pm 0,56$ нг/мл. Напротив, у коров с концентрацией прогестерона $4,57 \pm 0,63$ нг/мл и $3,61 \pm 0,35$ нг/мл на день обработки при использовании ФСГ-Б (БелНИИЖ) и фоллитропина (Литва), соответственно, наблюдалась более низкая ответная реакция яичников на гормональную обработку.

Результаты наших исследований согласуются с данными Решетниковой Н.М. и др. [79], Solti L. [246], Schams D. [438], Рябых В.П. [83], Бахитова К.И., Плишкиной К.И. [7], Walton J.S., [266], Bevers M.M. [125].

Анализируя характер секреции прогестерона в период обработки (10-13-й дни полового цикла), можно заключить, что резкое повышение концентрации прогестерона через 3 часа после введения экзогенного гонадотропина в день начала обработки оказывает негативное влияние на процессы фолликулогенеза. Так, при использовании фоллитропина наблюдалось достоверное увеличение содержания прогестерона с $3,61 \pm 0,35$ до $5,58 \pm 0,35$ нг/мл ($P < 0,05$) в течение 3-х часов после инициации суперовуляции.

При использовании ФСГ-Б (БелНИИЖ) наблюдалось угнетение прогестеронсинтезирующей способности яичников подопытных животных, о чем свидетельствует последовательное снижение концентрации прогестерона в крови животных в период обработки.

Плавное увеличение содержания прогестерона в крови коров до 11-го дня полового цикла и снижение его концентрации к 0-му дню стимулированного цикла соответствует получению

более высокой степени суперовуляции и большего количества пригодных к пересадке эмбрионов при использовании ФСГ-П и фолликотропина, по сравнению с ФСГ-Б и фоллитропином.

Необходимо подчеркнуть, что у животных, которым вводили ФСГ-П и фолликотропин, не обнаруживается значительного повышения концентрации прогестерона в 0 день стимулированного полового цикла, по сравнению с аналогичным днем естественного полового цикла. В то же время, ФСГ-Б вызывает уменьшение этого показателя с $0,32 \pm 0,17$ до $0,18 \pm 0,03$ нг/мл, а фоллитропин – достоверное увеличение концентрации прогестерона в указанные дни с $0,13 \pm 0,06$ до $0,35 \pm 0,06$ нг/мл ($P < 0,05$).

Повышение содержания прогестерона в крови животных на 6 и 7-й дни стимулированного полового цикла происходит в соответствии со степенью ответной реакции яичников на гормональную обработку.

Увеличение концентрации прогестерона у животных I группы к 6-му дню стимулированного полового цикла до 10,4 нг/мл характеризует более низкий выход полноценных эмбрионов от числа извлеченных, по сравнению с животными III группы, у которых концентрация прогестерона в этот день не превышала 6,77 нг/мл (70,6 и 77,4% соответственно).

Полученные в наших исследованиях данные соответствуют результатам, описанным и в других исследованиях [129, 244]. Резкое увеличение уровня прогестерона вскоре после введения экзогенного гонадотропина, повышенный уровень гормона в период охоты, по сравнению со спонтанной, приводят к снижению результатов вызывания суперовуляции. Результаты наших исследований согласуются также с данными Хилькевича С.Н. и др. [12], которые подчеркивают негативное воздействие остаточной активности желтых тел на развитие и оплодотворение яйцеклеток.

Динамика прогестерона в период стимуляции суперовуляции соответствует результатам аналогичных исследований, проведенных Niemann H. [226], Peters A.R. [232], Маасом А.О. [53]. Уровни прогестерона в период естественного

полового цикла соответствуют уровням, обнаруженным другими исследователями [246].

Динамика концентрации эстрадиола в период естественного полового цикла перед стимуляцией, в период стимуляции и во время суперовуляционного цикла показана в таблице 15.

Не обнаружено достоверных отличий содержания этого гормона между подопытными животными, за исключением 0-го дня спонтанного полового цикла между животными II и IV, III и IV групп ($P < 0,05$), 0-го дня стимулированного полового цикла между III и IV группами ($P < 0,01$), что соответствует данным, полученным Челецким М.М. и др. [59], который также показал значительную вариабельность концентрации эстрадиола у коров в период гонадотропной стимуляции. Следует отметить, однако, более низкие уровни секреции эстрадиола у коров, обработанных впоследствии ФСГ-П и фолликотропином, в период, предшествующий гормональной обработке. Аналогичные результаты получены в исследованиях Nakajima A. [222].

У животных, обработанных ФСГ-П и фолликотропином, наблюдалось увеличение количества эстрадиола в крови через 3 часа после инъекции гонадотропных препаратов. У животных, обработанных ФСГ-П, наблюдалось последовательное увеличение концентрации эстрадиола в крови с 10-го до 13-го дня полового цикла. Пик эстрадиола обнаружен за день до ожидаемой охоты, что соответствует данным, полученным Шановой О.А. [186], Алиевым А.А. [2]. Концентрация гормона в этот день была наивысшей за весь период исследований и составила 84,9 пг/мл. При использовании фолликотропина, наблюдали снижение интенсивности синтеза эстрадиола до 12-го дня полового цикла и увеличение его концентрации к 13-му дню. Пик эстрадиола у этих животных наблюдался в день ожидаемой охоты (98,4 пг/мл) и был достоверно выше, чем у коров, обработанных фоллитропином.

Препарат ФСГ-Б стимулировал снижение эстрадиолсинтезирующей способности яичников до 12-го дня

полового цикла. К 13-му дню уровень эстрадиола в крови коров увеличился и составил $72,6 \pm 26,0$ пг/мл. Следует отметить, что максимальная концентрация эстрадиола у этих животных обнаружена на 10-й день полового цикла до обработки экзогенными гонадотропинами и составила $91,3 \pm 22,3$ пг/мл.

Фоллитропин вызвал нарушение секреции эстрадиола у подопытных коров, о чем свидетельствует его скачкообразная секреция, что, по-видимому, является неблагоприятным условием формирования суперовуляторной реакции.

Анализ корреляционной зависимости между секрецией эстрадиола за весь период исследований и реакцией яичников на экзогенные гонадотропины показал наличие отрицательной корреляции между этими показателями у животных, обработанных ФСГ-Б ($r = -0,42$; $P < 0,01$), и у коров, обработанных фоллитропином ($r = -0,52$; $P < 0,01$), что может свидетельствовать о нарушении секреторной активности яичников у коров этих групп в связи с введением экзогенного ФСГ, так как большинство исследователей отмечают положительную корреляцию между концентрацией эстрадиола и реакцией яичников только в период охоты, а отрицательную – в период, предшествующий гормональной обработке [167].

Достоверных различий в динамике тестостерона у животных-доноров не обнаружено. Следует отметить более высокую концентрацию тестостерона у животных III группы на 10 день естественного полового цикла, по сравнению с животными других групп. Стабильный синтез тестостерона до 11 дня полового цикла и снижение его количества до базального уровня к 6-му дню стимулированного цикла обусловил наилучший результат при стимуляции множественной овуляции препаратом ФСГ-П. Отмечаются более высокие, по сравнению с естественным циклом, уровни тестостерона, как в период стимуляции, так и во время суперовуляторного цикла, что согласуется с данными, полученными Челецким М.М. и др. [16] и характеризует более высокую интенсивность синтеза эстрадиола в эти периоды.

Таблица 15 - Корреляционная связь между изучаемыми показателями

Сочетаемые показатели	Препарат	r	P
Реакция яичников - эстрадиол	ФСГ-Б	-0,42	0,01
	Фоллитропин	-0,52	0,01
Тестостерон - эстрадиол	ФСГ-П	0,35	0,01
	Фолликулотропин	0,38	0,01
	ФСГ-Б	0,46	0,01
	Фоллитропин	0,53	0,01
Тестостерон - прогестерон	ФСГ-Б	0,3	0,05
Эстрадиол - прогестерон	Фоллитропин	0,36	0,05
Кортизол - реакция яичников	ФСГ-П	-0,29	0,01
Кортизол - ЛГ	ФСГ-П	0,38	0,05
Эстрадиол - тироксин	ФСГ-Б	-0,31	0,05
ФСГ - эстрадиол	ФСГ-Б	0,46	0,05
ФСГ-ЛГ	ФСГ-П	-0,44	0,05
Пролактин - эстрадиол	Фолликулотропин	-0,52	0,05

Анализ характера секреции кортизола у подопытных животных не показал стойкой зависимости концентрации данного гормона от применяемого экзогенного гонадотропина. Отмечается выраженное увеличение количества кортизола у коров, обработанных ФСГ-П и фолликулотропином в периоды, соответствующие предовуляторным пикам эстрадиола. С другой стороны, более низкие уровни кортизола свидетельствуют о лучшей адаптационной способности организма к стрессовым воздействиям, к которым относится и экзогенное введение гормональных препаратов, что подтверждается наличием отрицательной корреляции между количеством кортизола в крови коров, обработанных ФСГ-П, за весь период исследований и реакцией яичников ($r=-0,29$; $P<0,01$). Кроме того, у животных, обработанных ФСГ-П, обнаружена положительная корреляция между уровнями секреции кортизола и ЛГ ($r=0,38$; $P<0,05$), что подтверждает выводы Дега В. [23] о стимулирующем влиянии гипофизарных гонадотропинов на функцию коры

надпочечников при недостаточной секреторной активности яичников. Полученные нами данные подтверждают выводы сделанные Тегене А. [103], Дегаем В. [63], о согласованности функций гонад и коры надпочечников, что в нашем случае позволило получить более высокие уровни суперовуляции и количество пригодных к пересадке эмбрионов при использовании ФСГ-П и фолликотропина.

Следует подчеркнуть также, что наилучшие результаты при вызывании суперовуляции достигнуты у животных, обработанных ФСГ-П и фолликотропином, у которых наблюдалась относительно стабильная секреция кортизола, по сравнению с коровами, обработанными ФСГ-Б и фолликотропином.

Более низкие концентрации тироксина в крови у коров с 0 по 6-й дни спонтанного полового цикла, подвергнутых впоследствии обработке фоллитропином, по сравнению с животными других групп, способствовали снижению результатов вызывания суперовуляции у этих животных (достоверные различия отмечены в 0 день естественного и стимулированного циклов и на 10-й день через 3 часа после начала стимуляции между II и IV группами), что согласуется с утверждением, высказанным Левиным К.Л. [49] о том, что при недостаточности функции щитовидной железы снижается чувствительность яичников к гонадотропинам. Препарат ФСГ-Б вызывал увеличение количества тироксина в крови подопытных коров с 11-го дня полового цикла до дня ожидаемой охоты, по сравнению с животными, обработанными ФСГ-П и фолликотропином, которые характеризуются относительно стабильной секрецией этого гормона в период исследований.

У коров, обработанных ФСГ-Б, обнаружена отрицательная корреляция между уровнями секреции эстрадиола и тироксина ($r=-0,31$; $P<0,05$), что подтверждает выводы Прокофьева М.П. [75] об усилении секреторной активности щитовидной железы при недостаточной секреции эстрадиола.

Анализ динамики секреции ФСГ у коров в период, предшествующий гормональной стимуляции, показал наличие

достоверной зависимости результатов вызывания суперовуляции от концентрации ФСГ в крови коров на 6-й день спонтанного полового цикла. Наилучшие результаты при стимуляции множественной овуляции ФСГ-Р и фолликотропином получены у коров, характеризовавшихся более высоким содержанием ФСГ в крови (0,45-0,57 МЕ/л, по сравнению с животными других групп (0,24-0,29 МЕ/л) ($P < 0,05$; 0,01).

В период стимуляции суперовуляции животные, которым вводили ФСГ-П и фолликотропин характеризовались плавным увеличением концентрации ФСГ в крови до дня стимулированной охоты. Концентрация ФСГ на 6-7-й дни стимулированного полового цикла не превышала аналогичные показатели естественного полового цикла.

У животных, обработанных фоллитропином, обнаружены более высокие, по сравнению с коровами других групп, уровни ФСГ в крови на 11, 13-й дни полового цикла и в день стимулированной охоты ($P < 0,05$; 0,01). Кроме того, концентрация ФСГ на 6-7-й дни стимулированного полового цикла у этих животных заметно превышает уровни ФСГ, измеренные в спонтанном цикле.

Следует отметить тот факт, что максимальная концентрация ФСГ у коров, обработанных ФСГ-Б, отмечается на 12-й день полового цикла. У животных этой группы обнаружена положительная корреляция между уровнями секреции ФСГ и эстрадиола ($r = 0,46$; $P < 0,05$) в течение всего периода исследований, что также свидетельствует о нарушении процессов регуляции роста фолликулов у этих животных [162, 205].

Анализ динамики секреции лютеинизирующего гормона у подопытных животных в период, предшествующий гормональной стимуляции, показывает, что уровень эндогенной секреции лютеинизирующего гормона на 6-й день спонтанного полового цикла у коров, обработанных ФСГ-П и фолликотропином, был достоверно ниже, чем у животных IV группы и не превышал 0,95 МЕ/л ($P < 0,01$; 0,001), в то время как

у животных, показавших впоследствии более низкие результаты вызывания суперовуляции, эти показатели находились в пределах 1,21-1,47 МЕ/л.

Наблюдался рост концентрации ЛГ у коров I и III ($P < 0,01$; 0,05) групп к 7-му дню спонтанного полового цикла, и, напротив, снижение уровня ЛГ у животных II и IV групп.

Достоверная разница концентрации ЛГ у коров III и IV групп обнаружена на 11-й день полового цикла ($P < 0,01$); у коров I и IV ($P < 0,05$), III и IV ($P < 0,01$) групп – на 12-й день. Более высокая концентрация ЛГ в период обработки у подопытных коров I и III групп соответствовала хорошей реакции этих животных на гормональную обработку. Обнаружено достоверное увеличение количества ЛГ (пик) в крови коров всех групп в день стимулированной охоты ($P < 0,05$; 0,01). Следует также отметить наличие достоверных различий концентрации ЛГ у животных II и III ($P < 0,001$); III и IV ($P < 0,01$) групп на 6-й день стимулированного полового цикла, а также между коровами I и IV ($P < 0,001$); I и II ($P < 0,01$) групп на 7-й день стимулированного полового цикла. Коровы, обработанные ФСГ-П и фолликотропином, показали более низкий уровень секреции ЛГ на 6-й день стимулированного полового цикла по сравнению с животными, обработанными ФСГ-Б и фоллитропином.

Отрицательная корреляция между уровнями секреции ФСГ и ЛГ ($r = -0,44$; $P < 0,05$) у коров, обработанных ФСГ-П, за весь период исследований соответствует результатам, полученными Hiller S. [295], Gerther O. [279], при изучении гормональной регуляции фолликулярного роста у нормально циклирующих самок, когда высокие уровни ФСГ соответствуют низким количествам ЛГ, и наоборот, в различные фазы полового цикла.

Результаты анализа секреции эндогенных гонадотропинов у стимулированных животных, полученные в наших опытах, согласуются с данными Gerther O. et al. [162], Hillier S. [175], которые подтверждают зависимость множественного роста

фолликулов от последовательно увеличивающихся в ранней фолликулярной фазе концентраций гонадотропных гормонов.

Не обнаружено достоверных отличий по концентрации пролактина у коров в период, предшествующий гормональной стимуляции, а также в период обработки. У коров, которым вводили ФСГ-П и фолликотропин, наблюдали достоверное снижение уровня пролактина к 7-му дню суперовуляционного цикла ($P < 0,001$; $0,01$), по сравнению с животными, обработанными ФСГ-Б.

У коров, обработанных фолликотропином, отмечено наличие отрицательной корреляции между уровнями секреции пролактина и эстрадиола ($r = -0,52$; $P < 0,05$) за весь период исследований, что подтверждает выводы McNatty K. [214] о подавлении синтеза пролактина при избыточной секреции эстрогенов.

В результате проведенных исследований определена эффективность различных типов гонадотропинов, которые отличаются степенью воздействия на динамику секреции эндогенных гормонов (в особенности ФСГ, ЛГ): плавное изменение их концентрации (как в случае с ФСГ-П и фолликотропином) обеспечивает высокий уровень суперовуляции и выход жизнеспособных эмбрионов.

2.3.6. Прогнозирование эффективности гормональной стимуляции суперовуляции у коров-доноров

Эффективность применения метода трансплантации эмбрионов во многом зависит от клинического и физиологического состояния коров, их предрасположенности реагировать на экзогенные гонадотропины и способности обеспечивать условия для формирования достаточного количества качественных зародышей [24]. Обычно доля таких животных в стаде не превышает 50...60% [50].

По данным Бушманова В.И. и Смысловой Н.И. [10] из предварительно не проверенных животных реагирует суперовуляцией около 72% с приживляемостью после пересадки

38%. У предварительно отобранных коров аналогичная реакция наблюдается у 95% доноров и приживляемость их эмбрионов более высокая - до 75%.

Донор - это животное высокой племенной ценности, в связи с чем первое, на что обращают внимание при их отборе - это молочная продуктивность, которая за ряд лактации должна быть на 50...60% выше стандарта данной породы, а содержание жира в молоке на 20% /30/. Племенная ценность должна подтверждаться не только высокой продуктивностью самой коровы, но и ее родственников. Наряду с молочной продуктивностью для отбора доноров используют и другие селекционные параметры, такие как содержание белка в молоке, крепость конституции, экстерьер, морфофункциональное состояние вымени, легкость отелов, жизнеспособность приплода.

В Республике и за рубежом предпринимались и предпринимаются попытки прогнозировать эмбриопродуктивность потенциальных доноров путем анализа крови и молока на предмет взаимосвязи присутствующих в них соединений, регулирующих обмен веществ и гормонов, определяющих половое поведение животного с их реакцией на гормональную обработку.

По данным Антане В. и др. /2/, концентрация в крови общего белка, кальция, фосфора, глюкозы, каротина, витамина А, кислотной емкости и гаммаглобулина у коров с хорошим выходом эмбрионов и при их отсутствии достоверно не отличались. Пасицкий Н.Д. и др. /64/ отмечают, что выход эмбрионов тесно взаимосвязан с уровнем каротина. Количество овуляций составило 3,0 при его содержании от 120 до 200 мкг%, а выход эмбрионов - 0,45; при уровне же каротина 601...800 мкг% эти показатели увеличились до 8,14 и 6,0 соответственно.

Исследованиями Леткевич Л.Л. /50/ установлено, что высокому уровню суперовуляции соответствовала активность щелочной фосфатазы в пределах 1,03... 1,12 мкмоль/л, содержание общего холестерина 127,85...143,82 мг/100 мл, общего белка 7,30...7,99 г%. Показательными в этом отношении

выглядят исследования по определению в крови доноров концентрации иммуноглобулинов. Их содержание в пределах 13...14 и 3...5 мг/мл (JgG и JgM) с определенной достоверностью свидетельствовало о выходе не менее 70% полноценных эмбрионов от общего числа полученных. Леткевич Л.Л. /50/ выявил положительную связь между концентрацией общего холестерина в молоке коров и числом пригодных к пересадке эмбрионов. Приведенные данные подтверждаются и результатами других работ /112/, которые утверждает, что при отборе коров-доноров для трансплантации необходимо определять состояние обмена веществ в основном по трем показателям: концентрации холестерина (100... 170 мг%), каротина (не менее 300 мг%) и резервной щелочности (от 500 до 600 мг%).

Таким образом, характеристика интенсивности и качества обменных процессов, протекающих в организме животного, могут служить индикатором восприимчивости яичников к гонадотропинам.

Значительный объем исследований был проведен и в направлении прогноза эмбриопродуктивности по концентрации в крови и молоке гормонов. По результатам исследований Рябых В.П. /83/ была установлена положительная коррелятивная связь между уровнем прогестерона и эстрадиола в крови и молоке перед гормональной обработкой и общим выходом эмбрионов. Однако с уровнем качественных зародышей данные показатели не коррелировали. В то же время Смыслова Н. /94/ считает, что оптимальным уровнем прогестерона у коров-доноров перед обработкой следует считать 2 и более пг/мл.

Тесно коррелировал с выходом биологически полноценных эмбрионов и уровень ФСГ перед началом гормональной стимуляции, а также длительность и интенсивность выделения эндогенного лютеинизирующего гормона при завершении гормональной обработки. Имеются отдельные работы и по изучению взаимосвязи рН буферного раствора после извлечения эмбрионов и их качеством. Коэффициент корреляции между рН буферного раствора и

долей, жизнеспособных эмбрионов составил +0,88. И своих исследованиях мы изучали динамику секреции прогестерона, эстрадиола, тестостерона, тироксина, кортизола, ФСГ, ЛГ и пролактина у коров, не реагирующих на гормональную обработку, со средней и высокой степенью суперовуляции, в период перед гонадотропной стимуляцией яичников (табл. 16).

По результатам суперовуляции животные были разделены на три группы:

I - не реагирующие на обработку (до 2-х желтых тел);

II - животные с числом желтых тел от 3-х до 7-ми;

III - животные с высокой степенью суперовуляции (от 9 до 12 желтых тел) установлена достоверная взаимосвязь ответной реакции яичников с концентрацией прогестерона на 10 й день, с ФСГ, ЛГ и кортизоном на шестой, а с пролактином на 6-ой и нулевой день спонтанного полового цикла.

Таким образом, концентрация вышеназванных гормонов в соответствующий период предшествующий гормональной обработке может быть использована в качестве прогностического показателя результатов суперовуляции.

Однако наиболее информативным критерием оценки качества вызывания суперовуляторной реакции у коров является количество пригодных к пересадке эмбрионов.

По результатам вымывания эмбрионов животные были разделены на следующие группы:

I - до 2-х жизнеспособных эмбрионов (п=9);

II - 3-7 жизнеспособных эмбрионов (п=17);

III - более 7 жизнеспособных эмбрионов (п=8).

Высокодостоверная взаимосвязь уровня выхода жизнеспособных зародышей с концентрацией гормонов установления на 0-й, 6-й и 7-й дни полового цикла. На 0-й день с концентрацией эстрадиола и тироксина на 6-й день с уровнем кортизола и на 7-й день с уровнем пролактина. При этом уровень эстрадиола и кортизола снижался с 45,5 пг/мл и 7,19 пг/мл при выходе до 2 полноценных зародышей до 8,48 пг/мл и 2,43 пг/мл при выходе более 7 жизнеспособных эмбрионов, соответственно. А тироксина и пролактина увеличился с 29,51

пг/мл и 0,8 пг/мл до 45,84 пг/мл и 2,61 пг/мл при низком и высоком выходе эмбрионов соответственно.

Таблица 16 - Влияние динамики секреции гормонов у коров-доноров в период, предшествующий гормональной обработке, на уровень суперовуляции

Исследуемый гормон	Реакция яичников	п	Дни полового цикла			
			0	6	7	10
Прогестерон, нг/мл	до 2	6	0,17 ±0,06	0,81 ±0,24	1,09 ±0,2	2,76±0,29**
Эстрадиол, пг/мл			19,14 ±8,89	37,97 ± 16,93	66,55±26,2	*
Тестостерон, нг/мл			0,11 ±0,03	0,12 ±0,03	0,18 ±0,05	79,63±12,57
Кортизол, нг/мл			9,73±4,44	0,36 ± 0,27*	4,68 ±2,33	0,22 ± 0,04
Тироксин, нг/мл			31,24 ±2,91*	30,53 ± 2,94	36,27±3,62	13,68 ±7,94
ФСГ, МЕ/л			0,48 ±0,12	0,29 ± 0,06	0,41 ±0,09	31,23 ±4,66
ЛГ, МЕ/л			1,58 ±0,14	1,29 ±0,09	1,15 ±0,04	
Пролактин, нг/мл			1,96±0,33	1,88±0,28*	1,42 ±0,28	
Прогестерон, нг/мл	3-7	17	0,29 ±0,13	1,22 ±0,27	1,76±0,32	3,94±0,41**
Эстрадиол, пг/мл			40,12 ±26,23	54,3 ± 16,3	53,02±15,0	* 80,25
Тестостерон, нг/мл			0,14 ±0,02	0,19 ±0,02	0,16 ±0,01	±19,96
Кортизол, нг/мл			9,85 ±3,97	6,78 ±2,61*	7,89 ±2,16	0,19 ±0,02
Тироксин, нг/мл			37,72 ± 2,78	29,98 ± 2,22	31,23±1,61	14,93 ±8,5
ФСГ, МЕ/л			0,99 ±0,25	0,38 ±0,07	0,55 ± 0,08	28,17 ±2,87
ЛГ, МЕ/л			1,55 ±0,09	1,06 ±0,05*	1,07 ±0,09	
Пролактин, нг/мл			1,25±0,16**	2,99 ± 0,24**	1,12 ±0,54	
Прогестерон, нг/мл	9-12	11	0,33 ±0,14	1,62 ±0,52	2,05 ± 0,56	3,43 ±0,66
Эстрадиол, пг/мл			15,39 ±3,41	18,77 ±7,21	33,38±5,76	59,73 ±22,16
Тестостерон, нг/мл			0,19 ±0,03	0,13 ±0,01	0,13 ±0,01	0,21 ±0,06
Кортизол, нг/мл			6,68±4,22	5,23 ±2,01*	6,19 ±1,94	8,27 ± 2,69
Тироксин, нг/мл			46,71 ±6,09*	35,37 ±2,16	36,57±2,46	32,92 ±3,21
ФСГ, МЕ/л			0,81 ±0,14	0,47 ±0,02**	0,37 ± 0,04	
ЛГ, МЕ/л			1,41 ±0,12	1,03 ±0,07*	1,82 ±0,39	
Пролактин, нг/мл			2,13±0,27**	2,83 ±0,41**	2,83 ±0,71	

Так же установлена хотя и не достоверная но положительная связь между уровнем прогестерона непосредственно перед обработкой (10 день) и выходом

жизнеспособных эмбрионов. Показателем высококачественных эмбрионов служит уровень прогестерона 3.47-3.61 мг/мл.

Обнаружена положительная корреляция между уровнем секреции тироксина и ФСГ у коров I группы ($r=0,35$; $P<0,05$). (табл. 17).

Таким образом, наиболее пригодными для использования в качестве доноров можно считать клинически здоровых животных, 3-6 лактации, гормональную обработку которых необходимо проводить не ранее чем через 60 дней после отела. В то же время нельзя исключать возможности использования в качестве доноров и животных других групп, имеющих высокую генетическую ценность после проведения профилактических и лечебных мероприятий.

Достоверным критерием положительной реакции яичников на экзогенные гонадотропины может служить уровень прогестерона накануне обработки (3,43...3,94 нг/мл), ФСГ и ЛГ на 6 день полового цикла предшествующий гормональной обработке (0,38...0,47 МЕ/л и 1,06...1,03 МЕ/л).

В наших исследованиях мы изучали зависимость уровня выхода жизнеспособных зародышей после стимуляции суперовуляции у коров экзогенными гонадотропинами от динамики секреции прогестерона, эстрадиола, тестостерона, кортизола, тироксина, ФСГ, ЛГ и пролактина в период, предшествующий гормональной обработке, в период стимуляции и в суперовуляционном цикле (табл. 18).

Характерным показателем высокого выхода качественных эмбрионов служит концентрация эстрадиола и тироксина на 0 день спонтанного полового цикла (8,48 нг/мл и 45,84 мг/мл), на 6-й день уровень кортизола (2,43 мг/мл), на 7-ой день уровень пролактина (26,61 мг/мл) и на 10 день уровень прогестерона (3,61 мг/мл).

Таблица 17 - Влияние динамики секреции гормонов у коров-доноров в период, предшествующий гормональной обработке, на выход жизнеспособных эмбрионов

Исследуемый гормон	Выход эмбрионов	Дни полового цикла			
		0	6	7	10
Прогестерон, нг/мл	до 2	0,13±0,04*	0,87±0,21	1,23±0,26	2,97±0,43
Эстрадиол, пг/мл		45,5±6,18***	39,5±11,1	68,3±14,6	84,5±20,0
Тестостерон, нг/мл		0,09±0,02**	0,14±0,03	0,13±0,02	0,18±0,05
Кортизол, нг/мл		11,46±2,35	7,19±1,39**	8,13±1,93	13,74±3,95
Тиоксин, нг/мл		29,51±2,18***	28,27±3,02	29,06±2,01	26,32±2,47
ФСГ, МЕ/л		0,45±0,07*	0,28±0,03**	0,78±0,15*	-
ЛГ, МЕ/л		1,53±0,09	1,31±0,11*	1,22±0,1	-
Пролактин, нг/мл		2,07±0,35	2,35±0,26	0,80±0,21***	-
Прогестерон, нг/мл	3-7	0,33±0,09	1,29±0,23	1,76±0,29	3,47±0,31
Эстрадиол, пг/мл		27,2±5,71	42,2±10,3	52,4±12,1	78,4±15,1
Тестостерон, нг/мл		0,17±0,03	0,15±0,04	0,16±0,01	0,19±0,03
Кортизол, нг/мл		8,17±2,03	5,34±1,07	5,57±1,46	10,11±2,05
Тиоксин, нг/мл		42,32±3,72	33,19±2,83	34,42±2,13	28,07±2,28
ФСГ, МЕ/л		0,87±0,15	0,42±0,05	0,54±0,11	-
ЛГ, МЕ/л		1,5±0,12	1,05±0,08	1,63±0,23	-
Пролактин, нг/мл		1,39±0,27	2,58±0,21	2,47±0,36	-
Прогестерон, нг/мл	Более 7	0,38±0,12	1,63±0,46	2,23±0,43	3,61±0,51
Эстрадиол, пг/мл		8,48±1,36	20,2±9,02	21,1±8,33*	52,5±13,7
Тестостерон, нг/мл		0,18±0,02	0,16±0,04	0,16±0,03	0,20±0,05
Кортизол, нг/мл		6,79±1,18	2,43±0,59	5,31±1,64	12,05±3,19
Тиоксин, нг/мл		45,84±3,29	35,82±2,96	40,04±3,24	38,17±3,12**
ФСГ, МЕ/л		0,96±0,19	0,45±0,04	0,35±0,08	-
ЛГ, МЕ/л		1,51±0,13	0,96±0,07	1,55±0,19	-
Пролактин, нг/мл		1,93±0,33	2,76±0,31	2,61±0,41	-

Таблица 18 - Корреляционная связь между изучаемыми показателями

Показатели	Количество жизнеспособных эмбрионов	r	P
Эстрадиол - тестостерон	до 2-х	0,52	0,05
	3-7	0,48	0,05
	более 7	0,46	0,05
Кортизол – количество пригодных к пересадке эмбрионов	3-7	-0,18	0,05
	более 7	-0,16	0,05

ГЛАВА 3. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГОРМОНАЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ

3.1. Кратность и интервал между обработками

Практика использования трансплантации эмбрионов в молочном скотоводстве показывает на более высокую эффективность многократных обработок коров доноров /107, 176/. Однако здесь возникает ряд вопросов, связанных с реакцией организма животного на многократные гормональные нагрузки, многократному извлечению эмбрионов. Первое – это необходимость выдержки потенциального донора от отела до полного восстановления репродуктивных органов, что в среднем составляет 45...60 дней. Второе – возникает вопрос о чувствительности яичников и в целом организма к многократным гормональным инъекциям, об устойчивости матки к многократным извлечениям эмбрионов. Кроме этого организму животного необходимо отдохнуть от повышенных гормональных нагрузок. Все это требует пристального внимания и изучения.

Многие годы бытовало мнение о том, что интервал между гормональными обработками должен быть не менее двух циклов или 60-70 дней. Однако начиная с конца 1990-х годов ряд исследователей значительно сократили этот интервал. С этой целью сразу же после извлечения эмбрионов донору инъецировали простагландин и вводили прогестагеновый имплантат. Через 10 дней имплант извлекался, а гормональная стимуляция начиналась после наступившей охоты. Результаты этой работы на донорах красной ангусской породы приведены в таблице 19.

Таким образом, сокращение интервала между обработками до 40 дней не оказало влияния на выход эмбрионов.

Что касается кратности обработок, то первые этапы исследований характеризовались противоречивыми суждениями о возможности многократного использования доноров. В одних работах говорилось о невозможности данного мероприятия в связи с выработкой антител против СЖК, в других говорилось

об усиленных повторных (через 6 недель) стандартных для суперовуляции обработках 14 телок разных пород: 2000 ИЕ гонадотропина СЖК и через 48 ч простагландин F2a. Большинство телок проявили удовлетворительную реакцию. И даже 10-я обработка была сравнима, но результатам со второй. Вторая обработка была примерно так же эффективна, как первая. Учитывая потенциал повторных обработок необходимо согласиться с тем, что именно этот способ будет применяться при трансплантации эмбрионов. У некоторых коров, не реагировавших на первую гормональную обработку, при повторных получают хорошие результаты суперовуляции.

Таблица 19 - Влияние интервала между обработками на эффективность получения эмбрионов

Качество доноров	24
Период обработки, мес. (дн)	18 (548)
Общее количество обработок	332
в т.ч. на донора (лимит)	13,8 (11-16)
Средний интервал между обработками, дн.	39,7
Общее число полученных эмбрионов	1812
в т.ч. на донора (лимит)	76(26-162)
Количество эмбрионов на одну обработку (лимит)	5,5 (0-35)

Известны экспериментальные данные, когда животных с успехом обрабатывали СЖК до 5 раз в год с интервалом в 45...65 дней, включая первую охоту после обработки. При этом число овуляций у повторно обработанных коров достигает 9,4 по сравнению с 9,1 после первой гормональной обработки, а яйцеклеток и эмбрионов 5,8 и 6, соответственно. Однако индекс оплодотворяемости яйцеклеток после повторных обработок СЖК в 2 раза меньше (41 по сравнению с 82%), чем после первой обработки. Это указывает на то, что внутривариальные, фолликулярные условия являются причиной снижения оплодотворяемости яйцеклеток после повторных обработок.

При первой обработке гонадотропином перегуливающие бесплодные коровы реагируют суперовуляцией до 85% со средним уровнем овуляции 8,9 на каждого положительного донора. Вторая обработка у некоторых животных (до 3%) сопровождается появлением кист в яичниках.

Наибольшее число неоплодотворенных яйцеклеток наблюдается у «проблемных» коров (до 40%), а также у коров после второй гормональной обработки (до 25%).

Причины разной оплодотворяемости пока неизвестны. По-видимому, они могут быть связаны с различными внешними факторами, гормональной обработкой, возрастом и лактационным статусом, содержанием и кормлением, дозой и качеством спермы, техническим исполнением искусственного осеменения, временем осеменения в период охоты.

В тоже время некоторые данные (113) говорят о довольно высокой эффективности многократной обработки доноров эмбрионов (табл. 20).

Таблица 20 - Влияние количества гормональных обработок и сокращения интервала между ними на эмбропродуктивность доноров

Кол-во	Порядковый номер обработки														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
доноров	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	23	21	17	7
эмбрионов	5,7	5,7	3,7	5,8	4,5	6,2	4,6	4,9	5,8	4,3	8,5	5,3	3,9	7,2	6,9

Возможность длительного сохранения способности к суперовуляции в ответ на повторные обработки гонадотропином СЖК подтверждается и результатами исследований, показавшими, что антитела против препарата не образуются.

По данным Janowitz, U. /184/ хорошую суперовуляторную реакцию на повторную обработку наблюдали только у 32% животных. Как правило, хорошо реагировали повторно те доноры, которые дали хорошую реакцию и в первый раз. В то же

время на выход полноценных зародышей повторная процедура влияния практически не оказывала.

Эти данные согласуются и с результатом работы Сергеева Н.И. и др. /88, 89/, анализ которых показывает, что при многократной обработке ФСГ-Р (5...6 раз), число овуляций и нормальных эмбрионов не снижается, а у отдельных коров даже возрастает. А определяющее влияние на повторную обработку имеет результативность предыдущей обработки, а также контроль за физиологическим состоянием животного, что позволяет использовать его не менее 4...5 раз в год.

В экспериментах Хилькевич С.Н. и др. /12/ коровы-доноры обрабатывались 2, 3 и 4 раза. Анализ полученных результатов показал стабильную тенденцию снижения показателей суперовуляции после каждой последующей обработки, аналогичная тенденция наблюдалась и по выходу биологически полноценных эмбрионов. Однако авторы считают все-таки по суммарному эффекту число жизнеспособных эмбрионов на донора при четырехкратной обработке было почти в 2 раза выше по сравнению с двух- и трехкратной обработкой.

Несколько иным должен быть подход к донорам, которые продолжают лактировать, потому что одно из основных требований племенных служб хозяйств является минимальный сервис-период высокопродуктивных коров. Предложенная Тарасенко Н.В. и др. /165/ схема подготовки и обработки коров-доноров позволяет при однократной обработке животных обеспечить стельность животных спустя 32 дня после извлечения зародышей. О том, что коров пригодных для дальнейшего хозяйственного использования не рекомендуется подвергать гормональной обработке более 2 раз говорят и Сергеев Н.И. и др. /88/.

Аналогичные выводы делают и другие, которые отмечают, что однократная гормональная стимуляция донора после отела более эффективна, чем многократное использование.

Проблемой, требующей к себе внимания в связи с вопросом продолжительности использования коров доноров является оптимальный режим гормональной стимуляции

интервал между обработками. А также длительность гормонального воздействия.

В исследованиях Самарютель Я. животные опытных групп использовались для стимуляции суперовуляции с 46 по 150 день после отела. Анализ полученных результатов показал, что оптимальным сроком получения эмбрионов является период с 76 по 90 день после отела, хотя эмбрионы можно получить и в более ранние сроки. Однако оптимальным все-таки является период не ранее шестидесятого дня после растела.

К выше сказанному следует добавить, что вызванная многократной стимуляцией полиовуляция подвержена высокой вариабельности, которая объясняется тем, что не все доноры предрасположены к многократной гормональной обработке. Поэтому необходим тщательный отбор доноров по ряду признаков, обеспечивающих максимальный выход пригодных к пересадке эмбрионов. Резюмируя данный вопрос, следует добавить, что гормональная стимуляция животных сопровождается усилением метаболических процессов не только в яичниках, но и во всем организме. Поэтому если стоит вопрос о длительном использовании коровы в качестве донора необходимо обеспечить условия для нормального протекания процессов оогенеза, оплодотворения и формирования зародышей, путем полноценного сбалансированного кормления.

Наши исследования показали, что в целом количество гормональных обработок не повлияло на число среагировавших доноров (табл. 21).

В среднем эта цифра колебалась от 80 до 91,1%. Не отмечено существенных различий по числу овуляций (7,4...11,1). Число извлеченных зародышей уменьшалось после третьей гормональной обработки, тоже самое можно сказать и о полноценных зародышах, выход которых снизился с 6,8 (3-я обработка) до 1,8 (7-ая обработка). Значительно снизилась и оплодотворяемость яйцеклеток с 94,4...98,8 при 1-ой, 2-ой и 3-ей обработках до 64,3% при 7-ой обработке.

Данные показатели характеризуют эффективность популяции доноров в среднем по числу обработок. Было

интересно выяснить влияние на качественные показатели кратности гормональных обработок одних и тех же доноров.

Таблица 21 - Влияние кратности гормональной обработки на эмбриопroduкцию коров-доноров

Показатели	Количество обработок						
	1	2	3	4	5	6	7
Количество доноров, гол	149	57	45	34	28	10	7
Реагировало полиовуляцией п-%	133-89,3	51-89,5	41-91,1	28-82,3	24-85,7	8-80	6-85,7
Число овуляций на донора	9,9±1,51	9±1,31	11,1±2,1	8,7±1,1	7,9±1,6	8,5±1,49	7,4±0,91
Получено эмбрионов на донора	7,3±0,59	7,5±1,1	8,3±1,0	5,7±1,41	6,2±1,5	5,8±1,4	4,2±0,9
В т.ч. нормальных	6,1±0,25	5,3±0,51	6,8±0,15	4,1±1,7	2,2±0,2	2,1±0,1	1,8±0,19
н/о яйцеклеток	0,41±0,4	0,13±0,1	0,13±0,1	0,2±0,15	2,0±1,0	1,6±2	1,5±0,19
дегенерированных	0,79±	2,1±	1,4±	1,4±	2,0±1,1	2,1±	0,9±
оплодотворяемость	94,4	98,7	98,8	96,5	67,7	72,4	64,3

С этой целью было сформировано 6 групп животных (табл. 22). Животных первой группы обрабатывали 2 раза; 2-ой – 3 раза и т.д. По итогам опыта было установлено, что если по количеству среагировавших на гормональную обработку животных четкой зависимости не отмечено, то по числу овуляций на донора, числу извлеченных зародышей и в т.ч. полноценных прослеживается тенденция к снижению данных показателей.

Таким образом, эффективность гормональных обработок с ростом их количества снижается, однако за счет общего количества полученных эмбрионов этот недостаток нивелируется.

В таблице 23 приведены результаты гормональной обработки коров-доноров немецкой черно-пестрой породы, из которых видно, что четкой закономерности по числу среагировавших животных не наблюдается. В то время как количество овуляций на донора резко сокращается после шестой обработки. То же самое можно сказать о числе полученных зародышей и о зародышах пригодных к пересадке.

Таблица 22 - Влияние повторных гормональных обработок на выход эмбрионов

Группа	Очередь обработки	Обработка но коров	Среаг-ло полиовул.	Число овуляций на донора	Получено зародышей на донора	В том числе жизнеспосо- бных п-%
1	1	19	17-89,5	10±1,0	8,1±1,2	6,7-82,7
	2	19	18-94,7	11±0,53	9,3±0,9	8,0-86,0
2	1	17	15-88,2	7,2±1,3	6,3±0,75	5,0-79,4
	2	17	16-94,1	6,4±0,95	6,0±1,1	5,3-88,3
	3	17	15-88,2	6,1±1,1	5,4±1,35	4,7-87,0
3	1	11	10-90,9	12±1,0	9,7±0,47	8,1-83,5
	2	11	10-90,9	12,3±0,5	9,3±0,54	7,9-84,9
	3	11	9-81,8	10,1±0,2	8,7±1,4	6,5-74,7
	4	11	8-72,7	7,8±0,33	5,4±1,2	4,0-74,1
4	1	8	8-100	8,1±0,27	7,1±1,2	6,7-94,4
	2	8	8-100	8,9±0,99	8,0±0,79	7,1-88,7
	3	8	7-87,5	7,2±0,71	6,7±0,9	5,0-74,6
	4	8	8-100	5,0±0,53	3,0±0,71	1,5-50,0
	5	8	6-75,0	6,0±0,33	3,7±0,71	1,0-27,0
5	1	7	6-85,7	10,4±0,5	9,1±1,0	8,1-89,0
	2	7	7-100	11,0±1,1	9,6±1,2	8,0-83,3
	3	7	6-85,7	8,4±1,2	7,0±0,87	6,1-87,1
	4	7	6-85,7	8,2±0,79	7,4±1,5	6,2-83,8
	5	7	7-100	6,4±1,3	5,0±0,51	2,9-58,0
	6	7	5-71,4	5,3±0,98	4,7±1,3	2,0-42,5
6	1	7	7-100	8,1±0,15	8,0±1,15	7,0-87,5
	2	7	7-100	8,6±0,49	7,7±1,32	6,8-88,3
	3	7	6-85,7	8,4±0,51	7,9±0,87	6,1-77,2
	4	7	6-85,7	7,1±0,79	6,8±0,79	5,5-80,9
	5	7	5-71,4	6,9±1,3	5,0±1,1	4,0-80,0
	6	7	6-85,7	6,1±0,9	4,7±1,3	2,1-44,7
	7	7	5-71,4	4,0±1,0	3,9±0,91	1,5-38,5

Если все это рассматривать в разрезе доноров, то здесь четко прослеживаются индивидуальные особенности доноров. Так если такие доноры как Ангара, Ивушка, Мая, Пчелка и Нахалка на протяжении всего периода обработок показывали стабильно высокие результаты по выходу жизнеспособных зародышей, то все остальные (табл. 24) наоборот показывали

стабильно низкие результаты. Так средний показатель по пригодным эмбрионам в группе названных животных составил 9,7 (4,75-16,7) эмбриона, у остальных – этот показатель составил всего лишь 2,1 эмбриона на донора.

Таблица 23 - Многократное использование немецкого скота в качестве доноров эмбрионов

Показатели	Кратность обработки								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Обработано, гол.	10	9	9	9	8	5	2	1	1
Реагировало полиовуляцией (п-%)	6-60,0	7-77,8	7-77,8	6-66,7	7-87,5	3-60,0	2-100	1	1
Число овуляций - в ср. на донора	94-15,7	73-10	88-12	56-9,3	75-10	39-13,0	11-5,5	4-4,0	2-2,0
Получено эмбрионов в ср. на донора	77-12,8	57-8,1	70-10	41-6,8	58-8,3	27-9,0	4-2,0	2-2,0	2-2,0
в т.ч. пригодных п-%	25-4,2 32,5	44-6,3 77,2	44-6,3 62,8	32-5,3 78,0	46-6,6 79,3	21-7,0 77,8	2-1,0 50,0	2-2,0 100,0	– 0,0
Дегенерированных п-%	7-1,2 9,1	4-0,6 7,0	14-2,0 20,0	2-0,3 4,9	1-0,1 1,7	77,8 –	50,0 –	100,0 –	0,0 0,0
Яйцеклеток п-%	45-7,5 58,4	9-1,3 15,8	12-1,7 17,1	7-1,2 17,1	11-1,6 19,0	6-2,0 22,2	2-1,0 50,0	– 0,0	2- 100

Таблица 24 - Индивидуальные особенности при многократной обработке

Донор	Срок использования, месяцев	Кол-во обработок	Реагир. суперов ул.	Овуляций, всего	Эмбрионов, всего	Пригодных	Дегенерирован.	Яйцеклеток	Пригодных на 1 вымыв.
Загадка	20	10	6	38	28	14	-	14	2,3
Ангара	20	6	4	51	37	33	4	-	8,2+
Заря	24	5	5	38	16	9	-	7	1,8
Сказка	19	7	5	50	37	13	-	24	2,6
Галка	18	6	5	35	17	8	3	6	1,6
Ивушка	18	6	5	98	86	43	9	34	8,6+
Мая	17	5	4	85	80	67	7	6	16,7+
Мазурка	14	4	2	9	7	4	1	2	2,0
Пчелка	10	5	3	28	24	23	-	1	7,7+
Нахалка	12	5	4	42	30	19	6	5	4,75+

При многократном использовании коров-доноров герефордской породы количество животных ответивших реакцией, количество овуляций на донора также как и выход эмбрионов на протяжении всех использований оставались стабильно высокими, а к пятой-шестой обработке даже несколько выросли (табл. 25). Чего нельзя сказать о пригодных к пересадке зародышах. Их количество увеличивалось до третьей гормональной обработки, после чего резко сократилось с 70,6% до 35,7%. В то время как число дегенерированных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток увеличилось и к шестой обработке составило 64,2% от числа извлеченных клеток.

Таблица 25 - Эффективность многократных обработок доноров Герефордской породы

Показатели	Число обработок					
	1	2	3	4	5	6
Обработано доноров, гол.	13	9	6	4	2	1
Реагировало полиовуляцией, п - %	12-92,3	5-55,5	6-100	4-100	2-100	1-100
Число овуляций на донора	12,6	11,0	9,7	7,0	15,0	18,0
Число эмбрионов на донора	11,6	8,6	6,8	6,5	13,0	14,0
в т.ч. пригодных, п - %	7,2-62,1	5,6-65,1	4,8-70,6	2,5-38,5	5,5-42,3	5,0-35,7
дегенерированных, п - %	1,2-10,1	1,4-16,3	0,7-9,7	-	1,5-11,5	8,0-57,1
н/яйцеклеток, п - %	3,2-27,3	1,6-18,6	1,3-19,5	4,0-61,5	6,0-46,1	1,0-7,1

Также как и у немецкого черно-пестрого скота, у герефордов четко прослеживаются индивидуальные особенности по эффективности гормональной обработки. Из 23 эмбрионов полученных от донора № 105 21 или 91,3% оказались пригодными к пересадке (табл. 26). А у донора № 29 из 11 -10 или 90,9%. Высокими показателями по выходу жизнеспособных эмбрионов характеризовались доноры № 400, 403, 401, 270, 231, уровень которых составлял от 58,3% до 71,4%. В то время как у таких доноров как №951 и 433 данный показатель не поднимался выше 20%.

Таблица 26 - Индивидуальные особенности многократной обработки доноров Геррефордской породы

Доноры	Показатели						
	Число обработок	Реагировало полиовул., гол.	Овул-й, всего	Получено эмбр-нов, всего	В том числе		
					пригодны х, п - %	Дегенерир ованных, п - %	н/яйцекле ток, п - %
406	5	5	58	43	18-41,9	3-6,9	22-51,1
400	3	2	7	5	3-60	-	2-40
403	1	1	6	6	4-66,7	-	2-33
433	4	4	48	44	9-20,4	-	35-79,6
401	2	1	6	4	3-75	-	1-25,0
500	2	1	13	13	6-46,1	-	7-54,8
105	4	3	32	23	21-91,3	-	2-8,7
29	1	1	12	11	10-90,9	-	1-9,1
270	6	6	92	84	49-58,3	25-29,8	10-11,9
108	1	1	18	18	8-44,4	4-22,2	6-33,3
802	3	2	17	12	6-50	1-8,3	5-41,7
231	1	1	21	21	15-71,4	1-4,8	5-23,8
951	2	2	10	5	1-20	1-20,0	3-60,0

Практически не отличался характер эффективности гормональных обработок у доноров ангусской породы (табл. 27, 28).

Таблица 27 - Многократное использование доноров Абердин-ангусской породы

Показатели	Кратность обработок								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Обработано доноров, п	19	18	15	8	6	4	1	1	1
Реагировало полиовуляцией п - %	12-63	15-83,3	14-93,3	7-87,5	3-50	3-75,0	1	-	1
Число овуляций на донора	11,6	11,6	11,2	8,6	4,5	6,0	9,0	-	11,0
Получено эмбрионов на донора	8,5	9,1	6,8	4,7	6,8	4,0	7,0	-	8,0
пригодных, п-%	4,3-54	4,3-47,2	5,3-77,9	4,1-87,2	4,0-58,8	3,3-82,5	-	-	-
дегенерированных, п-%	0,7-8	1,8-21,1	0,8-9,4	0,6-8,3	0,7-14,3	0,3-8,3	-	-	-
Яйцеклеток, п -%	2,9-34	25-27,5	3,0-44,1	2,1-44,7	-	0,3-7,5	7	-	8

По результатам исследований не установлено четкой зависимости от кратности обработок ни по количеству среагировавших животных, ни по уровню овуляции и выходу эмбрионов на донора. Характерно только то, что выход полноценных зародышей, от числа извлеченных увеличивался до 7 обработок, после чего получали только неоплодотворенные яйцеклетки.

Таблица 28 - Индивидуальные особенности многократной обработки доноров Абердин-ангусской породы

Донор	Показатели						
	Число обработок	Реаг-ло полиовуляций, гол.	Овуляций, всего	Получено эмбрионов, всего	в том числе		
					пригодных, п - %	дегенерированных, п - %	н/яйцеклеток, п - %
0096	9	6	64	44	14	9	21
0097	3	2	34	22	2	6	14
0135	3	3	49	31	21	1	9
0099	4	3	37	32	11	9	12
0132	6	6	48	30	22	1	7
0396	3	2	28	16	10	1	5
0497	7	4	49	41	22	-	19
0385	4	4	46	30	15	3	12
0435	3	1	6	6	2	3	1
0393	3	3	57	57	41	8	8
0436	6	5	30	17	6	1	10
0427	5	2	12	12	8	2	2
0380	2	1	8	6	6	-	-
0466	2	2	16	11	1	5	5
0368	2	2	16	11	9	-	2
0128	1	1	14	12	10	1	1
0244	5	5	39	23	19	2	2
0205	3	2	29	13	7	2	4
0237	4	1	14	12	12	-	-

Было интересным определить влияние породных особенностей доноров на кратность их использования для получения эмбрионов (табл. 29).

Из результатов исследований приведенных в таблице можно увидеть, что при многократной обработке доноров чернопестрой немецкой породы из десяти животных до шестой

обработки дошло 9 голов у ангусов из 19 – 7, а у герефордов из 13 – 1 голова.

Количество животных, реагирующих на 1 и 6 гормональную обработку у черно-пестрого скота составило 60 и 77,8%, у ангусов – 63,2 и 71,4 и у герефордов 92,3% и 100% соответственно. Число овуляций на донора и выход пригодных к пересадке эмбрионов составило у черно-пестрого скота 15,7, 8,0 и 58,6 и 72,0%; ангусов 11,6, 7,6 и 54,4 и 37,0% и у герефордов 12,6, 18,0 и 62,1, 35,7%, соответственно.

Таблица 29 - Влияние породных особенностей доноров на кратность их использования

Показатели	Одна гормональная обработка			Шесть и более гормональных обработок		
	немецкий ч/пестр.	ангус	герефорд	немецкий ч/пестр.	ангус	герефорд
Обработано доноров, п	10	19	13	9	7	1
реагировало полиовуляцией, п - %	6,0-60	12-63,2	12-92,3	7-77,8	5-71,4	1-100
Число овуляций на донора, п	15,7	11,6	12,6	8,0	7,6	18,0
Получено эмбрионов на донора	12,8	7,9	11,6	5,0	5,4	14,0
в т.ч. пригодных, п - %	7,5-58,6	4,3-54,4	7,2-62,1	3,6-72,0	2,0-37,0	5,0-35,7
дегенерированных, п - %	1,2-9,4	0,7-8,9	1,2-10,3	-	0,2-3,7	8,0-57,1
н/яйцеклеток, п - %	4,2-32,8	2,9-36,7	3,2-27,6	1,4-28,0	3,2-59,2	1,0-7,1

Таким образом, количество доноров выдерживавших гормональную нагрузку с первой по шестую и более обработку у немецкой черно-пестрой породы составило 90% от первоначального числа доноров у ангусов 36,8%, а у герефордов всего лишь 7,6%.

Число овуляций сократилось на 46,7% и 44,5% у черно-пестрых и у ангусов и увеличилось на 42,8% у герефордов. А выход жизнеспособных зародышей у черно-пестрого немецкого скота увеличился с 58,6% до 72,0 у ангусов снизился с 54,4 до 37,0% у герефордов с 62,1% до 35,7%.

3.2. Суперовуляторная реакция коров-доноров различных пород

Генетически обусловленная плодовитость – фактор, проявляемый при индуцировании полиовуляции экзогенными гонадотропинами, у коров различных пород имеет существенные различия. Известно, что коровы фризской породы относительно слабо реагируют на суперовуляторные обработки. Для мясного скота характерна более высокая восприимчивость к гонадотропинам /217/.

Есть сведения, что породы и даже внутripородные линии крупного рогатого скота могут заметно различаться по реакции на одну и ту же дозу гонадотронина. Описана тенденция к более слабой реакции фризского скота по сравнению с шароле́зским и герефордским и ангусским. Результаты опытов кембриджской группы исследователей на телках и коровах фризской породы показали, что они удовлетворительно реагируют па оптимальную для них дозу гонадотропина СЖК. Она должна быть не менее 2000 ИЕ, чтобы вызвать суперовуляцию.

По одним данным, суперовуляторная реакция лучше выражена у телок, чем у коров. По другим данным, не обнаружено достоверных различий по уровню овуляции и выживаемости зародышей у животных голштинской породы в возрасте от 16 месяцев до 17 лет. В третьей работе показана общая тенденция к уменьшению числа полостных фолликулов с 4-летнего возраста до их явного отсутствия у коров в возрасте 15...20 лет.

В наших исследованиях в качестве доноров эмбрионов использовались 3 породы: Черно-пестрая (Голштины), Герефордская и Абердин-ангусская.

В ходе экспериментов установлено, что от 66,7 од 76,5% доноров от числа обработанных реагировали суперовуляцией, то есть имели не менее 3 овуляций на яичниках (табл. 30). В группе герефордов отмечен наиболее высокий уровень полиовуляции – 11,8 овуляций в среднем на донора, выход эмбрионов и

яйцеклеток – в среднем 10,2, в том числе нормальных эмбрионов – 6,9 на донора.

Таблица 30 - Влияние породы на результаты полиовуляции у коров-доноров

Показатели	Порода коров-доноров		
	Черно-пестрая	Герефордская	Абердин-ангуская
Обработано животных	81	24	29
Реагировало полиовуляцией	62	16	21
% от числа обработанных	76,5	66,7	72,4
Овуляций в среднем на донора	9,6	11,8	10,1
Получено эмбрионов и н. яйцеклеток в среднем на донора	7,2	10,2	7,3
в т.ч. пригодных	4,6-63,9	6,9-67,6	4,3-58,9
дегенерированных	1,1-15,3	1,7-16,7	1,5-20,5
яйцеклеток	1,6-22,2	1,6-15,7	1,4-19,2

Коровы черно-пестрой и абердин-ангусской пород по овулирующей реакции яичников несколько уступали герефордам и имели в среднем по 9,6 и 10,1 овуляций на донора.

Аналогичная тенденция наблюдается в общем выходе зародышей – 7,2 и 7,3 соответственно, и нормальных эмбрионов – 4,6 и 4,3 в среднем на донора.

Во всех 3-х группах число дегенерированных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток составляло от 1,1 до 1,7 в среднем на донора или от 14,7 до 20,3% и от 1,4 до 1,6 или от 15,3 до 21,8%, соответственно.

Таким образом, абердин-ангусская мясная порода не имела преимуществ перед черно-пестрой по уровню суперовуляции и выходу пригодных эмбрионов. Использование герефордов в этом отношении было наиболее эффективным, что позволяло получать в 1,5 раза больше нормальных эмбрионов.

3.3. Влияние возраста донора и длительности сервис-периода на эффективность гормональной обработки

Фактором, влияющим на эффективность трансплантации эмбрионов, является возраст донора. Так, у первотелок и коров старше 9 лет выход зародышей ниже, чем у 4-8-летних [11, 27, 36]. В среднем число пригодных к пересадке эмбрионов у коров-доноров в возрасте 3-9 лет выше, чем у коров 10-12 лет: 6,9 (56%) против 1,9 (2%). В зависимости от возраста колебалось число животных, реагировавших суперовуляцией (от 53,3% до 100%) 113/. В то же время существует мнение, что эмбриопродуктивность в большей степени зависит от индивидуальных особенностей доноров, чем от возрастных различий.

Результаты наших исследований (табл. 31), показывают, что если по количеству реагирующих животных и уровню суперовуляции особой разницы не было, то по выходу эмбрионов на донора, коровы 7-ой и более лактации уступали более молодым животным (1-2 и 3-6 лактации) на 12,5 и 22,2%, соответственно. В отношении биологически полноценных эмбрионов этот показатель составил 19,2 и 31,2%, соответственно. Оплодотворяемость яйцеклеток у доноров 7 и более лактации снижалась на 6,4... 10,3% по сравнению с животными 1-2 и 3-6 лактации.

Таким образом, прослеживается четкая тенденция повышения эффективности гормональной обработки доноров 3—6 лактации по сравнению с более молодыми или старыми животными.

Не менее важным, а может даже и определяющим фактором при отборе доноров является состояние репродуктивных органов. Как правило, для гормональной обработки следует отбирать животных не ранее 2,5-3 месяцев после отела. При этом уменьшение размеров матки до соответствующих физиологической норме не может служить критерием готовности доноров продуцировать биологически полноценные эмбрионы, потому что у многих коров первая

овуляция происходит через 25-30 дней после отела при еще увеличенной матке и не завершенной перестройке эндометрия [96].

Таблица 31 - Влияние возраста коров-доноров на уровень и качество множественной овуляции

Показатели	Возраст донора (лактации)		
	1-2	3-6	7 и более
Обработано животных, гол.	60	54	41
Реагировало полиовуляцией, гол.	50	50	37
Процент от числа обработанных	83,3	92,5	90,2
Среднее число овуляций на донора, $\bar{x}$	9,0±0,8	10,5±0,81	10,2±1,2
Получено эмбрионов всего, $\bar{x}$	336	414	252
Среднее число извлеченных эмбрионов на донора, $\bar{x}$	8,0±0,6 5	9,0±0,72	7,0±0,91
в т.ч. пригодных к пересадке, $\bar{x}$	5,2±0,8	6,1±0,89	4,2±0,93
дегенерированных и отставших в развитии, $\bar{x}$	2,4±0,4	2,8±0,81	2,0±0,8
неоплодотворенных яйцеклеток, $\bar{x}$	0,4±0,1	0,1±0,12	0,8±0,73
Уровень оплодотворяемости, %	95,0	98,0	88,0

По данным Сергеева и др.. [88, 89], из 106 оперированных нехирургическим способом коров-доноров эмбрионы не получены у 40 из-за скрытых форм эндометрита и других заболеваний родополовых путей. В свою очередь, другие исследователи утверждают, что диагностируемые кисты яичников, нарушения функций гениталий не являются основанием для исключения данных животных из числа доноров эмбрионов, поскольку диагностика заболеваний на основе клинических исследований дает возможность определить направление восстановления функций размножения на основе экзогенной гормонотерапии.

О необходимости предварительного отбора доноров говорят и результаты наших исследований (табл. 32), анализ которых показывает, что, несмотря на практически одинаковый

уровень множественной овуляции, по основным признакам: оплодотворяемости яйцеклеток и выходу пригодных к пересадке эмбрионов, доноры с сервис периодом до 60 дней значительно уступают животным с сервис периодом в 60-90 дней и более 90 дней (по оплодотворяемости яйцеклеток на 18,6 и 10,7%, а по выходу жизнеспособных зародышей на 49,2 и 40,8%, соответственно), что говорит о не вполне удовлетворительном восстановлении репродуктивных органов животных I группы после отела.

Таблица 32 - Влияние длительности сервис-периода на эффективность гормональной обработки

Показатели	Продолжительность сервис периода, дн.		
	до 60	60-90	более 90
Обработано животных, гол.	30	67	58
Реагировало полиовуляцией, гол.	26	62	52
Процент от числа обработанных	86,7	92,5	89,6
Среднее число овуляций на донора, n	11,2±1,7	12,3±0,97	11,9±1,0
Получено эмбрионов всего, n	191	502	364
Среднее число извлеченных эмбрионов и яйцеклеток на донора, n	8,7±1,23	9,3±1,1	8,1±0,93
в т.ч. пригодных к пересадке, n	3,2±1,0	6,3±1,18*	5,4±1,38
дегенерированных и отставших в развитии, n	3,6±1,12	2,7±0,25	1,8±1,03
яйцеклеток, n	1,9±1,0	0,3±0,25	0,9±0,48
Уровень оплодотворяемости, %	78,2	96,8	88,9

3.4. Результативность полиовуляции в зависимости от сезона года

В результате многочисленных исследований во всем мире установлена зависимость индекса множественной овуляции от

сезонного фактора при обработке экзогенными гонадотропинами /90/. Этот показатель во многом зависит от климатических условий и может иметь значительную вариабельность в различных регионах. В условиях Канады относительно высокое число овуляции на одного донора наблюдается с января по март (10,2) и наименьшее в июле – сентябре (8,4). В Московской области (Нечерноземная зона) наиболее активная реакция коров на гонадотропины отмечается в осенний период.

Влияние сезона года наблюдали в работах, выполняемых в Южной Америке и Северной Америке. Однако в других исследованиях этого не обнаружили. Такая разноречивость не всегда может быть понятна в плане характеристики особенностей сезона, определяемых комплексом кормовых и внешних факторов. У необработанных животных в Финляндии обнаружено больше полостных фолликулов в яичниках зимой и весной, чем летом и осенью. Это, скорее всего и отражает колебания сезонной суперовуляторной реакции. Можно ожидать, что, кроме кормления и сезона года, физиологическое состояние донора (сухостой или лактация) тоже будет влиять на суперовуляторную реакцию, хотя сравнительные данные по этому вопросу в литературе отсутствуют.

Анализ экспериментальных данных, полученных нами в условиях Брестской области также показал заметные отличия основных показателей эффективности индукции суперовуляции по сезонам года.

При гормональной обработке коров-доноров весной и зимой процент реагирующих суперовуляцией животных был выше, чем летом и осенью: соответственно 81,8 и 82,1% по сравнению с 67,4 и 72,1% (табл. 35). В то же время среднее число овуляций было высоким во все периоды года, но несколько выше в весенне-летний период и составляло 11,3 и 11,2 на каждого обработанного донора (осенью и зимой 10,9 и 10,7, соответственно).

Наибольшее число нормальных эмбрионов получено весной и летом – 5,5 и 5,7 в среднем на донора по сравнению с осенью и зимой – соответственно 4,6 и 4,5.

В осенне-зимний период заметно возрастало число дегенерированных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток. По отношению к общему числу полученных зародышей количество дегенерированных эмбрионов и яйцеклеток осенью составило 22,9 и 24,1%, зимой 13,3 и 26,7% соответственно против 10,1 и 10,1% весной 17,9 и 17,9% летом. Отмечается снижение оплодотворяемости яйцеклеток по сезонам года от весны к зиме: соответственно 89,8; 82,0; 75,9 и 73,3%. Повышенное число яйцеклеток и дегенерированных эмбрионов в летний период связано, вероятно, с температурным фактором, оказывающим прямое воздействие на активность половой функции у коров. Несмотря на это при высоком уровне полиовуляции и общем выходе зародышей и яйцеклеток, количество нормальных эмбрионов летом остается наибольшим.

Таблица 33 - Влияние сезона года на результаты полиовуляции у коров-доноров

Показатели	Сезон года			
	весна	лето	осень	зима
Обработано животных	33	46	43	28
Реагировало полиовуляцией	27	31	31	23
Процент от числа обработанных	81,8	67,4	72,1	82,1
Среднее число овуляций	11,3	11,2	10,9	10,7
Получено в среднем на донора эмбрионов и яйцеклеток	6,9	8,9	8,7	7,5
в т.ч. нормальных (n - %)	5,5-79,7	5,7-64,0	4,6-52,9	4,5-60,0
дегенерированных (n - %)	0,7-10,1	1,6-17,9	2,0-22,9	1,0-13,3
яйцеклеток (n - %)	0,7-10,1	1,6-17,9	2,1-24,1	2,0-26,7
Оплодотворяемость, %	90,1	82,3	75,8	73,4

Сравнительный анализ данных подтверждает хорошо известный в практике животноводства факт резкой активизации половой функции у коров в весенний и первый летний месяцы, чему способствует удлинение светового дня и потепление. Эта зависимость у животных может меняться с изменением условий содержания и кормления. Однако изменения, происходящие в половой системе самок, не проявляются под воздействием одного или нескольких факторов, а являются следствием взаимодействия комплекса субъективных причин.

ГЛАВА 4. ИЗВЛЕЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ

4.1. Эффективность нехирургических методов вымывания эмбрионов

4.1.1. Влияние катетера на эффективность извлечения эмбрионов

Извлечение эмбрионов – одна из важнейших составных частей общей технологии трансплантации эмбрионов, требующая хороших навыков и тщательного подхода к выполнению данной процедуры. Если на начальных этапах развития данного метода эмбрионы извлекались или после убоя животного или путем хирургической операции, то с разработкой инструментов получение эмбрионов начали осуществлять трансцервикальным методом с помощью различных катетеров.

Первые сообщения об успешном применении нехирургического метода извлечения эмбрионов у коров-доноров относятся к 1949 г. Вначале результаты по сравнению с хирургическим методом были значительно хуже. В последующем для этой цели были усовершенствованы старые и разработаны новые инструменты.

Был сконструирован жесткий металлический катетер из нержавеющей стали с внешним диаметром 4 мм и внутренним диаметром 2 мм, длиной 50 см, с надувным баллончиком на конце катетера. Такая конструкция катетера обеспечивала 100% прохождение канала шейки матки у коров, а также у крупных

телок. Процент извлечения зародышей от числа овуляций составил 56,4, или в среднем по 6,5 эмбриона на каждого донора.

Биотехнический метод бескровного получения эмбрионов должен быть простым и надежным, позволяющим с высоким результатом получать эмбрионы в условиях ферм. Был предложен каучуковый 2-канальный катетер длиной 52 см с отверстиями для введения и вывода жидкости. Катетер имеет металлический наконечник с четырьмя отверстиями и шаровидным окончанием, что обеспечивает более легкое прохождение канала шейки матки и уменьшает травмирование её слизистой. Для придания жесткости в полость катетера вставляют металлический упругий стилет. Такая конструкция прибора дает возможность получать до 7 эмбрионов на донора с хорошей суперовуляцией, или 63% от числа овуляций.

По мнению большинства исследователей и практиков, наиболее удобны резиновые катетеры. Они дают возможность получать от 4 до 6 эмбрионов, пригодных к пересадке. Однако такие катетеры иногда трудно проходят через цервикальный канал. Даже после прохождения шейки матки встречаются затруднения в проведении его глубоко в рог матки и контроле состояния баллончика. Тем не менее, у резиновых катетеров имеются определенные преимущества по сравнению с жесткими металлическими. При их использовании снижается вероятность повреждения эндометрия. Жесткий катетер сравнительно легко проникает в канал шейки матки, но и может повредить эндометрий. При этом в промывную среду попадает кровь, что затрудняет поиск эмбрионов.

В 1980 г. был модифицирован металлический жесткий катетер, который стал представлять из себя трубку из нержавеющей стали и съемного гибкого наконечника из пластика с несколькими отверстиями. Жесткая трубка имеет два пуповчатых утолщения для фиксации трубки в канале шейки матки. Для придания жесткости съемному пластиковому наконечнику вовнутрь трубки вводят упругий стальной стилет.

Такая конструкция катетера обеспечивает удаление введенной среды из рогов матки на 93...96%, а извлечение

эмбрионов – на 56,6% от числа овуляций и получение в среднем 6,2 зародыша на донора. Недостаток катетера – отсутствие надувного баллончика, предотвращающего вытекание промывной среды через канал шейки матки. Поэтому оператору приходится постоянно пережимать рукой основание рога матки во время промывания. а это не всегда удается, особенно у коров с высокой ригидностью ректального канала.

Наиболее подходящий по конструкции оказался прибор, состоящий из металлического цилиндра диаметром 5 мм и длиной 49,5 см. Вовнутрь цилиндра с помощью специального крючка проводят катетер Фоллея, в конце которого сделано 2 отверстия. В верхушку катетера вставляют открытую металлическую упругую спираль диаметром 2,5 мм и длиной 5,5...6 см. К наружному концу катетера Фоллея прикрепляют три конца пластиковых трубок с двумя двухходовыми краниками для регулирования введения и оттока промывной жидкости. Для придания верхушке катетера упругости вставляют жесткий металлический стилет. Упругая спираль предохраняет от проникновения стилета через боковые отверстия верхушки катетера и стабилизирует рабочую часть верхушки после удаления стилета. Общая длина прибора – 60 см.

После расположения катетера в роге матки стилет удаляют и в баллон нагнетают воздух, к катетеру присоединяют систему шлангов с двумя 60-миллиметровыми шприцами. Один из них предназначен для нагнетания, второй – для отсасывания промывной жидкости.

Сбор промывной жидкости с помощью этого прибора составляет 92%, извлечение эмбрионов и яйцеклеток – до 69% от общего числа овуляций. Лучшие результаты получены при извлечении эмбрионов на 8-й день с начала охоты (76%) и несколько хуже – на 6-й и 10-й день (54 и 43% соответственно). В среднем этим прибором извлекают по 6,3 эмбриона на донора с вариациями от 0 до 29. Такая вариабельность связана, прежде всего, с навыком оператора и днем извлечения эмбрионов после первого осеменения. Так, на 6-й день извлекают 54% эмбрионов,

на 7-й – 74, на 8-й – 76 и на 10-й – 43% от общего числа овуляций. Нагнетание и удаление промывной жидкости с помощью шприца облегчают процедуру промывания. Фракционное промывание рогов матки обеспечивает извлечение около 69% эмбрионов от числа овуляций. Процедуру фракционного промывания рогов матки повторяют до 10...15 раз. Процент извлечения после первых пяти вымываний составляет 57, после восьми – 62. Выяснено, что уровень извлечения эмбрионов не зависит от числа предыдущих вымываний.

Основная масса зародышей находится в первых трех фракциях промывной среды, но это при условии четкого выполнения всей процедуры промывания рогов матки. Даже при малых затруднениях возникает необходимость повторять процедуру.

В настоящее время для вымывания эмбрионов из рогов матки широко используют 2-канальные катетеры из резины или эластичной полихлорвиниловой пластмассы.

Эффективность некоторых из них мы и попытались определить в своих исследованиях (табл. 36).

Как видно из таблицы достоверной разницы в эффективности использования катетеров Нойштадт (Германия), Кассу (Франция) и конструкции ВИЖ не установлено. Хотя при использовании последнего и наблюдается некоторое снижение количества эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток 77,7% против 85,5 и 87,7% при использовании катетеров Кассу и Нойштадт соответственно. Данное заключение подтверждает и повторное промывание рогов матки. Процент извлеченных эмбрионов в этом случае колебался от 2,3% при использовании катетера конструкции ВИЖ до 3,6% при использовании катетера Кассу. При этом необходимо отметить, что эта разница недостоверна. То же самое можно сказать и о потерях промывной жидкости.

Эффективность извлечения эмбрионов в зависимости от количества промывной жидкости показана в таблице 34.

Таблица 34 - Эффективность использования различных катетеров при нехирургическом извлечении эмбрионов

Показатели	Конструкция катетера		
	Нойштадт	Кассу	ВИЖ
Количество извлечений	59	27	31
Число овуляций	478	261	283
Получено эмбрионов и н/яйцеклеток от числа овуляций, n-%	419-87,7	222-85,1	220-77,7
Количество животных, в рога которых поступила среда	59	27	31
Количество животных, у которых получена среда из рогов, n-%	53-89,8	24-88,9	28-90,3
Получено эмбрионов при повторном промывании рогов (% от числа извлеченных)	10-2,4	8-3,6	5-2,3

4.1.2. Влияние количества промывной среды на выход эмбрионов

В наших исследованиях расход среды Дюльбекко составлял 500 и 250 мл на один рог. Как видно из полученных данных (табл. 35) снижение в 2 раза поступающей в рог жидкости не отразилось на количестве извлеченных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток. Повторное промывание рогов в количестве 500 мл на каждый рог приведенных показателей практически не изменило. В связи с чем, можно сделать вывод о том, что экономически целесообразно снижение количества промывной жидкости. Эффективность извлечения остается на прежнем уровне, а снижение затрат за счет экономии среды Дюльбекко очевидно.

Таблица 35 - Влияние количества промывной среды на выход эмбрионов

Показатели	Количество промывной жидкости на 1 рог					
	250 мл			500 мл		
	Нойштадт	Кассу	ВИЖ	Нойштадт	Кассу	ВИЖ
Количество извлечений	44	21	19	59	27	31
Число овуляций	361	168	170	478	261	283
Получено эмбрионов и н/о яйцеклеток от числа овуляций, n - %	322-89,2	146-86,9	133-78,2	419-87,7	222-85,0	220-77,7
Потери промывной среды, %	7,9	8,1	7,4	10,2	11,1	9,7
Получено эмбрионов при повторном промывании (% от числа извлеченных)	1,5	1,8	2,1	2,4	3,6	2,3

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ ОВУЛЯЦИИ И НЕХИРУРГИЧЕСКОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА КОРОВ-ДОНОРОВ И ТЕЛОК-РЕЦИПИЕНТОВ

В решении экономических проблем трансплантации эмбрионов особое значение имеет научная проработка вопросов влияния индукции множественной овуляции, образования множественных желтых тел, извлечения эмбрионов и последующей регрессии лютеиновой ткани на механизм образования молока. Среди специалистов существует мнение, что суперовуляция, которая в большей или меньшей степени нарушает гормональное равновесие организма, отрицательно влияет на молочную продуктивность. Данная проблема до сих пор недостаточно изучена и в литературе нет единого мнения.

Исследования по изучению динамики среднесуточного надоя в течение гормональной обработки (ФСГ-П в дозе 40 мг в сочетании с аналогом простагландина), извлечения эмбрионов и регрессии лютеиновой ткани проведены на коровах-донорах

(опыт 1), а также на коровах-донорах и их аналогах по продуктивности, возрасту и стадии полового цикла (опыт 2).

Контрольные удои проведены по схеме: за день до обработки и извлечения эмбрионов, в день извлечения, а также первый, седьмой и четырнадцатый дни после извлечения эмбрионов (табл. 36).

В результате анализа динамики среднесуточного надоя у коров-доноров в период гормональной обработки извлечения эмбрионов и в течение 14 дней после извлечения, установлено, что гормональная обработка лактирующих коров не оказывает существенного влияния на молочную продуктивность, Среднесуточный надой снижается в день извлечения эмбрионов на 9,2% и восстанавливается, как правило, к десятому-четырнадцатому дню.

В то же время следует отметить индивидуальность реакции коров-доноров. Так, у 16,4% доноров не отмечено снижения молочной продуктивности, 67,7% - восстанавливали продуктивность к 10-14 дню, 6,4% повысили продуктивность и 9,5% продуктивность не восстановили. Изучение динамики среднесуточных надоев у коров-доноров и их аналогов также не выявило заметного влияния гормональной обработки на молочную продуктивность.

Таблица 36 - Молочная продуктивность коров-доноров в связи с суперовуляцией

Дни проведения контрольных доек	Среднесуточный надой (кг)		
	Опыт 1	Опыт 2	
	Доноры	Контроль	Доноры (опыт)
За день до обработки	18,2 ± 1,05	17,55 ± 2,10	18,96 ± 2,13
За день до извлечения	16,81 ± 1,09	17,36 ± 2,58	17,70 ± 2,14
В день извлечения	16,85 ± 1,22	17,8 ± 2,45	17,0 ± 2,14
После извлечения			
Первый день	16,70 ± 1,20	17,25 ± 2,40	16,10 ± 2,30
Седьмой день	16,27 ± 0,96	16,85 ± 2,12	17,23 ± 1,78
Десятый день	16,81 ± 1,23	16,55 ± 1,94	18,35 ± 2,10
Четырнадцатый день	17,89 ± 1,02	16,65 ± 2,10	18,10 ± 1,96

Для изучения качественного состава молока в процессе вызывания множественной овуляции и нехирургического извлечения эмбрионов было сформировано две группы коров-аналогов по возрасту, продуктивности, стадии полового цикла. Опытная группа (коровы-доноры, $n=9$) обрабатывались ФСГ в дозе 40 мг в сочетании с простагландинами. Животные контрольной группы ($n=9$) гормональной обработке не подвергались. Пробы молока отбирали у опытных животных за день до обработки и весь период обработки, день после обработки, день извлечения и день после извлечения.

Таблица 37 - Влияние гормональной обработки и нехирургического извлечения эмбрионов на качественный состав молока

Содержание (%)		Учет молочной продуктивности							
		Задень до обработки	Дни обработки ФСГ-П				День после обработки	День извлечения эмбрионов	День после извлечения
			1	2	3	4			
Жир	Опыт	3,68 ± 0,09	3,61 ± 0,14	3,73 ± 0,14	3,85 ± 0,22	3,81 ± 0,15	3,45 ± 0,10	3,55 ± 0,28	3,92 ± 0,20
	Контроль	3,95 ± 0,52	3,50 ± 0,58	3,55 ± 0,55	3,45 ± 0,36	3,50 ± 0,21	3,55 ± 0,34	2,8 ± 0,38	3,6 ± 0,39
Белок	Опыт	3,34 ± 0,05	3,36 ± 0,04	3,35 ± 0,05	3,41 ± 0,03	3,36 ± 0,04	3,28 ± 0,03	3,37 ± 0,06	3,45 ± 0,08
	Контроль	3,41 ± 0,08	3,25 ± 0,09	3,35 ± 0,11	3,39 ± 0,08	3,34 ± 0,10	3,3 ± 0,15	3,17 ± 0,12	3,39 ± 0,11
Сахара	Опыт	4,63 ± 0,22	4,58 ± 0,09	4,46 ± 0,12	4,39 ± 0,09	4,61 ± 0,07	4,49 ± 0,10	4,46 ± 0,08	4,48 ± 0,12
	Контроль	4,91 ± 0,4	4,74 ± 0,29	4,79 ± 0,17	4,63 ± 0,08	4,67 ± 0,15	4,78 ± 0,04	4,46 ± 0,08	4,49 ± 0,07
Ca	Опыт	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,007	0,14 ± 0,009	0,14 ± 0,005	0,14 ± 0,004	0,14 ± 0,006	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,04
	Контроль	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,007	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01
P	Опыт	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,005	0,08 ± 0,004	0,08 ± 0,004	0,08 ± 0,005	0,08 ± 0,005	0,10 ± 0,009	0,09 ± 0,08
	Контроль	0,07 ± 0,005	0,07 ± 0,001	0,07 ± 0,005	0,07 ± 0,004	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,007	0,1 ± 0,004	0,08 ± 0,0

Соответственно в эти же дни отбирали пробы молока и у коров контрольной группы. Анализ молока проводили по пяти показателям: содержанию жира белка, сахара, кальция и фосфора (табл. 37). По результатам исследований существенных различий не установлено.

Анализ влияния гормональной обработки и извлечения эмбрионов на некоторые репродуктивные показатели доноров показал, что из 69 высокопродуктивных лактирующих коров, используемых в качестве доноров (табл. 38) в первую охоту осеменилось 34 головы или 49,3%, во вторую - 25 голов или 36,2%, в третью - 4 головы и в четвертую - 6 голов или 8,7%. Оплодотворяемость доноров практически не отличалась от оплодотворяемости животных контрольной группы, которые не подвергались гормональным обработкам. Сервис-период в опытной группе составил 123,5 дня, что на 45,8 дня больше чем в контрольной группе.

Таблица 38 - Воспроизводительные функции коров-доноров в связи с гормональной обработкой

Показатели	Коровы	
	Опыт	Контроль
Использовано животных, гол.	69	69
Из них оплодотворилось, гол./%:		
в 1 -ю охоту	34 / 49,3	37/53,6
во 2-ю охоту	25 / 36,3	17/24,6
в 3-ю охоту	4/5,8	8/11,6
в 4-ю и более охоту	6/8,7	7/10,1
Период от извлечения эмбрионов до наступления первой охоты (дн.)	37,8 ±3,6	-
Период от извлечения эмбрионов до оплодотворения (дн.)	63,5 ±5,17	-
Сервис период (дн.)	123,5 ±3,17	77,7 ±3,58

Среднее число дней от извлечения эмбрионов до наступления первой охоты составило 37,8 и до плодотворного осеменения - 63,5 дня.

Как видно из приведенного материала, гормональная обработка не оказывает существенного влияния на дальнейшие воспроизводительные функции коров-доноров. Это же можно сказать и о телках-реципиентах, у которых не прижился эмбрион после пересадки. Данные нашего опыта показали (табл. 39), что после неудачной хирургической пересадки 87,4% телок осеменяются в 1-ю охоту и 12,6 - во вторую, что вполне согласуется с результатами осеменения телок контрольной группы.

Таблица 39 - Воспроизводительные функции телок-реципиентов в случае неудачной пересадки эмбрионов

Показатели	Опыт	Контроль
Осеменено реципиентов, гол.	95	95
В т.ч. в 1-ю охоту, гол. /%	83/87,4	79/83,2
В 2-ю охоту, гол. / %	12 / 12,6	12 / 12,6
В 3-ю охоту, гол. / %	-	4 / 4,2

Таким образом, вопрос вызывания множественной овуляции является одним из наиболее сложных технологических звеньев биотехнологии трансплантации эмбрионов, подверженных влиянию различных факторов, которые необходимо учитывать при работе с донорами. В свою очередь гормональная обработка способна вызывать изменения в организме животного, приводящие к изменению гормонального фона, уровня молочной продуктивности и некоторых других функций. Но в целом жизнедеятельность и функционирование организма животного, подвергающегося гормональной обработке и нехирургическому извлечению эмбрионов, остаются в норме. Коровы-доноры после их разового использования без каких-либо последствий для своего здоровья возвращаются в основное стадо и продолжают нормально функционировать.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

6.1. Биологические основы получения качественных эмбрионов

6.1.1. Фолликулогенез

Фолликул яичника (лат. *folliculus ovaricus*) - структурный компонент яичника, состоящий из яйцеклетки, окружённой слоем эпителиальных клеток и двумя слоями соединительной ткани.

В соответствии со стадией развития различают четыре типа присутствующих в яичнике фолликулов: примордиальные, первичные, вторичные и антральные. Антральные фолликулы в свою очередь подразделяются на растущие и доминантные, или преовуляторные (рис. 1).

Примордиальные - самые незрелые и самые маленькие (диаметр около 50 мкм) из фолликулов, присутствующих в корковом слое яичника. Они закладываются в яичниках еще до рождения. Ооциты, находящиеся внутри такого фолликула окружены одним слоем чешуйчатых клеток. Образуются они в процессе митотической пролиферации первичных зародышевых клеток – оогоний. Количество таких фолликулов в яичнике составляет 1-2 миллиона. Далее оогонии проходят Профазу I мейотического деления и становятся первичными ооцитами. Часть из этих ооцитов окружается монослоем кубических эпителиальных клеток, и образуется зародышевый или первичный фолликул. Остальные дегенерируют.

На этом этапе развитие фолликулов приостанавливается вплоть до рождения. К этому времени в яичнике остается примерно 300 тыс. фолликулов. При наступлении половой зрелости гипофиз начинает вырабатывать ФСГ и к созреванию стимулируется от 5 до 15 первичных фолликулов, которые переходят на следующую стадию своего развития, стадию вторичного, или преантрального фолликула, размер которого достигает 150-200 мкм.

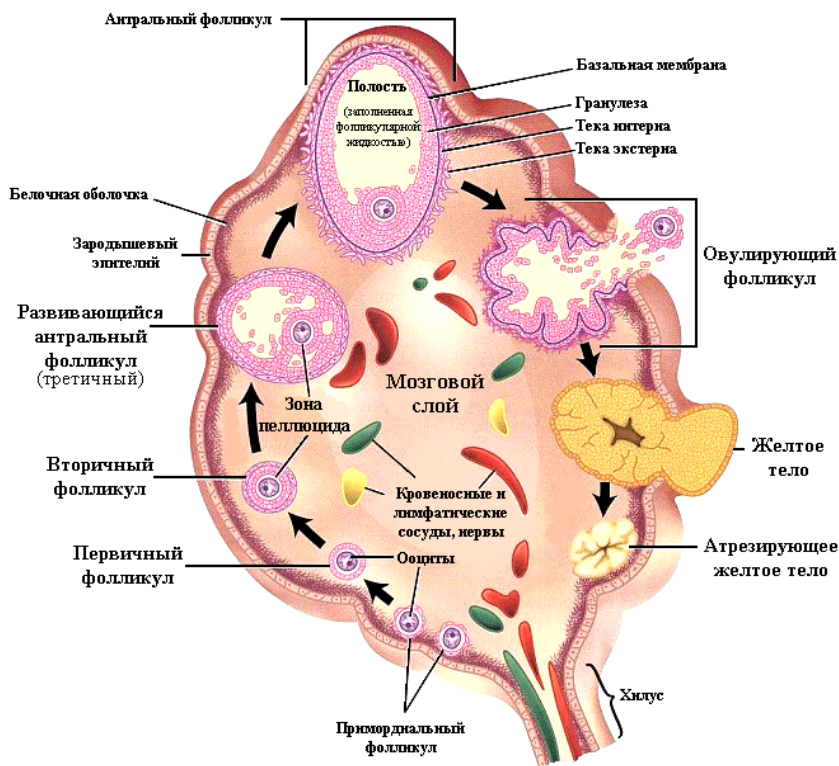


Рисунок 1 - Схема фолликулогенеза

Начинает расти ооцит. Его внешняя поверхность покрывается гликопротеином и гликозаминогликанами, формирующими относительно толстую, полупрозрачную оболочку, называемую зоной пеллюцида. Теперь ооцит покрыт 2-4 слоями фолликулярных клеток. По мере дальнейшего развития вокруг ооцита формируется полость и заполняется

фолликулярной жидкостью. Такой фолликул называется растущим антральным, или полостным фолликулом. Иногда такой фолликул называется третичным. В этот период такие фолликулы можно различить на поверхности яичника невооруженным глазом. Их размер колеблется от менее чем 1 мм до 1,5-2 см.

В антральном фолликуле формируются три различных слоя эпителиальных клеток: наружный слой (*theca externa*), внутренний слой (*theca interna*) и слой клеток гранулезы. Тека экстерна состоит из свободной соединительной ткани, которая плотно окружает и поддерживает фолликул. Тека интерна отвечает за секрецию андрогенов, которые в дальнейшем являются предшественниками биосинтеза эстрогенов в гранулезных клетках фолликула. Слой гранулезных клеток отделен от теки интерны тонкой базальной мембраной. Клетки гранулезы вырабатывают целый ряд веществ и имеют рецепторы к фолликулостимулирующему гормону (ФСГ). Наиболее важными компонентами, секретируемыми этими клетками являются эстрогены, ингибины и фолликулярная жидкость. Кроме этого предполагается, что гранулеза регулирует созревание ооцита. Таким образом, третичный фолликул становится органом эндокринной системы.

Дальнейший рост антрального фолликула приводит к образованию доминантного или предовуляторного фолликула. Большую часть его часть занимает полость. Количество фолликулярной жидкости в 100 раз больше чем в антральном растущем фолликуле. Примерно за 24 часа до овуляции клетки теки интерны начинают вырабатывать большое количество эстрогенов. Повышение содержания эстрогенов стимулирует выброс ЛГ, который инициирует овуляцию. В стенке фолликула образуется выпячивание (стигма), которое разрывается и яйцеклетка выходит из фолликула. Если по каким-то причинам овуляция не произошла фолликул превращается в кисту. После овуляции на месте фолликула образуется желтое тело, вырабатывающее прогестерон, который при наступлении оплодотворения и имплантации зиготы на стадии бластоцисты

поддерживает беременность. При отсутствии имплантации в эндометрии вырабатывается простагландин, который вызывает лизис желтого тела и снижение уровня прогестерона в крови. При этом уровень эстрогенов увеличивается и таким образом начинается период нового фолликулярного роста. В течение полового цикла насчитывается три волны роста фолликулов (рис 2): одна в метэструсе, одна в диэструсе, и одна в проэструсе. Однако овуляция доминантного фолликула наступает только в проэструсе. Дело в том, что на фоне повышения уровня прогестерона (метэструс) и в фазе наибольшей его концентрации (диэструс) развитие доминантного фолликула блокируется и он атрезирует, в отличие от проэструса, когда уровень эстрогенов резко увеличивается, а прогестерона падает, и создаются все условия для овуляции. Но, необходимо иметь ввиду, что при инъекции простагландина доминантные фолликулы могут овулировать. В течение каждой волны фолликулярного роста фолликулы проходят четыре фазы своего развития: пополнения, отбора, доминации и атрезии. Фаза пополнения - это фаза, когда группа маленьких ооцитов начинает свой рост и продуцирует эстрадиол.

Однако, в последствии часть из них атрезирует, а та часть, которая продолжит свой рост, является отселекционированной. Но опять-таки часть из этих фолликулов также подвергнется атрезии, а оставшаяся часть перейдет в фазу доминации. В этой фазе у крупного рогатого скота будет отобран только один доминантный фолликул, который при благоприятных условиях овулирует, а остальные подвергнутся атрезии.

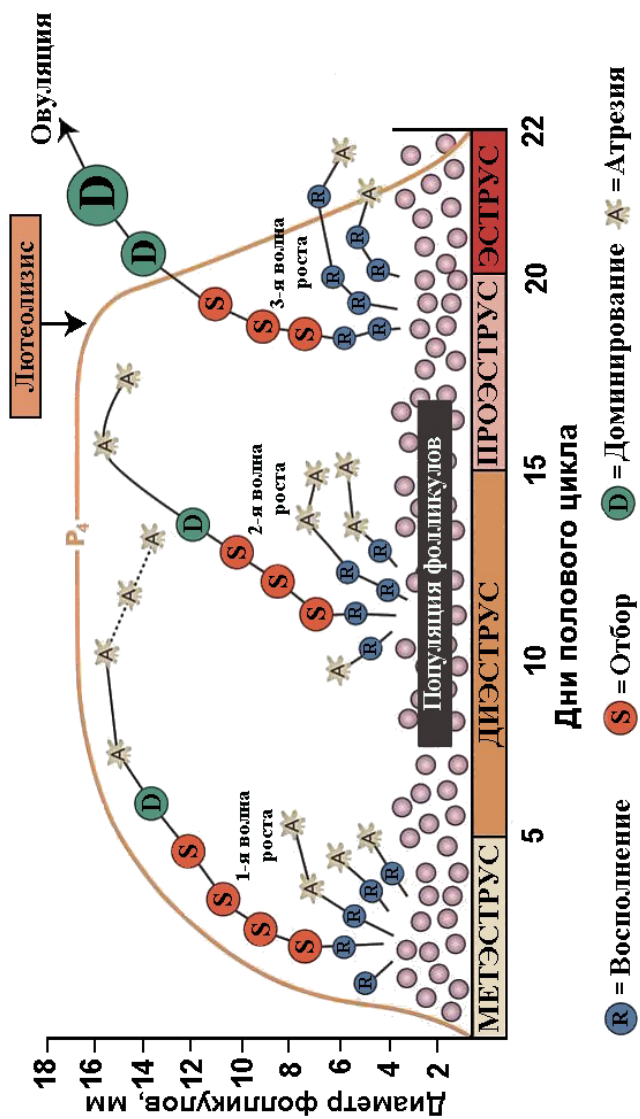


Рисунок 2 - Волны фолликулярного роста

6.1.2. Оогенез

Яйцеклетки образуются в женской половой железе – яичнике. Они проходят долгий путь развития, который начинается в эмбриональном и продолжается в репродуктивном периоде онтогенеза (рис. 3).

Первичные половые клетки возникают на ранних этапах эмбриогенеза из энтодермальных клеток желточного мешка. От других клеток они отличаются крупными размерами и прозрачной цитоплазмой. Доказано, что первичные половые клетки мигрируют из места возникновения к зачаткам гонад. Попадая в гонады, они начинают пролиферировать, делятся митотически и превращаются в оогонии. После этого наступает стадия размножения и роста. В результате этого процесса оогонии становятся ооцитами первого порядка.

После инициации мейоза в ооцитах начинаются ранние стадии профазы I (от лептотены до диплотены), затем мейоз блокируется, и ооциты на стадии диплотены переходят в состояние относительного покоя – дикиотены, во время которой размеры ооцитов не увеличиваются. Ооциты остаются в дикиотене до овуляции доминирующего фолликула.

Как правило, у большинства млекопитающих созревание ооцитов происходит в конце фолликулярной фазы эстрального цикла, когда в организме доминируют эстрогены. Основное действие эстрогенов связано со стимуляцией пролиферативных процессов в клетках гранулёзы. Кроме того, индуцируется образование в клетках гранулёзы рецепторов к ФСГ и увеличивается количество щелевых контактов между клетками гранулёзы фолликула. Эстрогены увеличивают скорость их цитодифференцировки, а после пролиферации этих клеток индуцируют образование в них рецепторов к ЛГ.

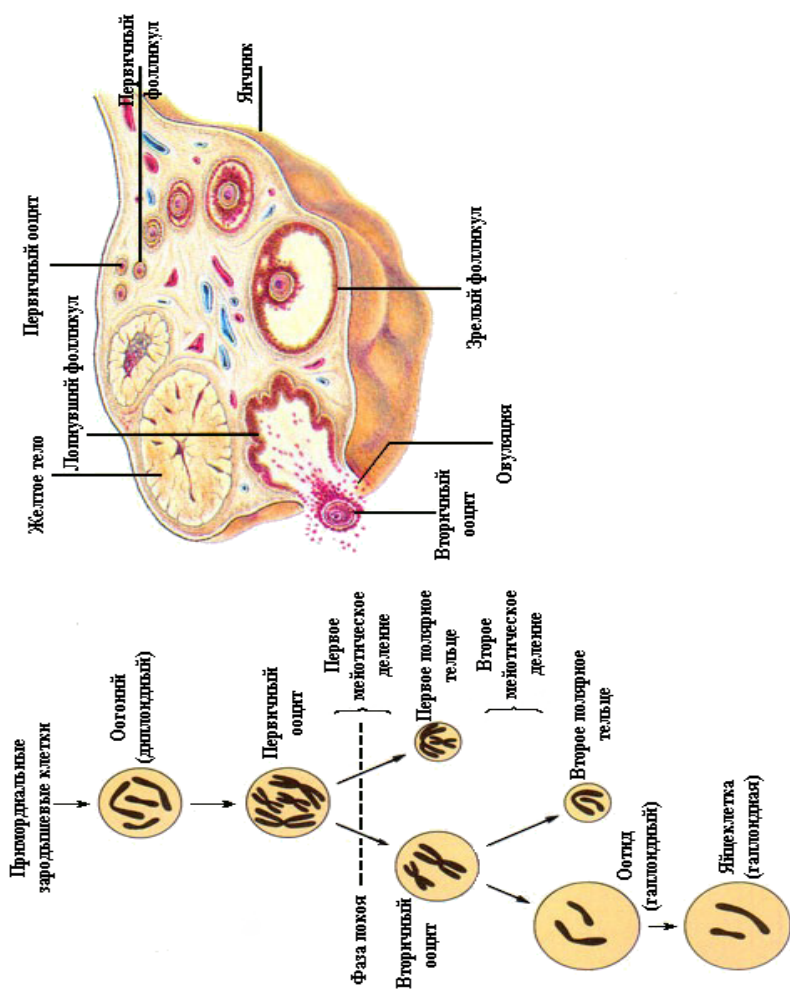


Рисунок 3 - Схема оогенеза

Незадолго до овуляции происходит кратковременный, но резкий подъем уровня ЛГ, а также некоторое увеличение уровня ФСГ. Возможно, этот пик выделения в кровь ЛГ и является тем стимулом, который снимает блокаду мейоза. Таким образом, созревание ооцита представляет собой комплексную, точно определенную смену структурно-морфологических, физиометаболических и биохимических процессов, как в ядре и цитоплазме, так и в самой фолликуле, охватывающем ооцит. Только физиологическое созревание ядра, цитоплазмы и фолликула в состоянии обеспечить ооциту способность к нормальному оплодотворению и эмбриональному развитию.

Первым морфологическим признаком созревания ядра является разрушение зародышевого пузырька. Одновременно с этим конденсируется хроматин и образуются хорошо видимые в микроскоп хромосомы (стадия диакинеза). После дальнейшего сжатия хромосом образуются нити веретена деления, и хромосомы попарно подтягиваются в середину веретена (стадия метафазы). Мейотическое веретено передвигается к периферии ооцита, и парные гомологические хромосомы расходятся (стадия телофазы). Происходит образование и деление первого полярного тельца (стадия телофазы), которым и заканчивается 1-ое мейотическое деление.

Второе мейотическое деление созревания ооцитов продолжается до стадии метафазы. Хромосомы в ооцитах располагаются в метафазных пластинках и остаются так до оплодотворения ооцитов 2 порядка. Параллельно с созреванием ядра в ооцитах происходит созревание цитоплазмы.

Структурное созревание цитоплазмы находится в прямой зависимости от созревания ядра и образования веретена деления и рассматривается как признак метаболической активности ооцитов, изменения положения, структуры и числа клеточных органелл и включений, в том числе равномерного распределения митохондрий, увеличения и периферийного расположения кортикальных гранул.

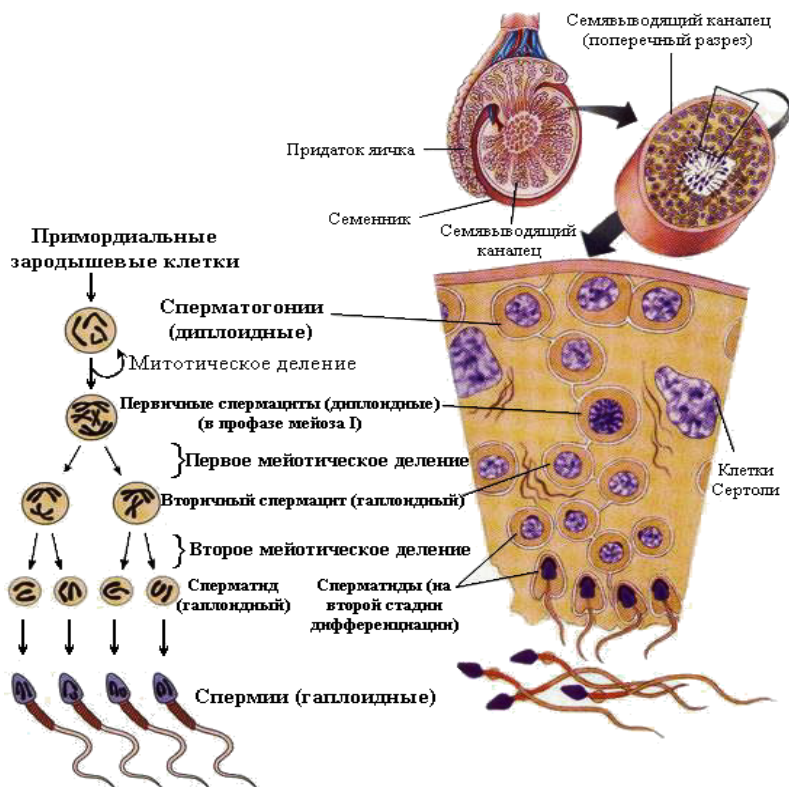
Известно, что в процессе морфологического изменения цитоплазмы происходит ряд качественных изменений

протеиновой модели, которая находится в тесной связи с физиологическим созреванием ооцита. Синтез новых белков в цитоплазме ооцитов имеет определенное влияние на их оплодотворяемость, дальнейшее развитие и зависит от соотношения цито- и нуклеоплазмы ко времени разрушения зародышевого пузырька, после чего в цитоплазме активируется матричная РНК. Рядом исследований установлено, что пока в ооцитах не разрушился зародышевый пузырек, протоплазма не способна трансформировать головку спермия в пронуклеус. Эта способность зависит от смешивания кариоплазмы зародышевого пузырька с цитоплазмой ооцита. По некоторым данным предполагается, что эта часть цитоплазматического созревания зависит от созревания ядра. По мнению других авторов, причиной недостаточного созревания цитоплазмы является недостаточное обеспечение ооцита стероидами через фолликулы. По мнению Leibfried M.L. и Bavister B.D., немаловажную роль в регуляции созревания цитоплазмы играет и протеин.

На стадии метафазы II развитие яйцеклеток блокируется, и завершение мейоза в них происходит только после оплодотворения или искусственной активации.

6.1.3. Сперматогенез

Каждый спермий содержит гаплоидное ядро, двигательную систему, обеспечивающую перемещение ядра, и набор ферментов, необходимых для проникновения спермия в яйцо (рисунок 4). Большая часть цитоплазмы спермия элиминируется при его созревании, и сохраняются только некоторые органеллы, видоизмененные для выполнения спермием своей функции).



Рисонок 4 - Схема сперматогенеза

В процессе формирования спермия центриоль дает начало длинному жгутику в той области, которая станет задним концом спермия. Митохондрии собираются около жгутика у основания гаплоидного ядра и входят в состав средней части спермия. Остальная цитоплазма сбрасывается, гаплоидное ядро приобретает обтекаемую (овальную) форму, а ДНК сильно уплотняется. В передней части головки спермия находится акросомный пузырек, произошедший от аппарата Гольджи и

содержащий гидролитические ферменты. Запас ферментов в акросомном пузырьке служит для проникновения спермия через наружные оболочки яйцеклетки (рисунок 5).

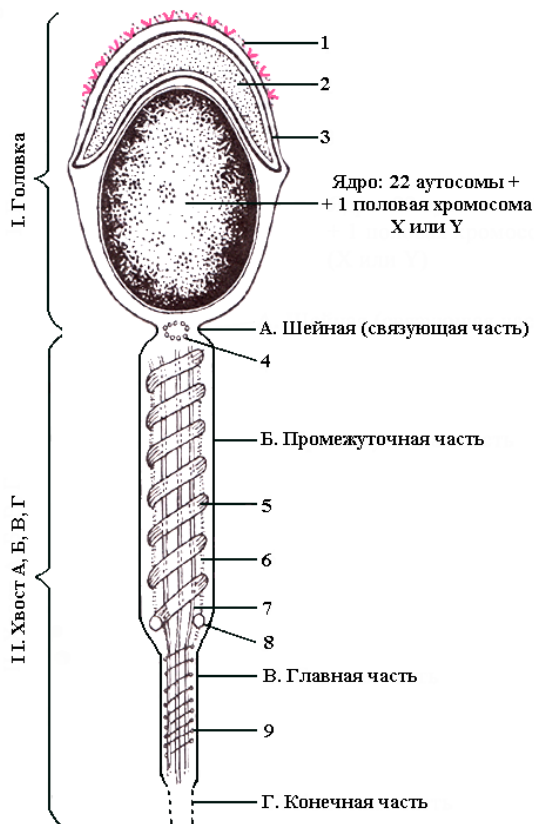


Рисунок 5 - Строение сперматозоида

I - головка; II - хвост; 1 - рецептор гликозилтрансфераза; 2 - акросомальная гранула; 3 - «чехлик»; 4 - проксимальная центриоль; 5 - митохондрия; 6 - слой упругих фибрилл; 7 - аксонема; 8 - дистальная центриоль; 9 - циркулярные фибриллы.

6.1.4. Оплодотворение

Процесс оплодотворения яйцеклетки происходит в ампулярной части яйцевода, куда доходит небольшое количество спермиев, хотя при эякуляции в половой тракт самки попадает до нескольких миллиардов спермиев. Период времени, в течение которого овулировавшие яйцеклетки способны оплодотвориться, различен у разных видов млекопитающих, но обычно не превышает 24 час. Примерно за это же время спермии утрачивают оплодотворяющую способность, находясь в половом тракте самки.

У млекопитающих оплодотворение внутреннее, поэтому половые пути самки принимают активное участие в этом процессе. После эякуляции, спермии, для приобретения способности к оплодотворению, должны пройти процесс капацитации. При этом у них происходят изменения структуры липидов клеточной мембраны, что выражается в изменении соотношения холестерина и фосфолипидов. Снижение содержания холестерина дестабилизирует мембрану акросомного пузырька, что является необходимым условием для слияния мембран.

Известно, что важнейшим признаком прошедшей капацитации является приобретение спермием способности узнавать прозрачную оболочку ооцита. В то время, как на поверхности спермия, не прошедшего капацитацию, присутствуют углеводы («coating factors»), которые препятствуют его прикреплению к яйцеклетке. Эти углеводы представляют собой полимер из повторяющихся остатков галактозы и N-ацетилглюкозамина. Они блокируют рецепторы спермия, в виде молекулы фермента N-ацетилглюкозамингалактозил-трансферазы (гликозилтрансферазы), опознающие зону пеллюцида. Молекулы гликозилтрансферазы встроены в плазматическую мембрану спермия непосредственно над акросомой, причем их активные центры обращены наружу. При капацитации

гликозилтрансфераза узнает N-ацетилглюкозаминовые остатки белков прозрачной оболочки.

При капацитации блокировавшие фермент углеводы убираются и молекулы гликозилтрансферазы, на поверхности спермия, обнажаются. В норме этот фермент катализирует присоединение активированных остатков галактозы к углеводной цепи, оканчивающейся N-ацетилглюкозамином. Однако в половых путях самки активированные остатки галактозы отсутствуют. Поэтому гликозилтрансфераза спермия просто присоединяется к N-ацетилглюкозаминовым остаткам белков прозрачной оболочки яйцеклетки. Таким образом, по типу ключ-замок прикрепляется спермий к ооциту.

Акрсомная реакция приводит к выделению ферментов, лизирующих связи между фолликулярными клетками, окружающими ооцит (рисунок 6.) Ферменты, выделенные из акросомного пузырька, называют лизинами. Они включают гиалуронидазу, расщепляющую гиалуроновую кислоту матрикса, и фермент, рассеивающий клетки лучистого венца. Кроме того, спермии содержат акрозин, разрушающий прозрачную оболочку в месте прикрепления.

Морфологическим выражением акросомной реакции является разрыв акросомного пузырька, который происходит в результате кальций-зависимого слияния наружной акросомной мембраны и прилежащей к ней плазматической мембраны спермия в передней половине головки. Во время акросомной реакции плазматическая мембрана, покрывающая постакросомальную область головки (ее экваториальный сегмент), приобретает свойства, делающие возможным слияние этой части плазматической мембраны спермия с плазматической мембраной яйцеклетки.

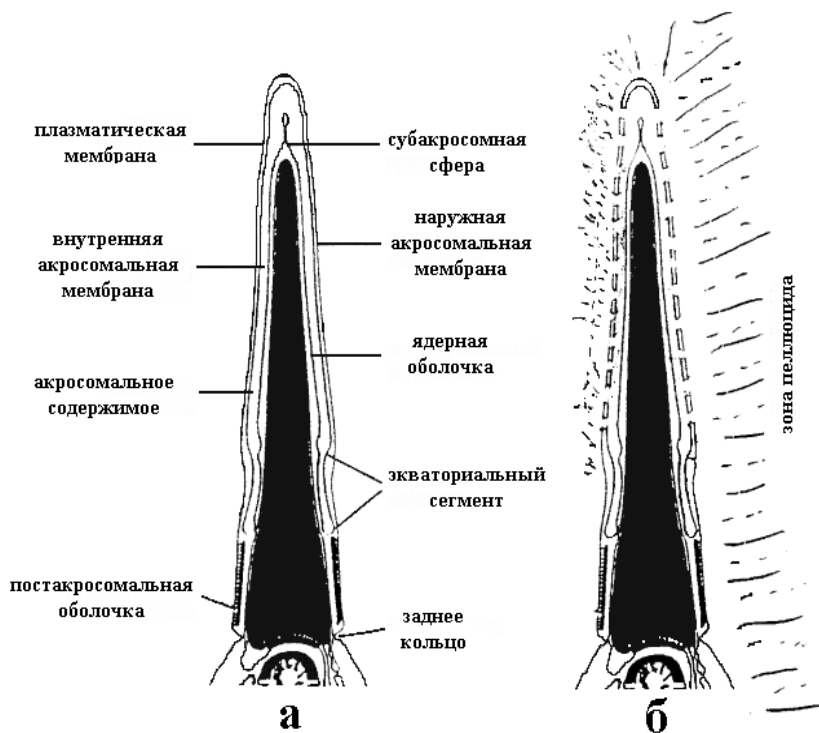


Рисунок 6 – Схематичное изображение акросомной реакции

а – интактный спермий

б – спермий в процессе слияния плазмы яйцеклетки и наружной акросомальной мембраны

Спермии быстро проходят через блестящую оболочку. Это прохождение осуществляется благодаря совместным действиям акрозина, связанного с внутренней акросомной мембраной, и активных движений хвоста спермия. Пройдя через блестящую оболочку спермий, попадает в перивителлиновое пространство. Если блок полиспермии функционирует на уровне блестящей оболочки, то в перивителлиновое пространство попадает один

спермий. Если полиспермия блокируется на уровне плазматической мембраны яйцеклетки, то в перивителлиновом пространстве можно найти много спермиев, хотя только один из них сольется с яйцеклеткой (рис. 7, 8).

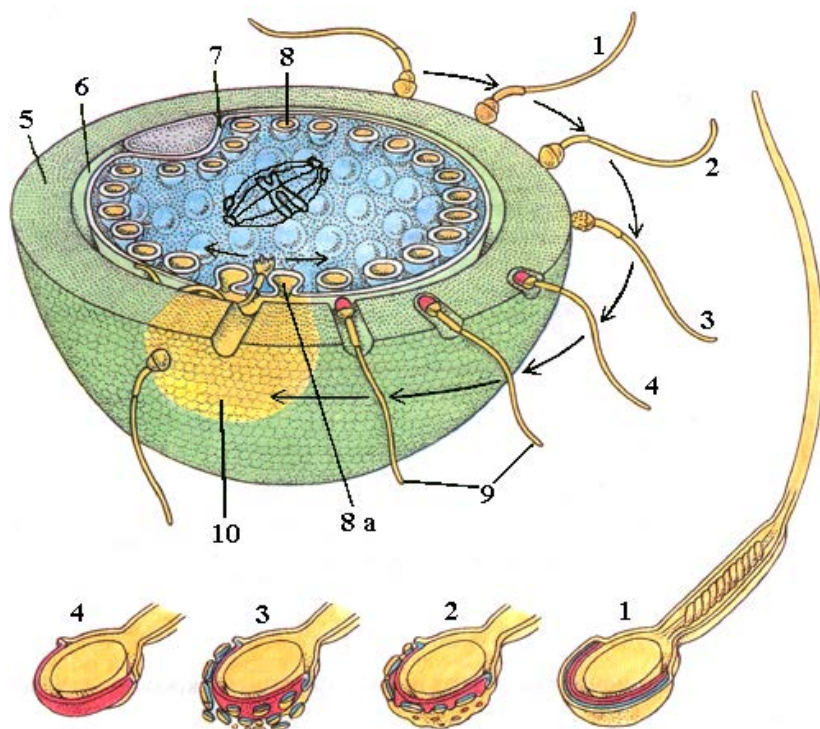


Рисунок 7 - Оплодотворение

1, 2, 3, 4 — стадии акросомной реакции; 5 — zona pellucida (блестящая зона); 6 — перивителлиновое пространство; 7 — плазматическая мембрана; 8 — кортикальная гранула; 8a — кортикальная реакция; 9 — входение спермия в яйцеклетку; 10 — зонная реакция.

Спермий сливается с плазматической мембраной яйцеклетки экваториальным постакросомальным районом головки. Процесс слияния происходит при взаимодействии этого специализированного района мембраны спермия и микроворсинок плазматической мембраны яйцеклетки и занимает несколько минут.

После проникновения в яйцеклетку головка спермия быстро теряет оболочки, и хроматин начинает деконденсироваться. Вследствие контакта деконденсирующегося хроматина спермия с цитоплазмой яйца происходят локальные изменения субкортикального слоя, в который попадает спермий /93/. Молекулы глобулярного актина полимеризуются, образуя скопление микрофиламентов. Плазматическая мембрана яйцеклетки выпячивается, образуя «бугорок» и теряя микроворсинки, появляется так называемый бугорок оплодотворения (рис. 8).

После того как зрелый сперматозоид пересек зону пеллюцида и ооцит был оплодотворен начинают меняться свойства зоны пеллюцида. Она становится герметичной для прохождения других сперматозоидов, это предотвращает полиспермию яйцеклетки, приводящую к летальным последствиям. Эта реакция зоны происходит под влиянием зоны веществ, которые располагаются в вителлусе в периферически расположенной кортикогрануле. Содержимое кортикогранулы, в момент оплодотворения, выделяется в перивителлиновое пространство. Только в очень редких случаях несколько сперматозоидов могут проникнуть в зону пеллюцида, и наступит полиспермия яйцеклетки.

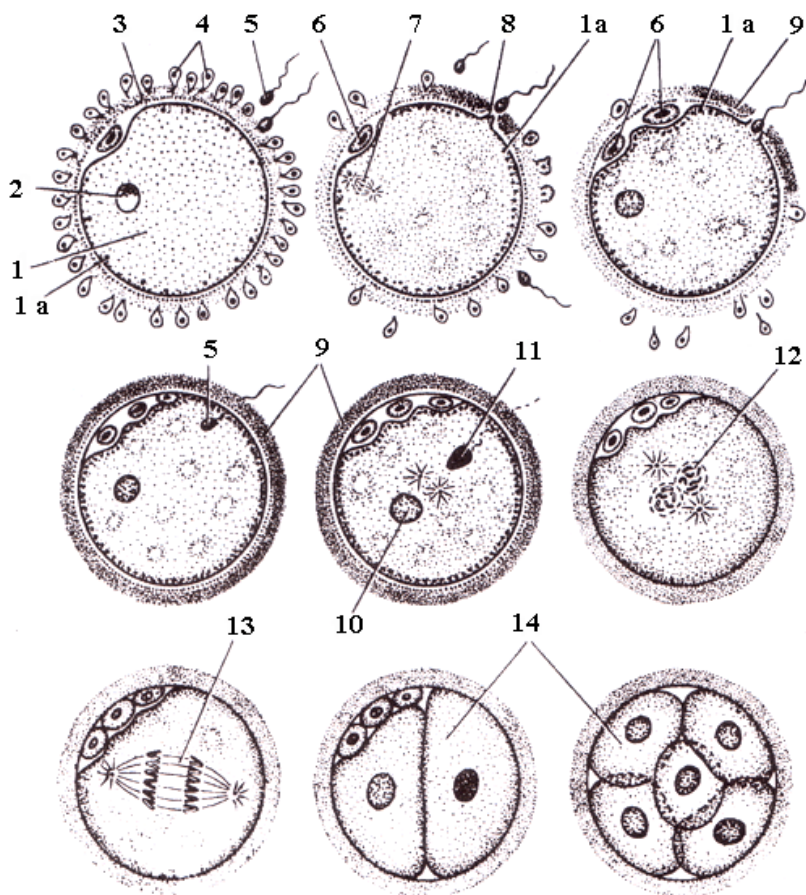


Рисунок 8 - Фазы оплодотворения и начало дробления

1 — ооплазма; 1a — кортикальные гранулы; 2 — ядро; 3 — блестящая зона; 4 — фолликулярный эпителий; 5 — спермин; 6 — редуционные тельца; 7 — митотическое деление ооцита; 8 — бугорок оплодотворения; 9 — оболочка оплодотворения; 10 — женский пронуклеус; 11 — мужской пронуклеус; 12 — синкарион; 13 — первое митотическое деление зиготы; 14 — бластомеры.

ГЛАВА 7. ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ

Созревание ядра яйцеклетки начинается после оплодотворения и длится до образования двух пронуклеусов. На этой стадии из ооцита образуется зигота. Гаплоидный материал ядра клетки, который образовался после деления и созревания в яйцеклетке, образует женское пред-ядро - женский пронуклеус. Одновременно головка сперматозоида, также с гаплоидным набором хромосом, образует мужской пронуклеус, которые имеет большие размеры, чем женский. При постоянном увеличении объема оба пронуклеуса приближаются друг к другу. В момент самой большой аппроксимации (сближения) пронуклеусов исчезают их мембраны, и образованные в метафазе хромосомы собираются вместе, как при делении ядра при митотическом делении. Оплодотворенная яйцеклетка - это начальная эмбриональная фаза.

Деление бластомеров эмбриона происходит синхронно, так что при каждом дроблении количество бластомеров удваивается.

До середины 2-клеточной стадии зародыши полностью зависят от ооплазматических запасов белков и м-РНК. С середины 2-клеточной стадии активируются гены зародыша. В это же время начинают разрушаться м-РНК ооцита, но белки, транслированные с этих м-РНК сохраняются до стадии бластоцисты, а некоторые и позже. В конце двухбластомерной стадии в некоторых ядрах появляются типичные ядрышки, то есть активируются рибосомальные гены зародыша. Эти гены, на данной стадии, экспрессируются и в основном они необходимы для поддержания жизнедеятельности клеток. Ядра, находясь под контролем цитоплазматических факторов яйца, выполняют преимущественно функции клеточных органоидов, обеспечивающих упорядоченность дробления.

До стадии развития в 16 клеток бластомеры располагаются свободно друг от друга и легко различимы. Во время

последующих двух делений, в ходе которых возникает морула, бластомеры (от 16 до 64) начинают уплотняться. Этот процесс называется компактизацией. Компактизация, представляет самое важное отличие дробления зародышей от всех других типов дробления.

Известно, что плазматическая мембрана каждого бластомера покрыта микроворсинками, которые возникают, благодаря образованию актиновых микрофиламентов. При помощи микроворсинок соседние бластомеры прикрепляются друг к другу. Медиаторами межклеточной адгезии служат гликопротеины, функционирующие на поверхностях микроворсинок. Одним из этих гликопротеинов является увоморулин. Антитела к увоморулину вызывают декомпактизацию бластомеров. При компактизации происходит уплощение контактирующих поверхностей соседних бластомеров, микроворсинки укорачиваются путем деполимеризации актина. Таким образом, бластомеры приобретают полярность, которая выражается в наличии микроворсинок только на наружной части их мембран, не контактирующей с другими бластомерами, а также в асимметричном расположении внутриклеточных компонентов.

Плоскость следующего деления ориентирована так, чтобы использовать эту асимметрию для создания двух различных потомков поляризованного бластомера - полярной клетки, которая располагается снаружи морулы, и аполярной, расположенной внутри нее. Так, клетки компактизированного зародыша делятся и образуют 16- и 32-клеточную морулу. После компактизации тесная упаковка бластомеров стабилизируется более совершенными межклеточными контактами: внутри морулы, между клетками, возникают щелевые контакты (они образуются сразу после компактизации, в конце 8-клеточной стадии) а на поверхности морулы образуются плотные контакты, что приводит к изоляции внутренних клеток морулы.

Во время 6-го - 7-го делений дробления морула преобразуется в бластоцисту (зародышевый пузырек). Стадия бластоцисты играет важную роль, так как при преобразовании

морулы в бластоцисту происходит первый процесс дифференцировки. Большая часть потомков наружных клеток морулы становится клетками трофобласта. Эта группа клеток не образует эмбриональных структур, а превращается в хорион, участвующий в образовании плаценты. Ткани плаценты обеспечивают получение плодом кислорода и питательных веществ от матери; секретируют гормоны, необходимые для вынашивания плода; синтезируют регуляторы иммунного ответа, благодаря которым мать не отторгает зародыш. Однако клетки трофобласта не способны образовать ни одной клетки самого зародыша. Они необходимы для имплантации зародыша в стенку матки.

Внутренние (аполярные) клетки 16-клеточной морулы, к которым иногда добавляются и наружные (при переходе к 32-клеточной стадии) образуют эмбриобласт - внутреннюю клеточную массу. Клетки эмбриобласта предназначены для развития зародыша и для индукции процессов, необходимых для полноценной имплантации и плацентации. Внутренняя клеточная масса, вместе с трофобластом, также участвует в формировании зародышевых оболочек.

Установлено, что бластомеры, которые на 2-клеточной стадии делятся первыми, с большей вероятностью оказываются среди внутренних клеток морулы, а значит и среди клеток эмбриобласта. Следовательно, они имеют большую вероятность попасть в состав тела зародыша.

Морула представляет собой шаровидное скопление бластомеров, лишенное полости, а бластоциста - пузырек, состоящий из стенки (трофобласт), полости с жидкостью (бластоцель) и скопления клеток эмбриобласта на одном из полюсов внутренней поверхности трофобласта.

Процесс образования полости, то есть образования бластоцисты, называется кавитацией. Накопление жидкости в зародыше требует затрат энергии и зависит от активного переноса ионов Na во внутренние межклеточные пространства. В плазматических мембранах клеток трофобласта имеется калий-натриевый насос, который переносит ионы Na внутрь

зародыша, при этом осмотическое давление повышается и сюда начинает поступать жидкость. Накапливаясь между бластомерами, жидкость отодвигает бластомеры к одному из полюсов трофобласта, здесь из них формируется эмбриобласт. Плотные контакты, которыми соединяются клетки трофобласта помогают удерживать жидкость в полости. Чем больше бластополость и лучше развита внутренняя клеточная масса и трофобласт – тем больше потенциал эмбриона к имплантации. Когда полость бластоцисты достигает значительного размера, истончившаяся за счет растяжения зона пеллюцида разрывается и начинается процесс хэтчинга, т.е. выхода бластоцисты из зоны пеллюцида. Только после окончания этого процесса бластоциста способна имплантироваться в эндометрий матки.

7.1. Общие подходы к оценке качества клеток

Оценка состояния зародышей служит для отбора неоплодотворенных яйцеклеток и определения стадии развития эмбрионов, а также выявления повреждений отдельных бластомеров или всего эмбриона. Морфологическая оценка является основным методом определения качества клеток. При этом учитываются основные морфологические признаки полноценности зародышей, которые могут визуально наблюдаться у эмбриона, а именно: целостность и равномерность развития бластомеров, прозрачность перивителинового пространства, целостность зоны пеллюцида, соответствии стадии развития возрасту эмбриона. Частицы на поверхности зоны пеллюцида указывают на возможность бактериального заражения. Часто при инфицировании половых органов доноров яйцеклетки остаются неоплодотворенными. Различия в величине между бластомерами в пределах 2:1 оцениваются как нормальные, так как к исследованию попадают эмбрионы при различной последовательности циклов деления. Более сильные различия величины (4:1 и больше) возникают, если отдельные бластомеры прекращают деление. Сжатие бластомеров - это в большинстве случаев следствие

гипертонических нагрузок. Деформация возникает при измененном внутреннем давлении клеток, или в результате дефектов в клеточных мембранах.

По результатам оценки делается заключение о качестве эмбриона и принимается решение о его дальнейшем использовании.

7.2. Временные параметры развития эмбрионов

Овуляция у нормально циклирующих коров происходит через 30-32 ч после начала течки. Оплодотворение ооцита полноценным спермием наступает уже через 3-4 ч после овуляции. Слияние пронуклеусов происходит через 15 ч. после оплодотворения. Оплодотворенные *in vitro* яйцеклетки коров достигают 2, 4 и 8-клеточной фазы в период между 15-24 ч, 35-40 ч и через 45-50 ч после оплодотворения. Ранние и поздние морулы, а также ранние бластоцисты появляются через 120 часов. Через 8 суток в среде обнаруживаются поздние и экспандированные бластоцисты, через 264 часа (11 суток) – вышедшие из зоны пеллюцида.

7.3. Морфологическая оценка качества ооцитов *in vitro*

Использование технологии *in vitro* с достаточной эффективностью невозможно без определения способности половых клеток к полноценному созреванию и оплодотворению. Одним из классических способов определения жизнеспособности ооцитов считается оценка их морфологического состояния с использованием прижизненной микроскопии.

Популяция выделенных фолликулярных ооцитов является весьма неоднородной как по морфологии, так и по функциональному состоянию. У 30% всех яйцеклеток выявляются видимые признаки дегенерации: сжатие или фрагментация ооплазмы, увеличение перивителинового пространства, отслоение или полное отсутствие кумулюса;

деформированная, неравномерная по толщине прозрачная оболочка и др. Остальные клетки можно считать пригодными для культивирования, однако при цитогенетическом анализе ооцитов после 24 часов культивирования обнаруживается около 80% зрелых, пригодных к оплодотворению яйцеклеток.

В организме самки ооциты созревают в фолликуле. Тесная связь ооцита и окружающих его кумулюсных клеток обеспечивает его нормальное развитие и созревание.

По состоянию кумулюса яйцеклетки можно подразделить на следующие группы:

1. Ооциты с компактным, многослойным, плотно прилегающим к ооциту, кумулюсом.
2. Ооциты с разрыхленным многослойным кумулюсом.
3. Ооциты с разрыхленным, частично отслоившимся кумулюсом или в виде разрозненных участков, покрывающих ооцит.

Ооплазму у ооцита можно охарактеризовать по следующим признакам:

1. Мелкозернистая, равномерно заполняющая пространство под прозрачной оболочкой.
2. Ооплазма с участками гранулярной конденсации, равномерно заполняющая пространство под прозрачной оболочкой.

Прозрачная оболочка, обеспечивающая связь внутренних структур ооцита с внешней средой, характеризуется следующими данными: опалесцирующая, равномерная по ширине, округлой формы.

Из морфологической оценки качества вышеперечисленных структур складывается общая оценка качества ооцит кумулюсных комплексов и его способности к дальнейшему развитию и созреванию (табл. 40). Популяцию полученных ооцит-кумулюсных комплексов рекомендуется разделять на группы по следующим морфологическим признакам:

1-я группа – компактный, многослойный, плотно прилегающий к ооциту кумулюс; ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняющая прозрачную оболочку;

2-я группа - компактный, многослойный, плотно прилегающий к ооциту кумулюс; ооплазма мелкозернистая, имеет участки гранулярной конденсации;

3-я группа – разрыхленный многослойный кумулюс, плотно прилегающий к ооциту; ооплазма имеет участки гранулярной конденсации;

4-я группа – частично отслоившийсярыхлый кумулюс; ооплазма с гранулярной конденсацией;

5-я группа – ооциты без кумулюса с мелкозернистой ооплазмой равномерно или фрагментарно заполняющие оболочку.

Таблица 40 - Классификация ооцит-кумулюсных комплексов

№ п/п	Морфологические признаки	Оценка
1	Многослойный компактный кумулюс (не менее 3-х слоев) плотно прилегающий к зоне пеллюцида, ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет пространство под прозрачной оболочкой, которая равномерная по толщине, опалесцирует, не имеет никаких нарушений, округлая по форме	5
2	Многослойный компактный или разрыхленный кумулюс, плотно прилегающий к зоне пеллюцида, ооплазма имеет участки гранулярной конденсации, прозрачная оболочка округлая, опалесцирует, не имеет дефектов, равномерная по толщине	4
3	Частично отслоившийся кумулюс, ооплазма имеет участки гранулярной конденсации, прозрачная оболочка равномерная по толщине, округлая по форме	3
4	Ооцит без кумулюса, ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет зону пеллюцида, прозрачная оболочка округлая, равномерная по толщине	2

7.4. Морфологическая оценка качества яйцеклеток полученных in vivo

Оценка ооцитов заканчивается, если они были идентифицированы как “неоплодотворенные яйцеклетки”. Все неоплодотворенные яйцеклетки, которые вымываются из матки между 6-9 днем являются дегенерированными. Частым явлением неоплодотворенных ооцитов является их сморщивание, смещение гранулярных составных частей цитоплазмы, а также их полное растворение. Фрагментативное разрушение ооцитной мембраны ведет к образованию псевдобластомеров. Хорошо сохранившиеся ооциты могут встречаться даже на 7-14 день. Также нужно обращать внимание на то, что при некоторых формах дегенерации, и при слабом увеличении микроскопа, ооциты можно перепутать с эмбрионами.

7.5. Эмбрионы

7.5.1. Общая оценка

Все эмбрионы подвергнутые оценке относят к трем основным группам:

- нормально развитые (полноценные) эмбрионы;
- частично дегенерированные эмбрионы;
- дегенерированные эмбрионы.

Реже встречаются нетипичные эмбрионы – это бластоцисты с отклонениями в области эмбрио- и трофобласта.

7.5.2. Нормально развитые (полноценные) эмбрионы

Характеризуются полноценным делением всех бластомеров, которые образуют морулу и бластоцисту.

Под влиянием различных факторов могут образовываться дефекты ооцитов и эмбрионов. Эти дефекты ведут к отмиранию бластомеров. Если все бластомеры испорчены, эмбрион дегенерирует.

7.5.3. Частично-дегенерированные эмбрионы

В отдельных случаях происходит дегенерация части бластомеров, которые располагаются наряду с нормальными бластомерами. Деградированные клетки можно идентифицировать на стадии развития - морула. Они проявляются как отдельный клеточный материал и всегда находятся в не связи компактно расположенных бластомеров.

7.5.4. Дегенерированные эмбрионы

При полном разрушении бластомеров, при их неравномерном делении, задержке в развитии и др. эмбрион признается дегенерированным и непригодным к пересадке.

Признаки присущие эмбрионам, находящимся на разных стадиях развития между 6 и 9 днем после овуляции, представлены в таблице 41.

7.5.5. Морфологическая характеристика эмбрионов после их извлечения

Морфологическая оценка состояния зародышей является одним из методов комплексной их оценки. Она служит для отбора неоплодотворенных яйцеклеток и определения стадии развития зародышей, а также выявления повреждений отдельных бластомеров или всего зародыша /17, 85/.

При этом учитывают следующие основные морфологические признаки полноценности зародышей: целостность и равномерность развития бластомеров, прозрачность перивителлинового пространства, целостность зоны пеллюцида соответствие стадий развития возрасту зародыша (табл. 41).

Таблица 41 - Признаки, определяющие стадию развития эмбриона

Стадия развития	Сокращенное название	п клеток	Ø, мкм	Признаки
1	2	3	4	5
Начальная стадия дробления		2-16	140-170	Бластомеры круглой или овальной формы, располагаются свободно.
МОДУЛЫ	Мо			Стадия компактизации: постепенное укрепление клеточных контактов.
Ранняя морула	Мо I	16-32	140-170	Начало компактизации: скопление клеток равномерное, бластомеры одинаковые по размеру, перивителлиновое пространство свободное от отдельных бластомеров, плазмы и других включений.
Поздняя морула	Мо II	32-64	140-170	Завершение компактизации: клеточный комплекс равномерный, крайние бластомеры одинаковой величины и наполнения, перивителлиновое пространство свободное от отдельных бластомеров, плазмы и других включений.
БЛАСТОЦИСТЫ	Бл			Образование эмбриобласта, трофобласта и бластополости.
Ранняя бластоциста	Бл I	64-130	140-170	Маленькая, преимущественно эксцентрическая бластополость в форме щели, различим эмбрио- и трофобласт.

Продолжение таблицы 41

1	2	3	4	5
Поздняя бластоциста	Бл II	64-130	140-200	Эмбриобласт локализован, трофобласт равномерный, уменьшение перивителлинового пространства вследствие расширения бластополости.
Экспандированная бластоциста	Бл III	64-130	140-200	Эмбриобласт имеет четкие границы, из-за увеличения размеров бластополость расширяется и истончает зону пеллюцида.
Полностью экспандированная бластоциста	Бл IV	130-200	180-220	Эмбриобласт обозначен четко, расширение и истончение зоны пеллюцида, максимально увеличена бластополость.
Бластоциста выходящая из зоны пеллюцида	Бл IV	Более 200	180-220	Происходит наклеивание и разрыв зоны пеллюцида. Эмбрио- и трофобласт начинает выходить из зоны.
Бластоциста вышедшая из зоны пеллюцида	Бл V	200-800	200-800	Шарообразная форма. Эмбрио- и трофобласт отчетливо различимы. Зона пеллюцида отсутствует.

Для определения полноценности и жизнеспособности зародышей применяют следующие методы: а) визуальную морфологическую оценку, б) прижизненное окрашивание, в) культивирование вне организма в течение 24-28ч. цитологическую и цитогенетическую оценку. Наиболее распространена визуальная оценка под микроскопом в проходящем свете или через фазовый контрастный.

В таблице 42 представлены данные анализа морфологической оценки эмбрионов крупного рогатого скота после их извлечения в различные сроки после осеменения.

При извлечении эмбрионов на 6 день цикла около половины эмбрионов (49,7%) находилось на стадии ранней морулы, на седьмой день на стадии поздней морулы и ранней

бластоцисты (78,5%), на 8-й день на стадии экспондированной бластоцисты (73,8%), на девятый день 21,7% эмбрионов начали выходить из зоны, а 45,1% уже вышли из зоны. Процент отставших в развитии по этим срокам составило 30,1% 10,1% 7,5%; 5,7% на 6, 7, 8 и 9 день, соответственно. Из чего следует, что наиболее целесообразно проводить извлечение зародышей на 7-8 день, когда получаем наибольший выход эмбрионов пригодных к пересадке или криоконсервированию.

Таблица 42 - Стадия развития эмбрионов в зависимости от срока после осеменения

Эмбрионы по стадиям, раз	Срок после осеменения			
	6	7	8	9
2-клеточные	4,7	2,5	2,1	1,7
4-клеточные	8,2	3,1	2,1	1,5
8-клеточные	7,4	2,7	1,0	1,3
16-клеточные	9,8	1,8	2,3	1,2
Ранняя морула	49,7	6,5	3,5	2,9
Поздняя морула	20,0	43,9	2,1	1,7
Ранняя бластоциста	0,2	34,6	11,8	2,8
Экспондированная бластоциста	-	4,8	73,8	10,3
Вылупляющаяся бластоциста	-	0,1	1,3	21,7
Вылупившаяся бластосиста	-	-	-	45,1

7.5.6. Оценка жизнеспособности эмбрионов методом культивирования

Одним из методов определения биологической полноценности эмбрионов является их культивирование вне организма (*in vitro*) /80/ в различных солевых растворах и синтетических питательных средах. В наших исследованиях мы использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко, раствор Хенкса и питательную среду ТС-99 отечественного производства с добавлением 20% фетальной или эстральной сыворотки (табл. 43).

Как показал опыт (культивирование продолжалось 24 часа) наименьший уровень продолживших развитие эмбрионов был в случае, когда на культивирование ставились ранние морулы. Средний процент таких зародышей составил всего 66,0%. По мере увеличения возраста эмбриона увеличивалось и количество продолжавших свое развитие – 77,1% поздних морул 92,7% ранних и 100% поздних бластоцист. Кроме этого отмечено более эффективное действие на этот процесс сложных питательных сред. При использовании ТС-99 86,7% продолжили свое развитие, фосфатного буфера Дюльбекко и раствора Хенкса. Эти показатели составили 76,4 и 84,5%, соответственно. Следует также отменить более высокую эффективность использования эстральной сыворотки по сравнению с фетальной сывороткой плодов крупного рогатого скота.

Таблица 43 - Оценка качества эмбрионов методом культивирования

Питательная среда	Стадия развития							
	Мо I		Мо II		Бла I		Бла II	
	Поставлено на культивирования, n	Продолжили развитие, n - %	Поставлено на культивирования, n	Продолжили развитие, n - %	Поставлено на культивирования, n	Продолжили развитие, n - %	Поставлено на культивирования, n	Продолжили развитие, n - %
Дюльбекко + 20% ФС	10	5-50,0	7	5-71,4	5	4-80,0	7	7-100
Дюльбекко + 20% ФС	7	4-57,1	5	4-80,0	5	4-80,0	9	9-100
Хенкса + 20% ФС	8	5-62,5	8	7-87,5	7	7-100	5	5-100
Хенкса + 20% ФС	9	6-66,7	8	6-75,0	7	7-100	6	6-100
ТС-199 + 20% ФС	8	6-75,0	11	8-72,7	9	8-88,9	7	7-100
ТС-199 + 20% ФС	8	7-87,5	9	7-77,8	8	8-100	7	7-100
Итого	50	33-66,0	48	37-77,1	41	38-92,7	41	41-100

Результаты культивирования половинок эмбрионов после деления (табл. 44) показывают схожие результаты, как по используемым средам, так и по сывороткам. Анализ данных регенеративной способности демизембрионов в зависимости от стадии, на которой находился интактный эмбрион, выявил, что наибольшей способностью к дальнейшей активизации и развитию обладают половинки поздних морул и ранних бластоцист, процент жизнеспособности которых составил 85,4% и 90,6%, в то время как среди поздних бластоцист развилось 40,5% полуэмбрионов, а среди ранних морул всего лишь 15,0%.

Таким образом, наиболее пригодными для деления являются эмбрионы на стадии поздней морулы и ранней бластоцисты.

Таблица 44 - Оценка качества половинных эмбрионов методом культивирования

Питательная среда	Стадия развития							
	Мо I		Мо II		Бла I		Бла II	
	Поставлено на культивирования, n	Продолжили развитие, n - %	Поставлено на культивирования, n	Продолжили развитие, n - %	Поставлено на культивирования, n	Продолжили развитие, n - %	Поставлено на культивирования, n	Продолжили развитие, n - %
Дюльбекко + 20% ФС	5	1-20	4	3-75	6	6-100	7	4-57,1
Дюльбекко + 20% ФС	5	-	6	5-83,3	6	5-83,3	7	3-42,8
Хенкса + 20% ФС	7	1-14,3	7	7-100	8	5-62,5	6	2-33,3
Хенкса + 20% ФС	7	1-14,3	7	7-100	8	6-75,0	6	1-16,7
ТС-199 + 20% ФС	8	1-12,5	4	3-75	10	10-100	8	4-50
ТС-199 + 20% ФС	8	2-25	4	4-100	10	9-90,0	8	3-37,5
Итого	40	6-15,0	32	29-90,6	48	41-85,4	42	17-40,5

7.5.7 Морфологическая оценка качества половых клеток

7.5.7.а ООЦИТЫ IN VITRO (после извлечения из фолликула)

Рисунок 9

Ооцит отличного качества

- многослойный компактный кумулюс (не менее 3-х слоев) плотно прилегающий к зоне пеллюцида;
- ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет прозрачную оболочку;
- прозрачная оболочка опалесцирует;
- не имеет никаких нарушений;
- округлая по форме.

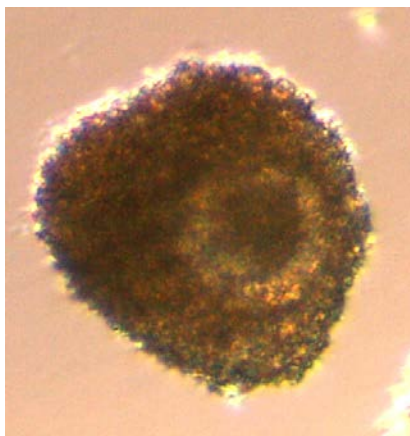
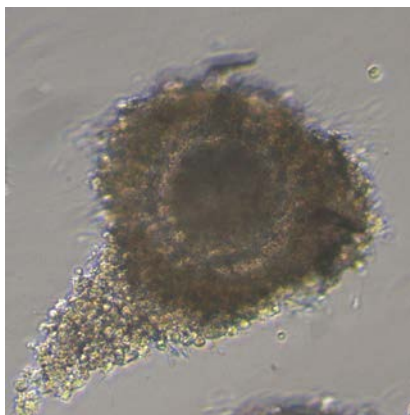


Рисунок 10

Ооцит хорошего качества

- многослойный компактный или разрыхленный кумулюс, плотно прилегающий к зоне пеллюцида;
- ооплазма имеет участки гранулярной конденсации;
- прозрачная оболочка округлая; опалесцирующая, не имеет дефектов, равномерная по толщине.



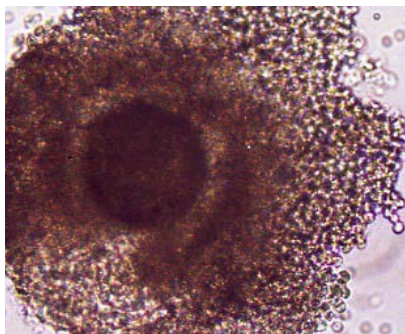


Рисунок 11

Ооцит хорошего качества

- многослойный компактный или разрыхленный кумулюс, плотно прилегающий к зоне пеллюцида;
- ооплазма имеет участки гранулярной конденсации;
- прозрачная оболочка округлая, опалесцирующая, не имеет дефектов, равномерная по толщине.

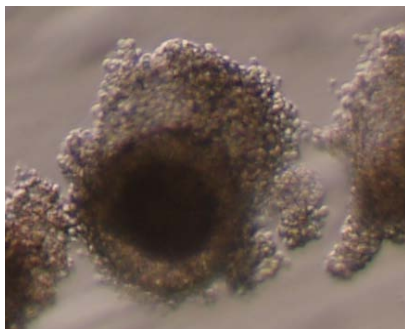


Рисунок 12

Ооцит удовлетворительного качества

- частично отслоившийся кумулюс;
- ооплазма имеет участки гранулярной конденсации;
- прозрачная оболочка равномерная по толщине, округлая по форме.

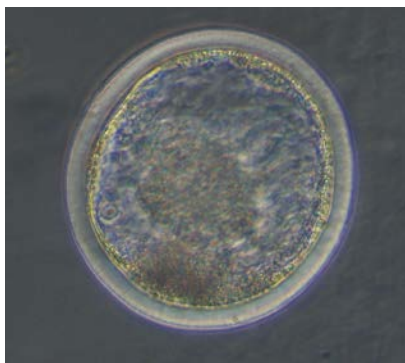


Рисунок 13

Ооцит непригодный для культивирования

- ооцит без кумулюса;
- ооплазма; мелкозернистая, равномерно заполняет зону пеллюцида;
- прозрачная оболочка округлая, равномерная по толщине.

7.5.76 ООЦИТЫ И ЯЙЦЕКЛЕТКИ IN VIVO

Рисунок 14

Ооцит (0-1 д)

Ооцит с кумулюсными клетками (ооцит-кумулюсный комплекс), способный к оплодотворению.

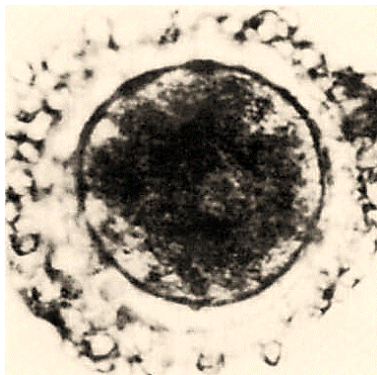
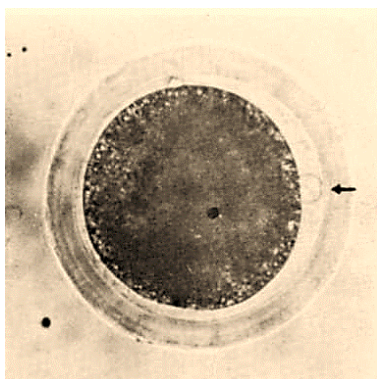


Рисунок 15a

Яйцеклетка (0-1 д)

Яйцеклетка без кумулюсных клеток с первым полярным тельцем, способная к оплодотворению

- первое полярное тельце указано стрелкой.



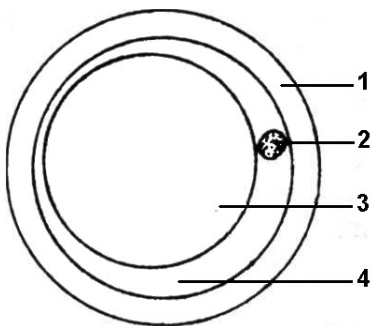


Рисунок 15б
Яйцеклетка (0-1 д)

Схема яйцеклетки с первым полярным тельцем без кумулюсных клеток. Способная к оплодотворению.

1. Зона пеллюцида;
2. Полярное тельце 1;
3. Ооплазма;
4. Перивителлиновое пространство.

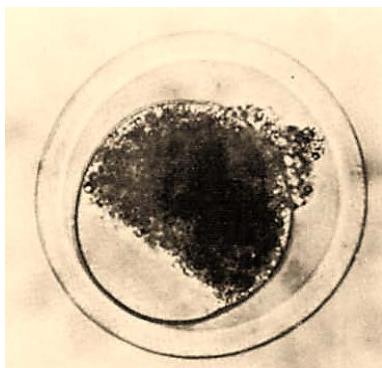


Рисунок 16
Яйцеклетка (6 д)

- незначительное сморщивание, фрагментация ооплазмы;
- смещение гранулярных составных частей цитоплазмы.

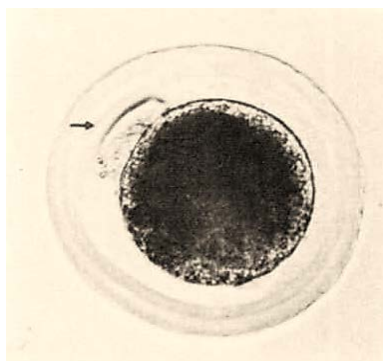


Рисунок 17
Яйцеклетка (7 д)

- незначительное сморщивание ооплазмы;
- имеется полярное тельце (указано стрелкой).

Рисунок 18
Яйцеклетка (7 д)

- сморщивание, деформация, агглютинация гранулярных составных частей цитоплазмы (указано стрелкой).

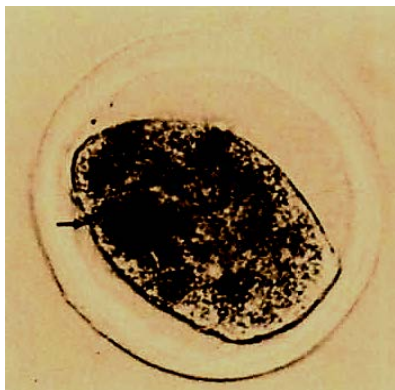


Рисунок 19
Яйцеклетка (7 д)

- выпячивания цитоплазмы похожие на бластомеры (можно спутать с морулой).

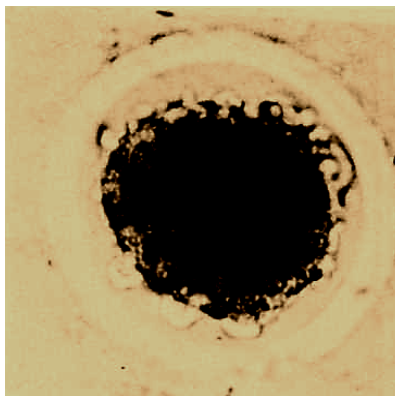
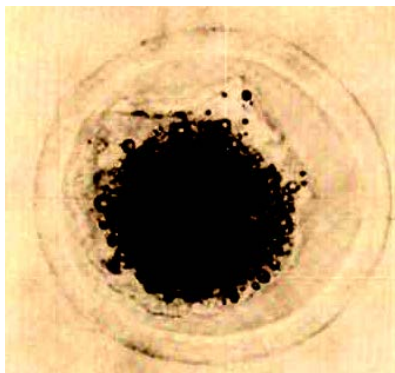


Рисунок 20
Яйцеклетка (7 д)

- амёбовидные отростки, смещение гранулярных составных частей цитоплазмы.



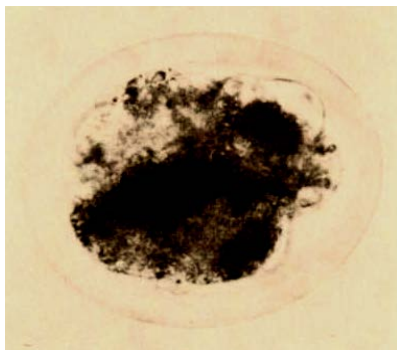


Рисунок 21
Яйцеклетка (7 д)

- фрагментация ооплазмы
(часто можно спутать с сильно
задержавшимся в развитии
дегенерированным эмбрионом)

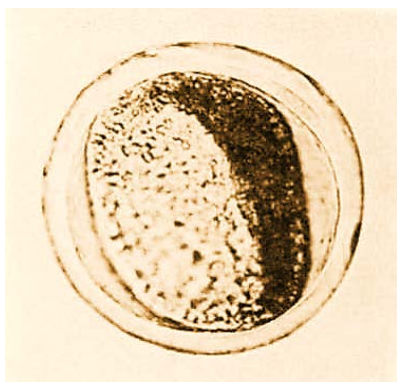


Рисунок 22а
Яйцеклетка (7 д)

- деформация, смещение
гранулярных составных частей
цитоплазмы
(можно спутать с
бластоцистой).



Рисунок 22б
Яйцеклетка (7 д)
(вид с боку).

Рисунок 23
Яйцеклетка (8 д)

- сильно дегенерирована;
- остатки цитоплазмы в перивителлиновом пространстве после лизиса клеток ооцита (при слабом увеличении можно спутать с бластоцистой).

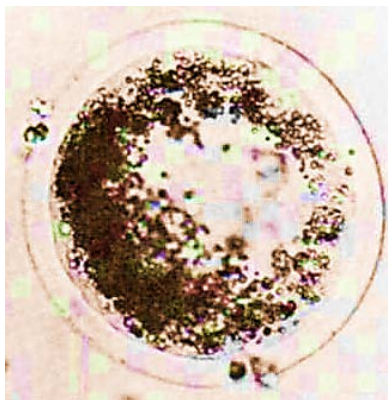
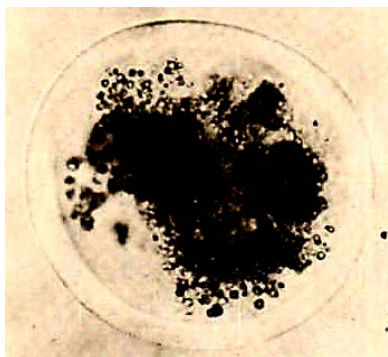


Рисунок 24
Яйцеклетка (7 д)

- сильно дегенерирована;
- фрагментация, лизис цитоплазмы (можно, спутать с сильно задержавшимся в развитии, дегенерировавшим эмбрионом).



7.5.7в ЭМБРИОНЫ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ



Рисунок 25
Эмбрион *in vitro*
на 2-х клеточной стадии (1-2)

- многочисленные спермии на наружной поверхности зоны пеллюцида (видна разница в размерах эмбриона и спермиев);
- добавочные спермии в оплодотворении *in vivo* не участвуют;

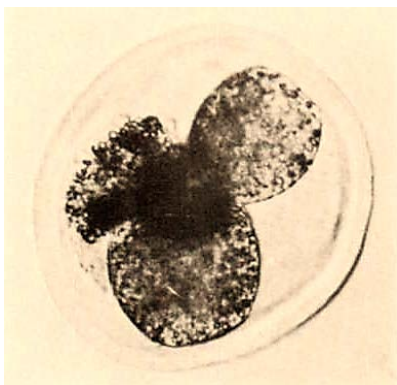


Рисунок 26
4-х клеточный эмбрион (6 д)

- бластомеры сильно деформированы;
- не пропорциональное деление бластомеров;
- значительное отставание в развитии.

Непригодный для трансплантации

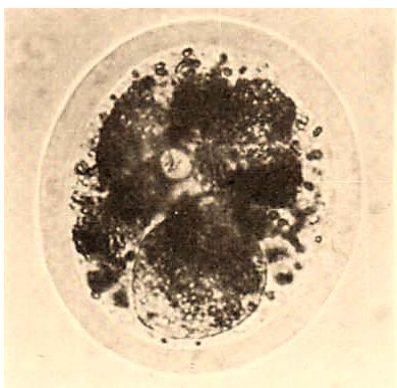


Рисунок 27
4-х клеточный эмбрион (6 д)

- прогрессирующая дегенерация;
- лизис бластомеров;
- сильная задержка в развитии.

Непригодный для трансплантации

Рисунок 28
5-клеточный эмбрион (6 д)

- наличие плазмы в перивителиновом; пространстве (указано стрелкой)
- лизис бластомеров;
- задержка в развитии.

Непригодный для трансплантации

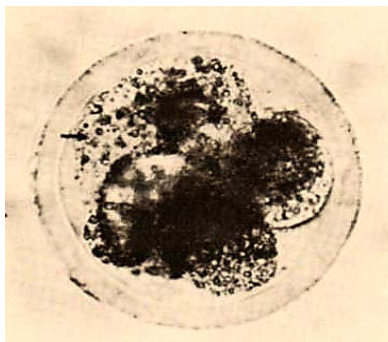


Рисунок 29
6-клеточный эмбрион (6 д)

- неравномерное дробление;
- сильная задержка в развитии.

Непригодный для трансплантации

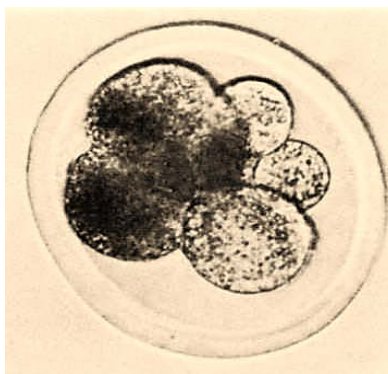
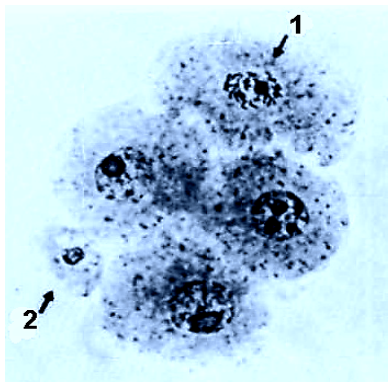


Рисунок 30
Эмбрион с 6-ю бластомерами при переходе на 8-клеточную стадию (2-3 д)

- видны клеточные ядра, из них 3 в интерфазе и 1 в прометафазе /1/, полярное тельце 2 /2/ (ацето-орсеиновое окрашивание)



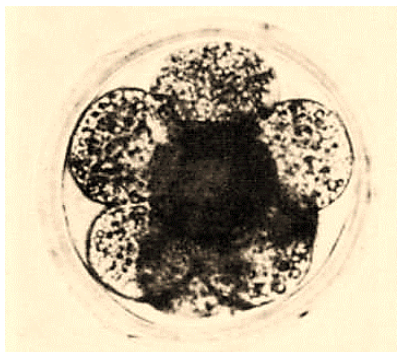


Рисунок 31
Эмбрион на 8-клеточной
стадии развития (3-4 д)

Непригодный для
трансплантации

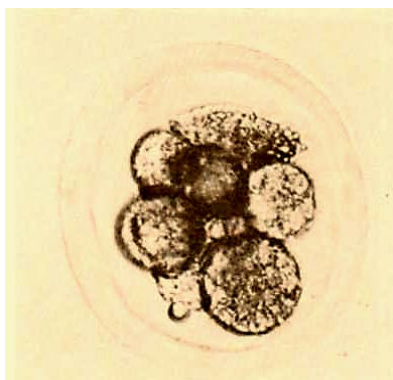


Рисунок 32
10-ти клеточный эмбрион (6 д)

- бластомеры различные по размерам;
- неравномерное дробление;
- деформация бластомеров
- задержка в развитии.

Эмбрион непригодный для
трансплантации

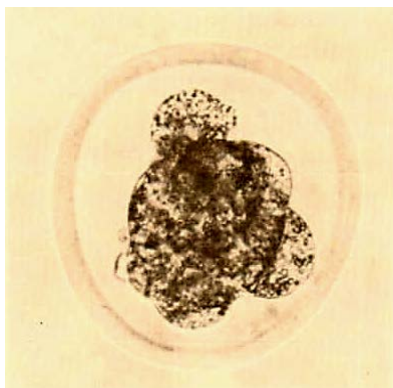


Рисунок 33
Эмбрион с 13 бластомерами
(6 д)

- задержка в развитии;
- частичный лизис бластомеров;
- неравномерное дробление.

Эмбрион непригодный для
трансплантации

Рисунок 34

16-ти клеточный эмбрион (6 д)

- прогрессирующая дегенерация (фрагментация и лизис бластомеров);
- задержка в развитии.

Эмбрион непригодный для трансплантации

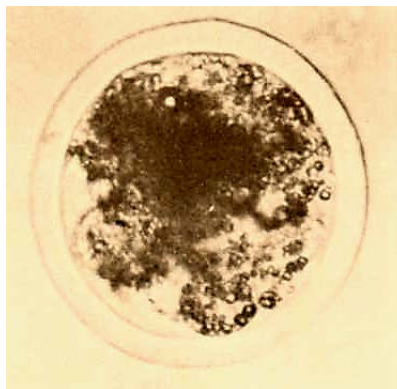


Рисунок 34а

**16-ти клеточный эмбрион
(4-5 д)**

**Эмбрион непригодный для
трансплантации**



7.5.7г МОРУЛЫ

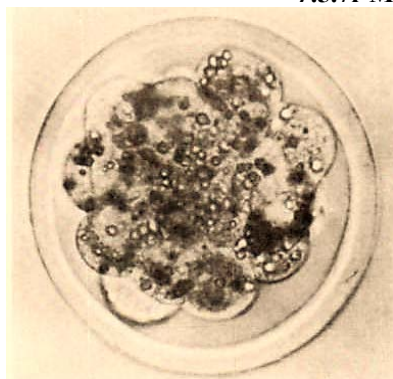


Рисунок 35

Ранняя морула (5-6 д)

- начало процесса уплотнения (компактизации);
- скопление клеток равномерное;
- бластомеры одинаковы по величине и тургору;

Эмбрион пригодный для трансплантации

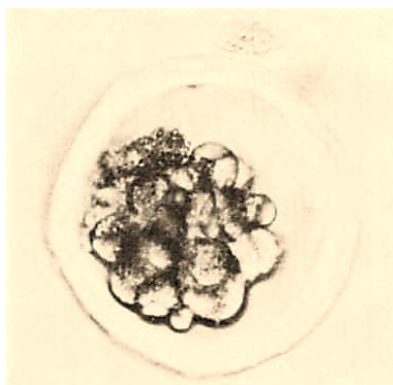


Рисунок 36

Ранняя морула (6 д)

- деформация и сморщивание бластомеров;
- нарушение тургора, в связи с чем зона пеллюцида не округлая, деформированная.

Эмбрион неудовлетворительного качества, для пересадки непригодный

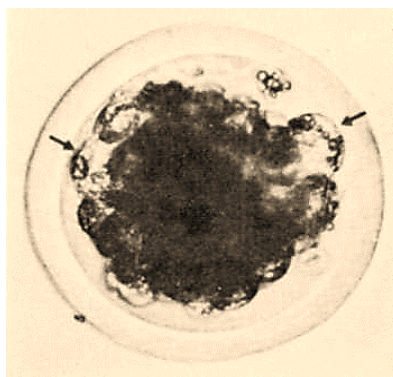


Рисунок 37

Ранняя морула (7 д)

- нарушение межклеточных связей (указано стрелкой);
- в перивителлиновом пространстве имеются отдельные бластомеры.

Эмбрион удовлетворительного качества, пригодный для трансплантации

Рисунок 38
Ранняя морула
(6 д)

- нарушение межклеточных связей;
- бластомеры разной величины;
- наличие плазмы в перивителлиновом пространстве.

Эмбрион удовлетворительного качества, условно годный для трансплантации

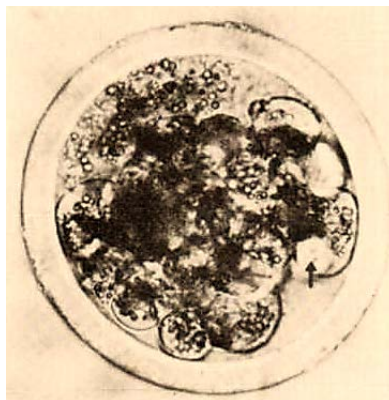


Рисунок 39
Ранняя морула (6 д)

- компактизация еще не закончена, имеются хорошие межклеточные связи, перивителлиновое пространство свободно от отдельных бластомеров и плазмы, бластомеры одинаковы по величине и тургору, клеточные границы отчетливы

Эмбрион отличного качества

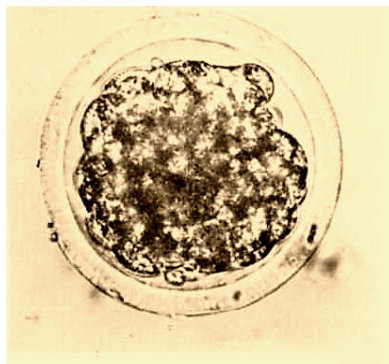
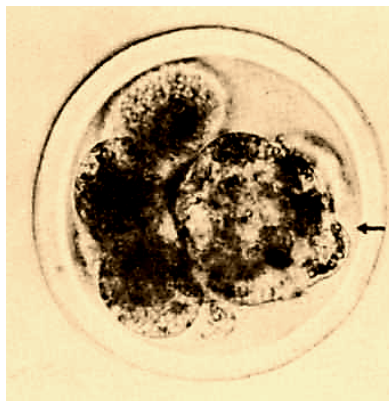


Рисунок 40
Ранняя морула (6 д)

- около 50% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- межклеточные связи хорошие;
- клеточные границы отчетливы;
- цитоплазматические гранулы распределены равномерно.

Эмбрион удовлетворительного качества, пригодный для трансплантации



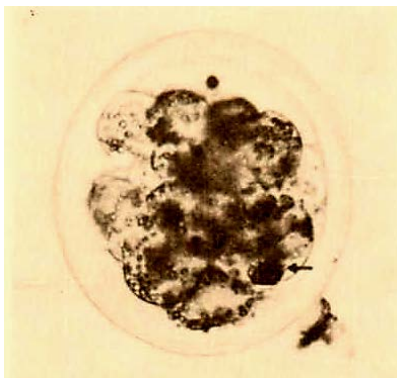


Рисунок 41
Ранняя морула (7 д)

- ослабление клеточных связей;
- бластомеры различаются по размерам;
- агглютинация
цитоплазматических гранул
(указано стрелкой);

**Эмбрион условно годный для
трансплантации**

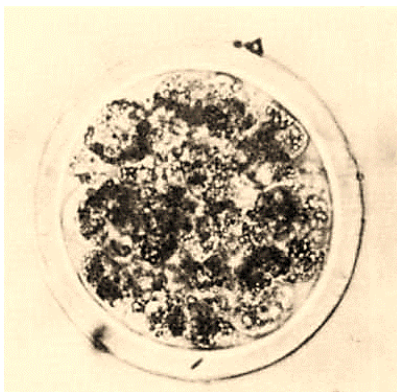


Рисунок 42
Ранняя морула (6 д)

- межклеточные связи
нарушены.

**Эмбрион
удовлетворительного
качества, условно годный для
трансплантации**

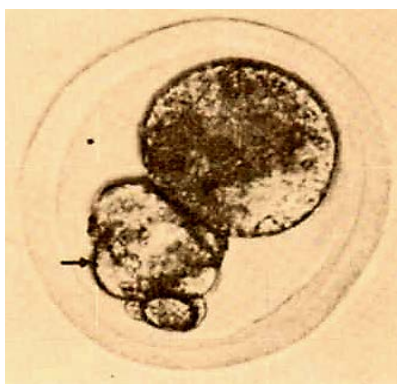


Рисунок 43
Ранняя морула (6 д)

- около 50% дефектных
бластомеров (указано стрелкой);
- задержка в развитии.

**Эмбрион условно годный для
трансплантации**

Рисунок 44

Поздняя морула (6-7 д)

- процесс компактизации завершён;
- скопление клеток равномерное;
- крайние бластомеры одинаковы по величине и наполнению;

Эмбрион отличного качества

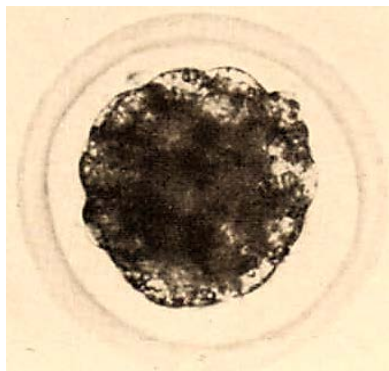


Рисунок 45

Поздняя морула (7 д)

- компактизация завершена
- межклеточные связи хорошие;
- бластомеры одинаковые по величине и тургору;
- отчетливые клеточные границы.

Эмбрион отличного качества

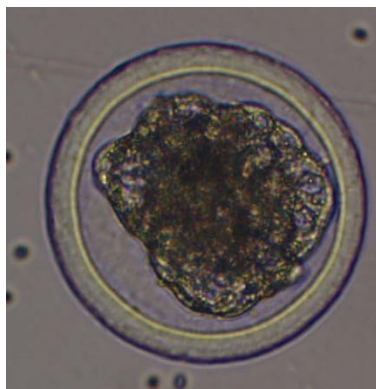
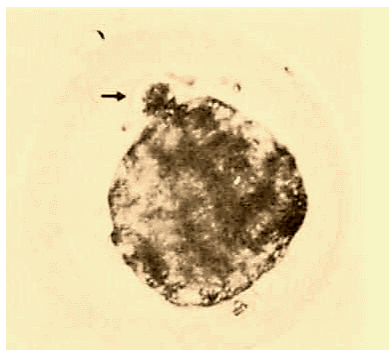


Рисунок 46

Поздняя морула (7 д)

- до 5% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- компактизация закончена
- межклеточные связи хорошие;
- бластомеры одинаковые по величине и тургору;
- четкие клеточные границы.

Эмбрион хорошего качества



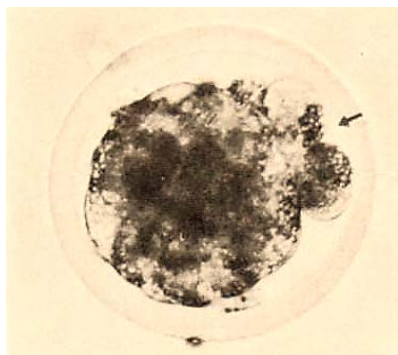


Рисунок 47

Поздняя морула (7 д)

- около 10% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- компактизация закончена;
- бластомеры одинаковые по величине и тургору
- меткие клеточные границы.

Эмбрион хорошего качества



Рисунок 48

Поздняя морула (7 д)

- около 15% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- компактизация закончена;
- бластомеры одинаковые по величине и тургору;
- четкие клеточные границы.

Эмбрион хорошего качества

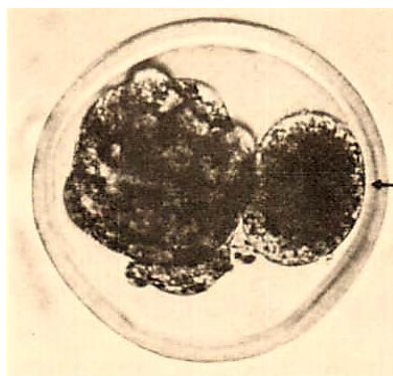


Рисунок 49

Поздняя морула (7 д)

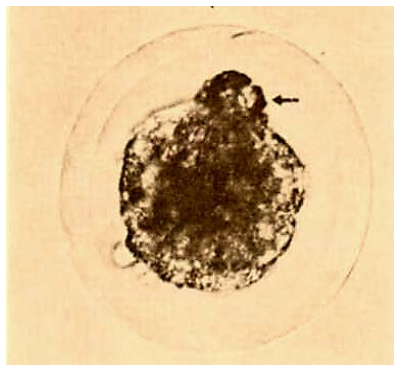
- около 30% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- компактизация закончена, бластомеры одинаковые по величине и тургору;
- четкие клеточные границы.

**Эмбрион удовл. качества,
пригодный для
трансплантации**

Рисунок 50

Поздняя морула (7 д)

- до 5% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- компактизация закончена
- межклеточные связи хорошие;
- бластомеры одинаковые по величине и тургору
- четкие клеточные границы.

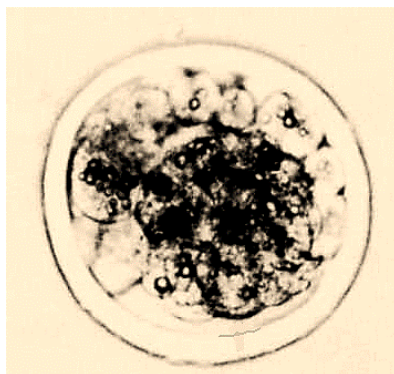


**Эмбрион хорошего качества,
пригодный для
трансплантации**

Рисунок 51a

Поздняя морула (7 д)

- около 50% дефектных бластомеров;
- бластомеры разного размера;
- компактизация закончена
- клеточные границы отчетливы.

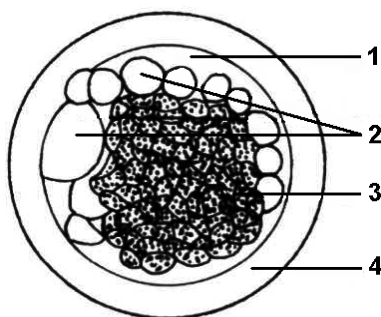


**Эмбрион удовлетворительного
качества, пригодный для
трансплантации**

Рисунок 51б

Поздняя морула (7 д)

1. Перивителлиновое пространство;
2. Экстра-эмбриональный клеточный материал;
3. Бластомеры;
4. Зона пеллюцида;



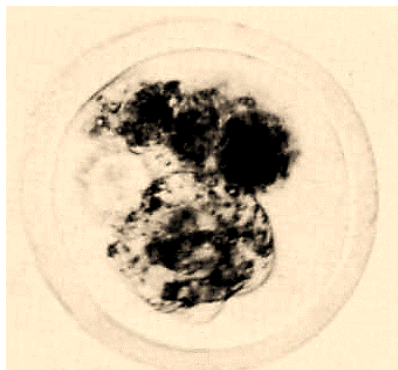


Рисунок 52
Поздняя морула (7 д)

- около 75% дефектных бластомеров разного размера;
- компактизация закончена;
- межклеточные связи хорошие.

Эмбрион
удовлетворительного
качества, условно годный для
трансплантации.

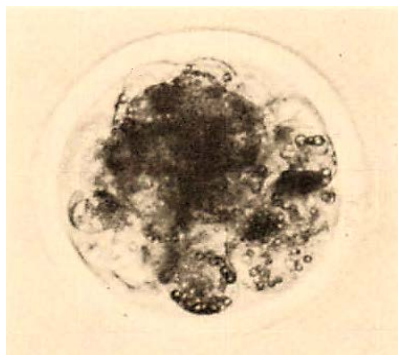


Рисунок 53
Поздняя морула (7 д)

- около 75% дефектных бластомеров разного размера;
- компактизация закончена.

Эмбрион
удовлетворительного
качества, условно годный для
трансплантации

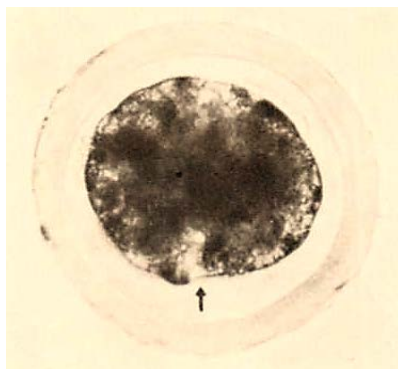


Рисунок 54
Поздняя морула (7 д)

Непосредственно после насыщения глицерином

- восстановление бластополости (указано стрелкой).

Эмбрион отличного качества,
Пригодный для
криоконсервации

Рисунок 55
Поздняя морула
(7 д)

Через 2 часа после насыщения
 глицерином

- около 50% поврежденных,
 частично литических
 бластомеров /1/;
- дезинтеграция клеточных
 связей в области поврежденных
 бластомеров;
- разрыв зоны пеллюциды /2/.

**Эмбрион непригоден для
 криоконсервации**

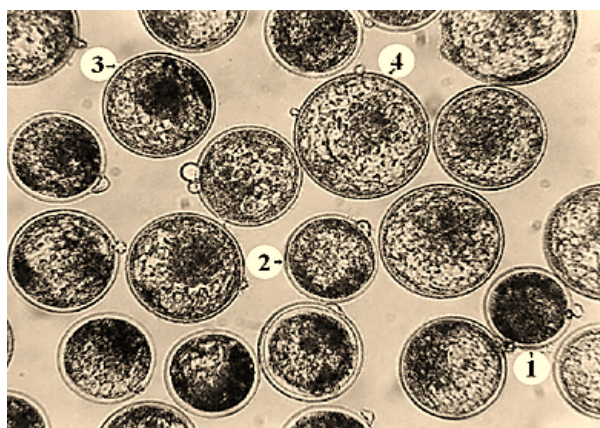
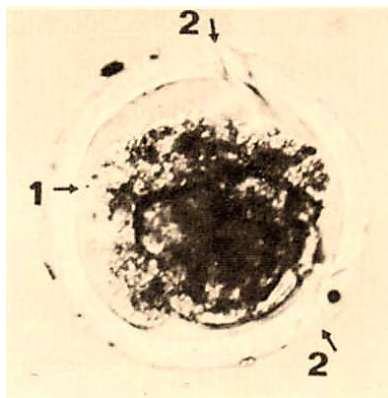


Рисунок 55а
8 день
**Эмбрионы на разных стадиях
 развития**

1. Поздняя морула;
2. Ранняя бластоциста
3. Поздняя бластоциста
4. Экспандированная бластоциста

7.5.7д БЛАСТОЦИСТЫ



Рисунок 56а

Ранняя бластоциста (7 д)

- образование трофобласта по периферии крайних бластомеров;
- возникновение blastocoel (указано стрелкой);
- perivitelline space свободно от отдельных бластомеров, плазмы и других включений.

Эмбрион отличного качества

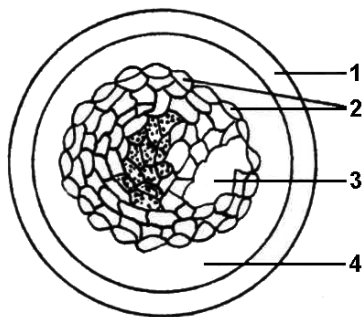


Рисунок 56б

Схема ранней бластоцисты (7 д)

1. Зона пеллюцида;
2. Клетки трофобласта;
3. Blastocoel;
4. Перивителлиновое пространство.

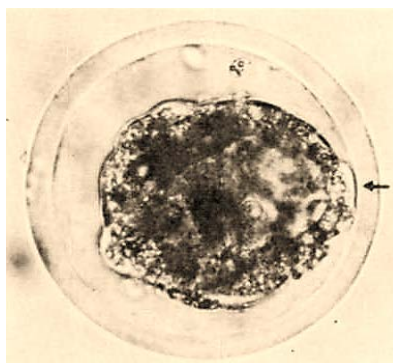


Рисунок 57

Ранняя бластоциста (7 д)

- хорошие межклеточные связи;
- образование трофобласта и blastocoel (указано стрелкой);
- blastomeres одинаковые по величине и тургору;
- perivitelline space свободно от включений.

Эмбрион отличного качества

Рисунок 58

Ранняя бластоциста (7 д)

- около 50% дефектных бластомеров разного размера, наблюдается перетяжка (указано стрелкой).

Эмбрион удовлетворительного качества, пригодный для трансплантации

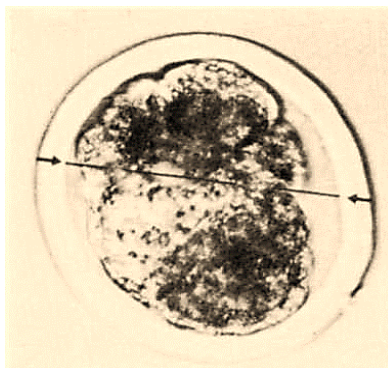


Рисунок 59

Ранняя бластоциста

(7 д)

- около 50% дефектных бластомеров разного размера, наблюдается перетяжка (указано стрелкой);

- трофобласт хороший.

Эмбрион удовлетворительного качества, пригодный для трансплантации

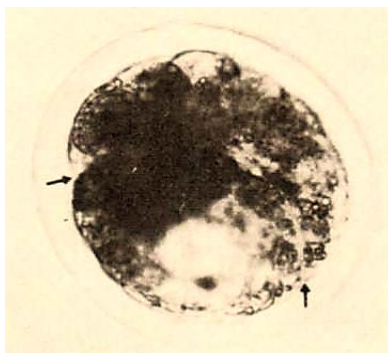
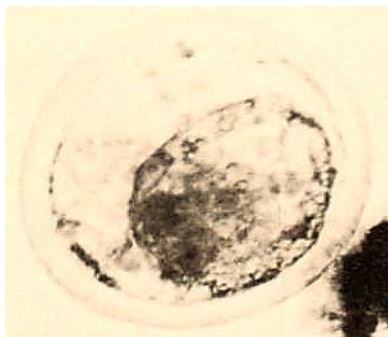


Рисунок 60

Ранняя бластоциста (7 д)

- около 50% дефектных бластомеров;
- плазма в перивителлиновом пространстве, эмбриобласт локализован, расплывчатый;
- трофобласт нормальный.

Эмбрион удовлетворительного качества, пригодный для трансплантации



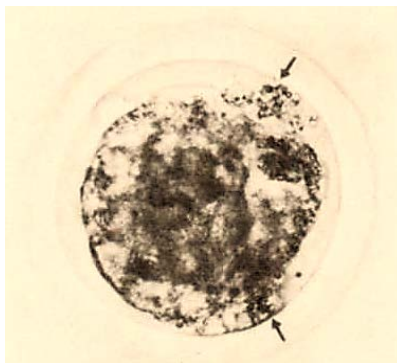


Рисунок 61

Ранняя бластоциста (8 д)

- около 5% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- межклеточные связи хорошие;
- бластомеры одинаковые по величине и тургору;
- клеточные границы отчетливы.

Эмбрион хорошего качества

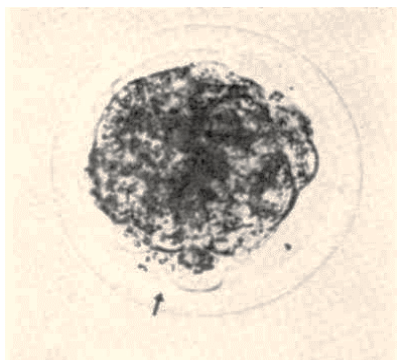


Рисунок 62а

**Ранняя бластоциста
(7 д)**

Непосредственно после насыщения глицерином

- цитоплазма спадает;
- около 10% поврежденных бластомеров (указано стрелкой).

Эмбрион хорошего качества

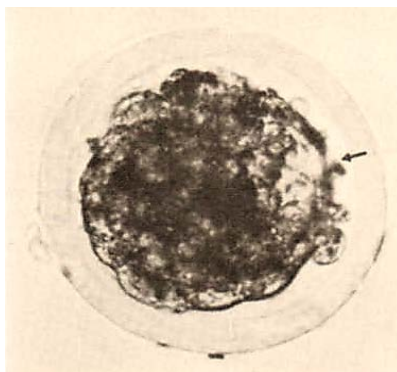


Рисунок 62б

**Ранняя бластоциста
(7 д)**

Через 2 часа после насыщения глицерином

- увеличение бластополости (указано стрелкой).

**Эмбрион отличного качества,
пригодный для
криоконсервации**

Рисунок 63

Ранняя бластоциста (7 д)

Через 1 час после насыщения
глицерином

- около 50% поврежденных
бластомеров;
- лизис мембраны бластомеров
/1/;
- Разрыв зоны пеллюцида /2/.

**Эмбрион не пригоден для
дальнейшей криоконсервации**

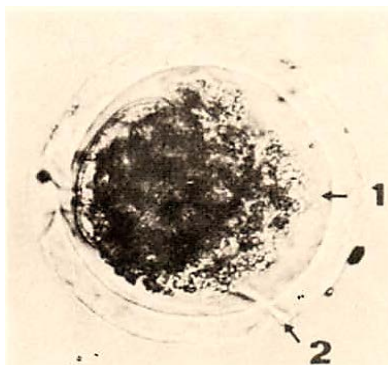


Рисунок 64

Ранняя бластоциста (7 д)

Через 2 часа после насыщения
глицерином

- полная дезинтеграция
клеточных связей;
- грануляции в цитоплазме;
- лизис бластомеров.

**Эмбрион не пригоден к
дальнейшей криоконсервации**

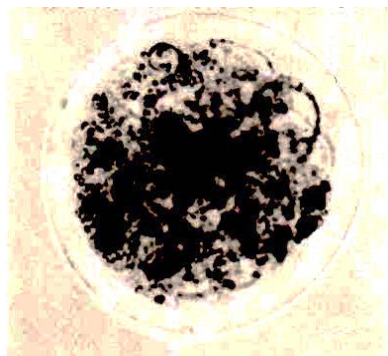


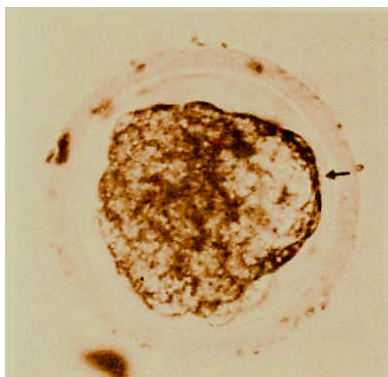
Рисунок 65

Ранняя бластоциста (7 д)

Через 1 час после насыщения
глицерином

- бластополость начинает
увеличиваться (указано
стрелкой).

Эмбрион отличного качества



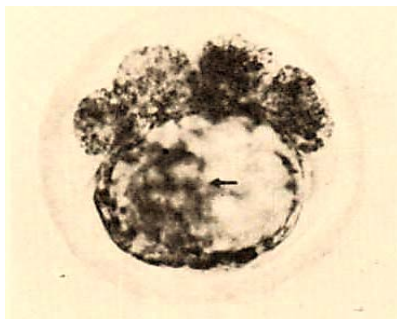


Рисунок 66
Поздняя бластоциста (7 д)

- около 50% дефектных бластомеров;
- эмбриобласт отчетливо выражен (указано стрелкой);
- бластополость увеличивается;

Эмбрион
удовлетворительного
качества

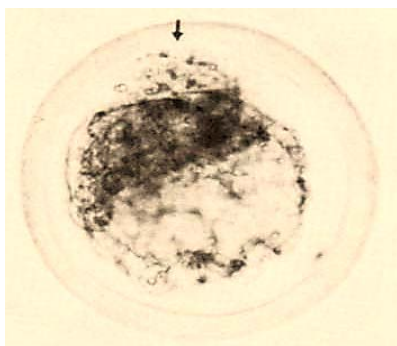


Рисунок 67
Поздняя бластоциста (7 д)

- около 15% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- эмбриобласт локализованный, отчетливо отграниченный;
- трофобласт неправильной формы;

Эмбрион
удовлетворительного
качества

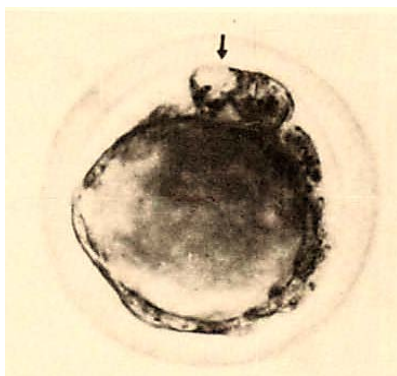


Рисунок 68
Поздняя бластоциста (7 д)

- около 10% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- эмбриобласт локализован, расплывчатый, нечеткий;
- трофобласт хорошо выражен;
- бластополость увеличивается;

Эмбрион
удовлетворительного
качества

Рисунок 69

Поздняя бластоциста (7 д)

- образование трофобласта;
- бластополость увеличена;
- перивителлиновое пространство еще заметно и свободно от отдельных бластомеров, плазмы и других включений.

Эмбрион отличного качества, пригодный для трансплантации

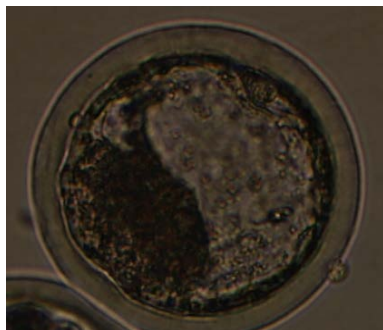


Рисунок 70а

Экспандированная бластоциста (7-8 д)

- эмбриобласт локализован (указано стрелкой);
- трофобласт равномерный;
- исчезновение перивителлинового пространства (вследствие расширения бластополости).

Эмбрион отличного качества, пригодный для трансплантации

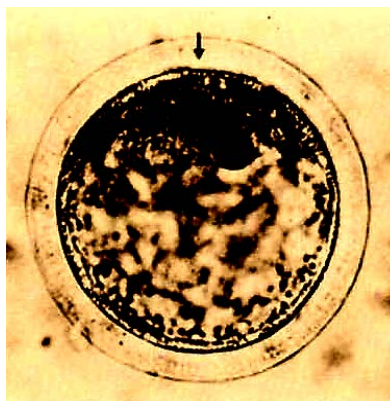
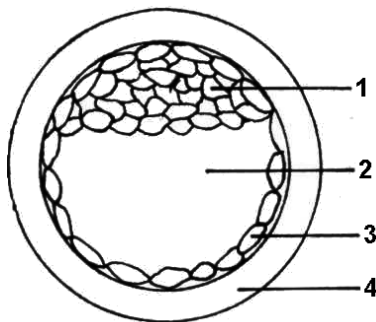


Рисунок 70б

Схема экспандированной бластоцисты (7-8 д)

1. Клетки эмбриобласта;
2. Бластополость;
3. Клетки трофобласта;
4. Зона пеллюцида;



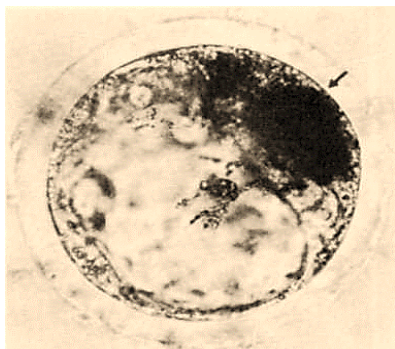


Рисунок 71
Экспандированная
бластоциста (7 д)

- около 25% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- трофобласт правильной формы;

Эмбрион
удовлетворительного
качества

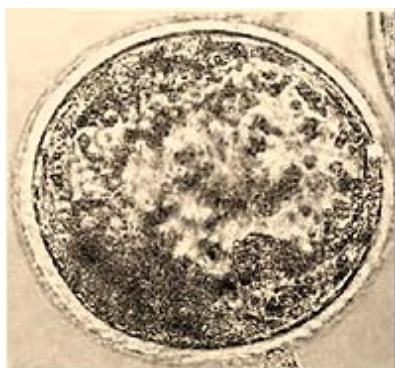


Рисунок 72
Экспандированная
бластоциста (8 д)

- эмбриобласт локализован и отчетливо отграничен.

Эмбрион отличного качества,
пригодный для
трансплантации

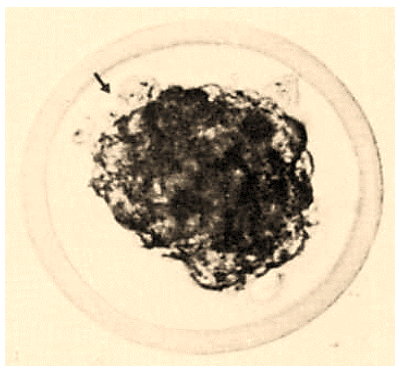


Рисунок 73
Экспандированная
бластоциста
(7 д)

Непосредственно после
насыщения глицерином

- спадается клеточный материал;
- около 10% поврежденных бластомеров (указано стрелкой).

Эмбрион хорошего качества

Рисунок 74а
полностью экспандированная
бластоциста (7-8 д)

- эмбриобласт имеет четкие границы (указано стрелкой);
- расширение и истончение зоны пеллюцида;
- максимально увеличена бластополость;
- трофобласт правильной формы, равномерный.

Эмбрион хорошего качества



Рисунок 74б
схема полностью
экспандированной
бластоцисты (7-8 д)

1. Клетки трофобласта;
2. Клетки эмбриобласта;
3. Бластополость;
4. Зона пеллюцида.

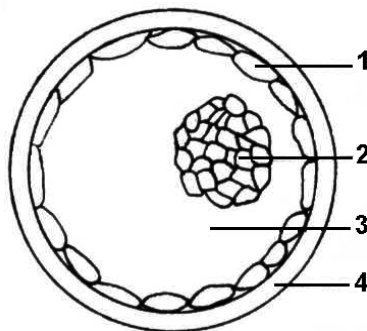
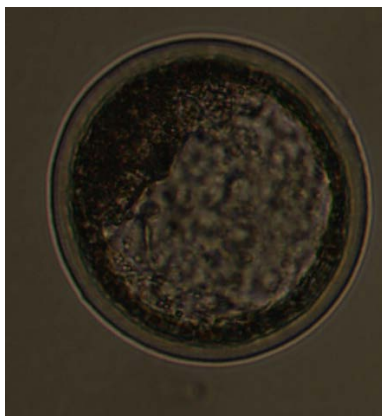


Рисунок 75
экспандированная
бластоциста
(8 д)

- эмбриобласт локализован и отчетливо ограничен.

Эмбрион отличного качества,
пригодный для
трансплантации



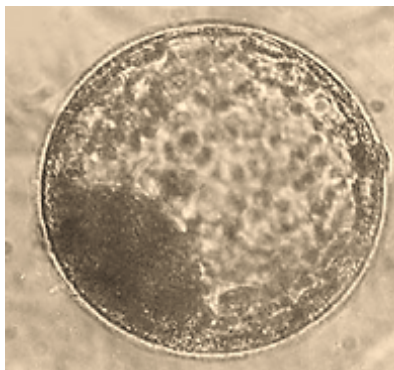


Рисунок 76
Полностью экспандированная
бластоциста (8 д)

- эмбриобласт локализован и отчетливо отграничен.
- Эмбрион отличного качества, пригодный для трансплантации.**

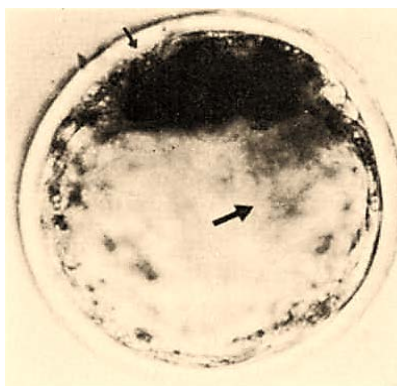


Рисунок 77
Экспандированная
бластоциста (8 д)

- около 25% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
- эмбриобласт локализован, расплывчатый (указано стрелкой);
- трофобласт правильный.

Эмбрион удовл. качества

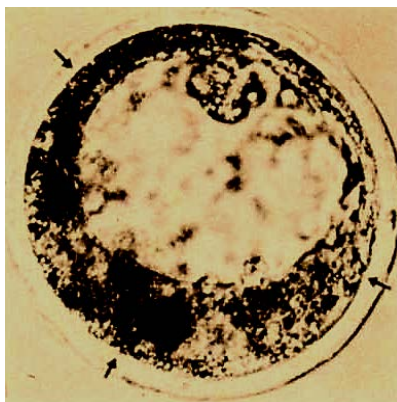


Рисунок 78
Экспандированная
бластоциста (8 д)

- около 50% дефектных бластомеров;
- зона пеллюцида расширена;
- эмбриобласт неправильной формы;
- трофобласт неправильно сформированный.

Эмбрион удовл. качества

Рисунок 79
Полностью экспандированная
бластоциста (8 д)

- около 10% дефектных бластомеров (указано стрелкой);
 - эмбриобласт отчетливо ограничен;
 - трофобласт правильной формы;
 - клеточные границы отчетливы.
- Эмбрион хорошего качества**

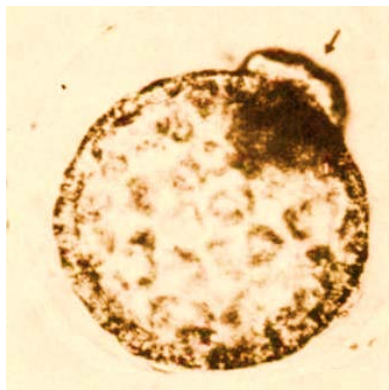


Рисунок 80
Полностью экспандированная
бластоциста (8 д)
 (в спавшемся состоянии)

- зона пеллюцида расширена;
 - бластомеры одинаковы по величине;
 - клеточные границы отчетливы.
- Эмбрион удовлетворительного качества, условно пригодный для трансплантации**

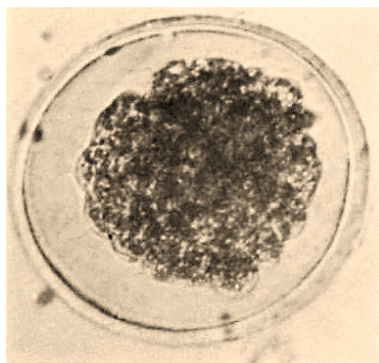
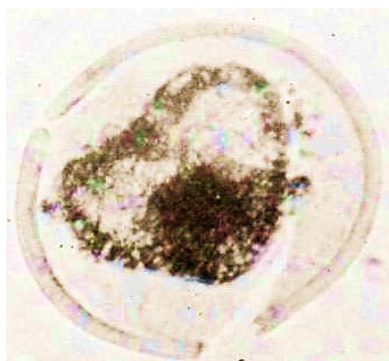


Рисунок 81
Экспандированная
бластоциста (8 д)

- начинает спадать клеточный материал;
- эмбриобласт локализован, ослабление клеточных связей в области трофобласта;
- трещины в зоне пеллюцида, клеточные границы не отчетливы.

Эмбрион
неудовлетворительного
качества



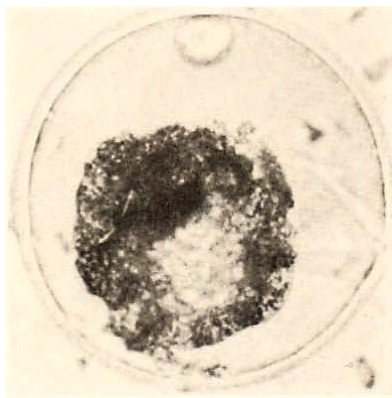


Рисунок 82
Экспандированная
бластоциста (8 д)

- произошло сжатие клеточного материала, общее состояние не удовлетворительное, трещина в зоне пеллюцида, ослабление клеточных связей;
- клеточные границы не отчетливы.

Эмбрион неудовл. качества

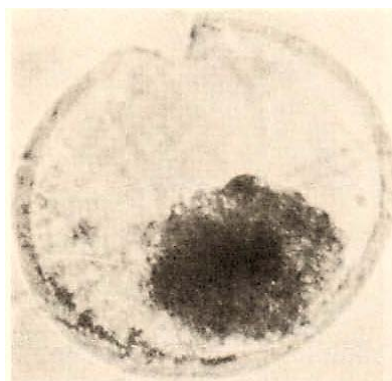


Рисунок 83
Полностью экспандированная
бластоциста (8 д)

- полностью спавшийся клеточный материал;
- трещина в зоне пеллюцида;
- лизис бластомеров;
- плазма в перивителлиновом пространстве.

Эмбрион неудовл. качества



Рисунок 84
Бластоциста выходящая из
зоны пеллюцида (8 д)

- эмбриобласт отчетливо выделяется;
- трофобласт правильной формы;
- клеточные связи хорошие;

Эмбрион отличного качества,
но в таком состоянии условно
годен

Рисунок 85а

**Бластоциста выходящая из
зоны пеллюцида (8-9 д)**

- эмбриобласт четко ограничен (указано стрелкой);
- трофобласт правильной формы, равномерный.

**Эмбрион отличного качества,
но на такой стадии для
трансплантации годен условно**

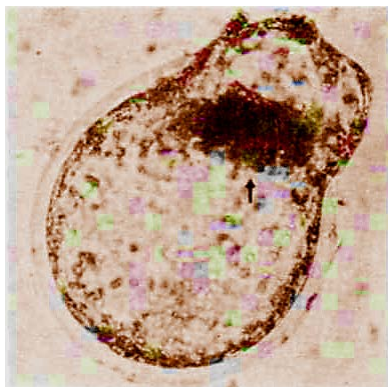


Рисунок 85б

**Схема бластоцисты
выходящей из зоны
пеллюцида (8-9 д)**

1. Клетки эмбриобласта;
2. Бластополость;
3. Клетки трофобласта;
4. Зона пеллюцида;

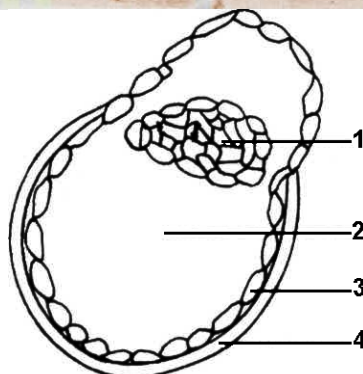
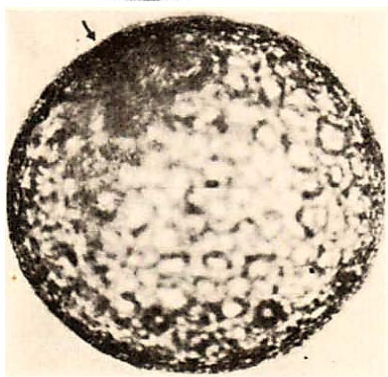


Рисунок 86а

**Бластоциста вышедшая из
зоны пеллюцида (9-10 д)**

- эмбриобласт локализован (указано стрелкой);
- трофобласт равномерный;
- границы бластоцисты отчетливо выражены.

**Эмбрион отличного качества,
но на такой стадии для
трансплантации годен
условно.**



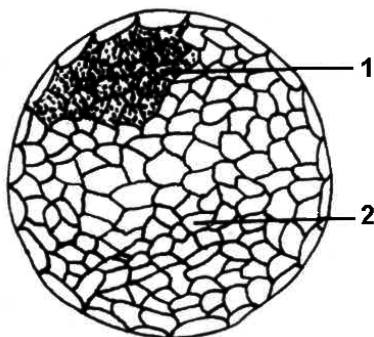


Рисунок 86б
Схема экспандированной
бластоцисты, вышедшей из
зоны пеллюцида
(9-10 д)

1. Клетки эмбриобласта;
2. Клетки трофобласта;

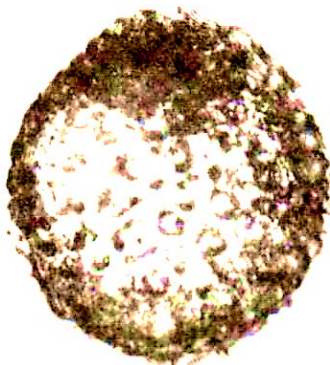


Рисунок 87
Бластоциста вышедшая из
зоны пеллюцида (9 д)

- эмбриобласт отчетливо отграничен;
- легкое сморщивание клеток трофобласта.

Эмбрион отличного качества,
но в таком состоянии для
трансплантации годен
условно

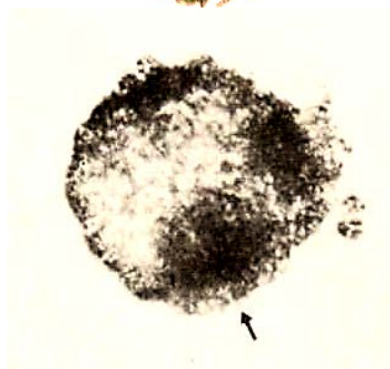


Рисунок 88
Бластоциста вышедшая из
зоны пеллюцида (8 д)

- клеточный материал спадает;
- эмбриобласт локализован (указано стрелкой);
- ослабление клеточных связей.

Эмбрион
неудовлетворительного
качества, не пригодный для
трансплантации.

Рисунок 89
Бластоциста вышедшая из
зоны пеллюцида
(10-11 д)

- эмбриобласт четко ограничен (указано стрелкой);
- трофобласт правильной формы, равномерный;
- диаметр около 1000 мкм (1 мм.);

Эмбрион условно годен для трансплантации

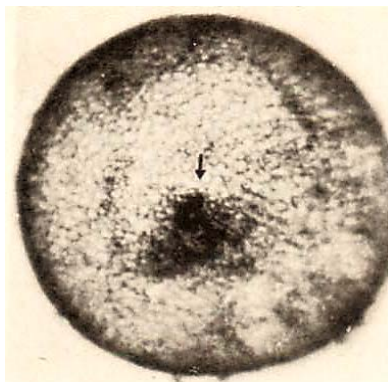


Рисунок 90а
Растущая бластоциста
(11-13 д)

- начинается вытягивание
- содержит около 5000 бластомеров;
- эмбриобласт имеет четкие границы (указано стрелкой);
- трофобласт правильной формы, равномерный;
- длина около 3000 мкм (3 мм)



Рисунок 90б
Схема растущей бластоцисты,
(11-13 д)

1. Клетки эмбриобласта;
2. Клетки трофобласта;

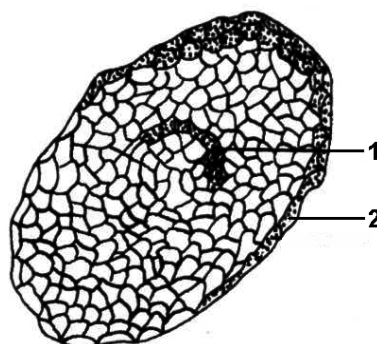




Рисунок 91
Растущая бластоциста
(14 д)

- Фрагментация трофобласта;
- общая длина 30 мм,
диаметр 1,5 мм.

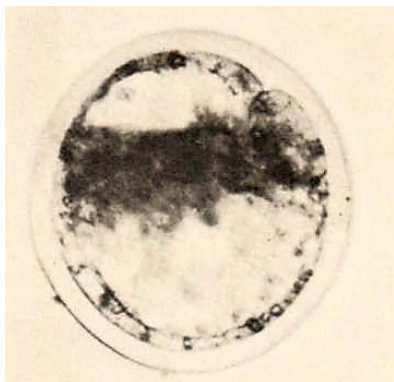


Рисунок 92
Атипичная бластоциста(7 д)

- эмбриобласт локализован, расплывчатый;
- атипичный трофобласт
- образовалась двойная бластополость.

**Эмбрион хорошего качества,
пригодный для
трансплантации**

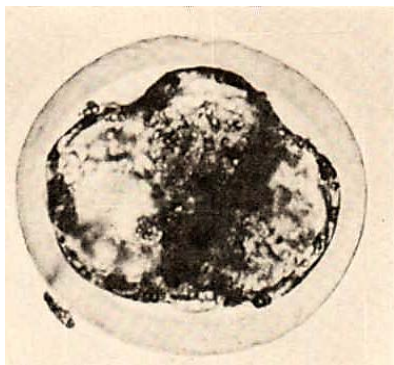


Рисунок 93
Атипичная бластоциста(7 д)

- неправильно сформированный эмбриобласт;
- атипичный трофобласт;
- образовалась двойная бластополость.

**Эмбрион хорошего качества,
пригодный для
трансплантации**

Рисунок 94
Атипичная бластоциста
(7 д)

- эмбриобласт неправильной формы;
- неправильно образованная бластополость /1/;
- многослойный трофобласт.

**Эмбрион хорошего качества,
 пригодный для
 трансплантации**

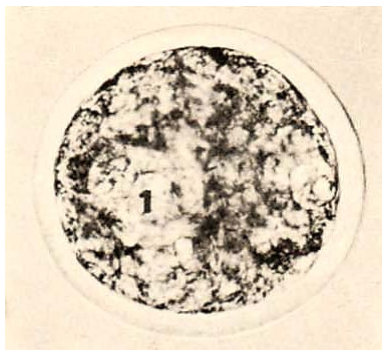


Рисунок 95
Полностью экспандированная
бластоциста /1/, рядом с
бластоцистой вышедшей из
зоны пеллюцида /2/ (7-10 д)

- эмбриобласт локализован и имеет четкие границы (указаны стрелкой 1 и 2).

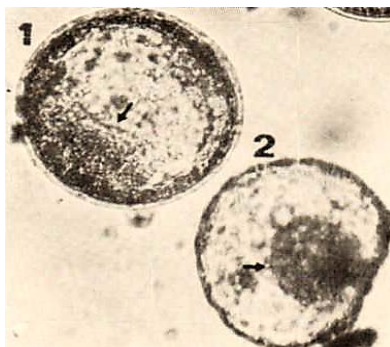
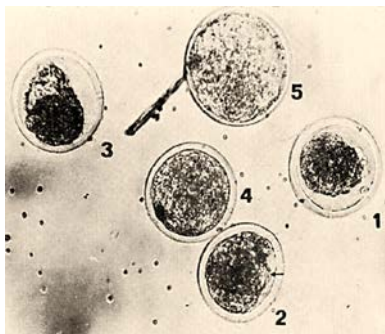


Рисунок - 96
Эмбрионы на разных стадиях
развития(8 д)

1. Поздняя морула;
2. Ранняя бластоциста;
3. Поздняя бластоциста;
4. Полностью;
экспандированная бластоциста
5. Полностью
экспандированная бластоциста.



ГЛАВА 8. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ

Замораживание и оттаивание живых клеток представляет собой комплексный физико-химический процесс, регулируемый тепло- и водообменом между клеткой и окружающей ее средой, в течение которого жидкая фаза биообъектов переходит в твердую и наоборот /327, 333/.

Жизнеспособность клеток при охлаждении и замораживании зависит от ряда факторов, таких, например, как скорость охлаждения, поверхностно-объемное отношение, проницаемость клеточных мембран, температурные коэффициенты проницаемости /212, 237, 274/.

Для более полного понимания механизма замораживания и оттаивания эмбрионов остановимся на некоторых термодинамических процессах, происходящих в клетке в этот период.

Известно, что только 20% клеточной субстанции находится в твердом состоянии, все остальные клеточные компоненты находятся в водном растворе, находящемся в равновесии с окружающей средой. Поэтому, если обыкновенная вода замерзает при 0°C, то присутствие в клеточной субстанции ионов растворенных в ней солей, при отрицательных температурах близких к 0°C, понижает точку замерзания, т.е. раствор охлаждается ниже точки своего замерзания без образования льда.

При дальнейшем охлаждении происходит спонтанное образование центров кристаллизации, сопровождающееся нарастанием фронта кристаллизации и резким повышением температуры, поскольку изменение агрегатического состояния меняет накопленную между частичками клетки тепловую энергию, которая в зависимости от образования кристаллов или их оттаивания соответственно отдается или поглощается /200/.

При образовании кристаллов часть воды вымораживается, а концентрация веществ в растворе повышается, что ведет к дестабилизации осмотического равновесия. На эти изменения

клетка отвечает осмотической реакцией, т.е. отдачей воды в экзоцеллюлярную среду для выравнивания осмоса с последующим образованием интроцеллюлярного льда /199, 197/. Однако, с отдачей клеткой воды во внешнюю среду, повышается концентрация солей в самой клетке, и поэтому, от того, с какой скоростью клетка отдает или поглощает воду, во многом зависит сохранность клеточных структур и даже самой клетки во время криоконсервации /235/.

Медленное охлаждение дает клеткам возможность довольно быстро отдавать воду и таким образом поддерживать осмотическое равновесие. Но следует отметить тот факт, что при слишком низкой скорости охлаждения клетка теряет воду чрезвычайно быстро. При этом во внеклеточной среде образуются кристаллы, а эмбрион по причине длительного нахождения в растворе с повышенной концентрацией веществ обезвоживается, что служит причиной повреждения внутриклеточных структур и гибели эмбриона.

При слишком высокой скорости охлаждения, наоборот, вода не успевает своевременно уходить из клетки, и кристаллы образуются уже в клетке, что также приводит к ее гибели /213/.

Таким образом, как слишком медленное, так и слишком быстрое охлаждение служит причиной гибели зародышей. В первом случае – из-за обезвоживания, во втором – из-за внутриклеточного образования льда /211, 358/.

Для исключения невосстановимых криоповреждений и гибели клеток необходимо концентрационные и температурные изменения отрегулировать на осмотическое равновесие эмбриона.

Отрицательное влияние рассмотренных выше факторов при криоконсервировании клеток можно снизить путем применения криопротекторов и оптимальной скорости охлаждения. Однако, криопротекторы, хотя и обладают свойством предохранения клеток и тканей от возможных негативных воздействий при замораживании и оттаивании, могут и сами повреждать клетки эмбриона посредством осмотических изменений /270/.

Клетки, помещенные в среду, не имеющую проникающих криофилактиков в повышенной концентрации и не проникающих в нейтральной концентрации, реагируют на повышение осмолярности. Реакция, заключающаяся в изменении объема клеток и цитоплазматической воды, зависит от пропускной способности клеток для воды и криопротекторов, температуры и времени /157, 194/. При этом возможны следующие варианты:

1. Мембраны клеток не в состоянии пропустить криопротектор, в результате клетка сжимается до осмотического равновесия;

2. Пропускная способность мембран для воды выше, чем для криофилактика. В этом случае клетка сжимается до определенной величины с последующим набуханием до осмотического равновесия ;

3. Одинаковая пропускная способность для воды и криопротектора. В данном случае клеточная масса несколько увеличивается;

4. Пропускная способность для криопротектора выше, чем для воды, в результате чего клетка увеличивается до максимума с последующим уменьшением до новой величины осмотического равновесия.

Таким образом, во всех случаях, кроме первого, эндоцеллюлярная и экзоцеллюлярная концентрация криопротектора с течением времени достигает осмотического равновесия, а объем клеточной массы, из-за наличия в клетке проникающего криопротектора, становится больше /272/.

Достижение эмбрионом первоначального объема говорит об окончании химической эквilibрации, которая по данным некоторых исследователей /183, 185/ должна составлять 10...15 мин. При недостаточном насыщении клеток криопротектором эмбрионы во время замораживания могут получить криоповреждения, связанные с недостатком криозащиты.

По характеру действия различают два типа криопротекторов: проникающие и непроникающие в клетку. К первой группе относятся глицерин, диметилсульфоксид

(ДМСО), пропандиол, этиленгликоль. Для этих криопротекторов характерны высокая растворимость при больших концентрациях, а низкая молекулярная масса обуславливает их проникновение в клетку. Ко второй группе относятся сахароза, глюкоза, поливинилпирролидон и другие сахара, высокая молекулярная масса которых не позволяет им проникать в клетку.

Проникающие в клетку криопротекторы могут подразделяться в зависимости от типа клеток и состава окружающей среды на структурирующие и деструктурирующие воду, что способствует проникновению криофилактиков в клетку. Защитное действие криопротектора начинается только после его полного проникновения в клетку в мультимолярной концентрации и химической эквilibрации /182, 201/.

Эмбрион представляет собой клеточное соединение отдельных бластомеров, окруженных блестящей оболочкой (зоной пеллюцида), которая выполняет защитную роль.

Проникающие криопротекторы проходят через зону пеллюцида в периветелиновое пространство. Одновременно вода начинает выходить из клетки во внеклеточное пространство до тех пор, пока между клеткой и внеклеточной средой не устанавливается осмотическое равновесие. Следовательно, глицерин способствует обезвоживанию эмбриональных клеток, замещая в них воду и восстанавливая тем самым их изотонический объем.

Mazur P. et al. /212, 213/ рассчитали, что для эмбрионов, которые теряют 90% первоначального объема воды до достижения температурной зоны образования льда, вероятность повреждения клеточных структур в связи с образованием эндоцеллюлярных кристаллов очень низка, тогда как тридцатипроцентный остаток первоначального объема воды приводит к внутриклеточному замерзанию. Кроме этого растворы криофилактиков (глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), понижая точку замерзания криозащитной среды и тем самым, повышая ее вязкость, влияют на кристаллообразование: задерживают начало кристаллообразования, замедляют рост

кристаллов, способствуют стекловидному замерзанию даже при медленном охлаждении /183/.

Однако, как установили Niemann H. et. al. /224/, Rall W. /234, 235/ длительное воздействие высокой концентрации криопротектора, оказывает на эмбрион высокотоксичное действие. Необходимо также отметить, что эмбрионы разных видов животных на разных стадиях развития имеют различные криосвойства. Так, Whittigham D. /268, 269/ в своих исследованиях установил, что для криоконсервации морул и ранних бластоцист лучше всего использовать 1,5М раствор ДМСО на фосфатно-буферном растворе Дюльбекко или 1,0...1,4М раствор глицерина. Однако, по данным Bilton R. /126/ хотя 1,0М глицерин и 1,5М ДМСО обладают почти одинаковым криозащитным свойством, ДМСО является более токсичным для клеток.

Как правило, для замораживания 7...8 дневных эмбрионов крупного рогатого скота общепринятым криопротектором является глицерин, приготовленный на фосфатно-буферном солевом растворе с добавлением 20% фетальной сыворотки крови теленка.

Однако его существенным недостатком являются большие затраты времени, которые слагаются из времени на многоступенчатое насыщение эмбриона криопротектором, выдержке после сидинга, времени охлаждения до -350С, что в общей сложности составляет от 1,5...2 до 3 часов. При этом необходимо учитывать и время, необходимое на оттаивание эмбриона и выведение из него криопротектора, потому что аналогично насыщению удаление криопротектора также необходимо проводить многоступенчато, поскольку быстрое, неконтролируемое насыщение клеток водой вызывает их шок, вызванный разрывом бластомеров и лизисом клеток.

Whittinham D.G., et. al. /269/ предлагал заменить постепенное удаление криопротектора на введение в клетку изотонической среды малыми порциями в короткие промежутки времени. Однако и этот способ требует дополнительных затрат

времени (трех-пяти ступенчатая проводка с 5...10 мин. эквilibрации в каждом растворе).

В связи с этим исследования последних лет были направлены на поиски методов, ускоряющих и упрощающих процесс замораживания зародышей, а также повышающих их выживаемость. Результаты исследований позволили разработать способ одноступенчатого насыщения эмбрионов криопротектором, что значительно упростило и ускорило процесс криоконсервирования при высоком (60%) уровне приживляемости /146/.

Данные исследования были подтверждены последующими работами. Так, Niemann H. et. al. /224/, помещал эмбрионы непосредственно в конечную концентрацию глицерина (1,4М). После оттаивания доля морфологически интактных эмбрионов составила в опытной группе 95,3% без существенных различий между стадиями. В контроле этот показатель составил 83%. При этом количество бластоцист хорошего качества было намного выше количества качественных морул (89% против 68,9% при $P > 0,05$). Доля эмбрионов с повреждением зоны пеллюцида в опытной группе составляла 26,6% по отношению к 13,2% в контроле. Зародышей с выделенными blastomeres было примерно одинаковое количество. Уровень стельности во второй группе составил 40,5% по сравнению с 51% в опыте. Высокий процент стельности был получен и при пересадке эмбрионов с поврежденной зоной пеллюцида: в обеих группах он составил 66,7%. Аналогичные результаты были получены после пересадки эмбрионов с выделенными blastomeres (52,9%).

Таким образом одноступенчатый метод насыщения эмбрионов криопротектором также позволяет получать достаточно высокие результаты.

Криопротекторы, не обладающие способностью проникать в клетки, являются высокополимерными углеводами и выполняют защитную роль в экстрацеллюлярной фазе в минимальной концентрации 0,01-0,2 М, что обеспечивает их низкую токсичность. Одним из таких криопротекторов является сахароза, которая в определенной концентрации повышает

осмотическое давление в экстрацеллюлярной среде и таким образом влияет на проникновение воды в клетку. Суть этого влияния заключается в том, что с понижением концентрации проникающего криопротектора с одновременным добавлением не проникающей сахарозы на экстрацеллюлярной стороне возникает противодействие, в результате чего во время быстрого удаления криопротектора в средах со сбалансированной концентрацией обоих криопротекторов осмотическая нагрузка на клетку остается более равномерной. Таким образом, удаление криопротектора с помощью сахарозы предотвращает осмотический шок /198,255,258/.

Кроме этого, по данным Borland R. /127/ и Kasai M. /185/, это оказывает положительное влияние на обмен веществ в клетке. С использованием сахарозы был разработан способ одноступенчатого замораживания и оттаивания эмбрионов /219, 202, 206/. В отличие от традиционного метода в пайетту помимо эмбриона с проникающим криопротектором заранее заправляется сахароза в определенной концентрации (1,0-1,5М), которая отделена от криопротектора с обеих сторон столбиком воздуха.

На первых этапах исследований по отработке режимов замораживания и оттаивания с применением сахарозы многие авторы применяли сахарозу в различной концентрации. Так, Leibo S. /201/ использовал изоосмолярную среду, в которой осмотическое давление на поверхность мембраны составляет 0. Эмбрионы в такой среде с выходом криопротектора сжимаются с последующим набуханием до первоначальной величины. При использовании сахарозы в гипоосмолярной концентрации наблюдалось первоначальное набухание эмбрионов с последующим сжатием. Однако, набухание эмбрионов, по данным Leibo S.P. /199/, не имеет негативного влияния на результаты приживляемости, если оно не превышает в 2,73 раза его первоначального объема.

Renard J.P. et. al. /237/, получили 40%-ю приживляемость эмбрионов в результате одноступенчатого замораживания-оттаивания (One-Step-metod) с применением гипоосмолярной

концентрации сахарозы. В опытах Massip A. et. al. /211/ проводилось одноступенчатое удаление криозащитной среды у эмбрионов, замороженных в 1М глицерине с 0,25 и 0,50 М средой сахарозы. При культивировании *in vitro* жизнеспособность таких эмбрионов составляла 12,5%, что намного ниже по сравнению с эмбрионами, оттаянными в 1М среде сахарозы (60,5%). Niemann H. /224/ в своих исследованиях также установил, что на жизнеспособность эмбрионов, у которых удаление криофилактиков проводилось с сахарозой, влияя ее концентрация, время воздействия и температура.

Рядом авторов /182, 200, 237/ проведены исследования по изучению воздействия объема глицерина и сахарозы внутри пайетты, а также режима оттаивания на приживляемость эмбрионов. Анализ полученных результатов показал, что приживляемость эмбрионов, оттаянных при 25°C в глицериново-сахарозной среде при их соотношении 1/3 : 2/3 и 1 : 1, составила 42,3% и 19,9%, соответственно. Во втором опыте эмбрионы оттаивались при 37°C при соотношении глицерин-сахароза как 1/3 : 2/3 ; 1 : 1 и 1/10 : 9/10. Процент стельности в этом случае составил 52,9%; 20% и 31,3%, соответственно /331/.

Аналогичные исследования проводил и Lange H. /194/, который использовал 0,25М, 0,5М, 0,75М и 0,9М сахарозу. Приживляемость эмбрионов после оттаивания и пересадки составила 48,4%, 50,9%, 44,4% и 35,7%, соответственно.

В 1992 году Voelkel S. et. al. /265/ разработали метод криоконсервирования эмбрионов на основе использования в качестве криопротектора этиленгликоля.

Как было установлено Szell A. et. al. /258/ этиленгликоль для эмбрионов крупного рогатого скота является менее токсичным, чем глицерин, и не так губительно действует на мембраны клеток. При этом он быстро проникает и выводится из клеток, что позволяет проводить пересадку эмбрионов без предварительного выведения криозащитной среды и повторного контроля эмбрионов. Некоторые из авторов сообщают о том, что использование этого криопротектора позволяет получить 60%

приживляемости, что соответствует приживляемости свежих эмбрионов.

Эмбрионы эквilibрируют в течение 10...20 мин. при комнатной температуре в этиленгликоле на основе ФБС, затем совместно со средой для культивирования заправляют в пайетту. При этом эмбрион в этиленгликоле отделяется от культуральной среды двумя пузырьками воздуха. После эквilibрации пайетту помещают в устройство для замораживания с температурой -6°C. Кристаллизацию индуцируют непосредственно после помещения в замораживатель /202/ или через 3 мин. /193/ с последующей 3...5 минутной выдержкой. Охлаждение идет со скоростью 0,3°C/мин. до -33°C и последующим погружением в азот.

Ряд авторов предлагает другие режимы замораживания. Так, Janowitz U. et. al. /203, 184/ предлагают охлаждение эмбрионов проводить со скоростью 0,5°C/мин. до -35,2°C. Leibo S. /201/ начинают замораживание с -7°C при скорости охлаждения 0,6°C до -35°C. Оттаивание пайетт при этом проводится 5...10 сек на воздухе (при комнатной температуре), а затем в водяной бане при 30-38°C в течение 20-25 сек., что соответствует скорости оттаивания примерно 8000 °C/мин.

Выведение криопротектора проводится смешиванием сред путем встряхивания пайетты непосредственно после ее оттаивания.

Voelkel S. /265/ провел ряд опытов по изучению эффективности использования ряда криопротекторов, в результате которых приживляемость эмбрионов, замороженных с использованием этиленгликоля, составила 75%, что значительно превышает результативность эмбрионов, замороженных с применением традиционных криофилятиков (глицерин, ДМСО). Это позволяет сделать вывод о том, что этиленгликоль в связи с его высокой термостабильностью является эффективным средством при замораживании зародышей. Однако есть и другие мнения. Так, Hasler J. et. al. /169/ критически оценивают результаты метода с применением

этиленгликоля. По их мнению, глицерин имеет более щадящее воздействие на эмбрионы коров, чем этиленгликоль. Прежде чем делать такие выводы авторы провели ряд сравнительных исследований с 7-дневными эмбрионами. Время эквilibрации эмбрионов в этиленгликоле варьировало от 10 до 40 мин. при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Программа замораживания начиналась с -6°C , сидинг проводился в тот же момент. После 15 мин. выдержки после сидинга начиналось охлаждение со скоростью $0,6^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до $-32,5^{\circ}\text{C}$. оттаивание проводилось в водяной бане при $36-38^{\circ}\text{C}$ до полного растворения кристаллов. Перед постановкой на культивирование эмбрионы четыре раза отмывались в ФСБ с 10% фетальной сыворотки.

Эмбрионы, криоконсервированные в глицерине, оттаивали при такой же температуре с последующей проводкой в глицерине с сахарозой и отмыванием в ФСБ с 10% фетальной сыворотки.

Культивирование оттаянных эмбрионов (как одних, так и других) проводили в среде B2-BRL в течение 72 часов. Влияние криофилактика на жизнеспособность оценивалось в зависимости от развития морул до стадии бластоцисты и по числу вышедших из зоны пеллюцида экспандированных бластоцист.

Авторы пришли к выводу, что время выдержки в криофилактике и его тип не оказывают негативного влияния на выживаемость и первоначальное развитие в культуральной среде. Однако, было установлено достоверное снижение в развитии морул до бластоцист, замороженных в этиленгликоле – 68%, по сравнению с морулами, замороженными в глицерине – 77% (351/455). При этом авторы отмечают, что эмбрионы, полученные *in vitro*, будут вести себя, по всей видимости, иначе.

Аналогичный опыт был проведен и Looney C. et. al. /206/ на эмбрионах коров, полученных *in vivo*. В первом случае эмбрионы замораживались в 10% глицерине и 1,5М этиленгликоле. Во втором сравнивалась результативность замораживания эмбрионов в 1,5М и 1,35М этиленгликоле с 0,1М раствором сахарозы. В первом эксперименте результаты с

использованием 10% глицерина достоверно ($P < 0,005$) выше результатов с использованием 1,5М этиленгликоля (69,6 и 50%; 57,3 и 43,9%, соответственно). Во втором опыте достоверных различий не отмечено (41,5 и 40% соответственно).

Lange H. /193/, сравнивая два этих метода, отмечает преимущество использования этиленгликоля по следующим параметрам: сравнительно высокая приживляемость (58,6%), экономия до 20 минут времени на каждом эмбрионе, снижение количества оборудования и материалов.

Как говорилось выше, а также показали последующие исследования, эмбрионы, полученные *in vitro*, оказались более чувствительными к охлаждению и замораживанию по сравнению с эмбрионами, полученными *in vivo* /274, 185/.

По данным Leibo S. /202/ ответственны за это липиды, влияющие на чувствительность клетки. Diez O. et. al. /145/ исследовали роль липидов в криоконсервировании эмбрионов, полученных *in vitro*. Они установили, что удаление эндоцеллюлярных липидов из зиготы не повлияло на результаты криоконсервации.

Исследователи под руководством Aoyagi Y. /118/ провели опыты по изучению влияния на эффективность криоконсервирования 7-дневных *in vivo* и *in vitro* полученных эмбрионов насыщенного липидами раствора сывороточного альбумина крупного рогатого скота Альбумакса (Alubumax) TM1 на основе 4%-й среды PCA фракции 5. В качестве криопротекторов использовались 4%-й этиленгликоль и 0,3М сахара. Для определения выживаемости эмбрионы культивировали при 39°C в течение 48 часов в присутствии 5% CO₂. Оценка проводилась по наличию реэксандированных и вышедших из зоны пеллюцида бластоцист. В полученных результатах не было зафиксировано достоверного различия. Хотя установлена четкая тенденция повышения эффективности криоконсервации с использованием Alubumax. Так, из 35 эмбрионов *in vitro*, замороженных с сывороточным альбумином, сохранилось 30, что составило 86%. У эмбрионов *in vivo* была зарегистрирована 100% выживаемость (34 из 34). Количество

бластоцист, вышедших из зоны пеллюцида, в первом случае составило 43%, во втором – 71%.

Эти выводы подтверждаются и вторым опытом: замороженные в этиленгликоле с добавлением Albumaxa эмбрионы были оттаяны и пересажены синхронизированным телкам разного возраста. Так же, как и в первом опыте, достоверных различий отмечено не было (55%-я приживляемость у эмбрионов, полученных *in vitro* и 61%-я у эмбрионов, полученных *in vivo*), хотя прежняя тенденция сохранилась.

Таким образом, несмотря на достаточно обширный материал научных исследований по данной теме, до настоящего времени нет единого мнения о применении этиленгликоля при консервировании эмбрионов крупного рогатого скота, что и определило одно из направлений наших исследований.

Как говорилось выше, при достижении точки замерзания среды она, как правило, замерзает не сразу. Происходит некоторое переохлаждение, обусловленное отсутствием в среде кристаллизационных центров. Лишь при охлаждении на несколько градусов ниже точки замерзания начинается спонтанное образование кристаллов. При этом спонтанная нуклеация (образование центров кристаллизации) будет возникать случайно и зависеть от объема и температуры образца.

По данным Diller K. /146/ фаза переохлаждения, так называемого "суперкулинга", в процессе криоконсервации негативно влияет на выделение воды из клеток, что ведет к образованию кристаллов, губительно действующих на мембраны бластомеров. В переохлажденной до -15°C клетке находится объем воды, равный объему при 0°C . В клетке, находящейся в частично замороженной среде, при такой же температуре воды наполовину меньше /149, 200/. Это связано с тем, что, с одной стороны, фаза переохлаждения сокращает разницу температуры между экстрацеллюлярным и интрацеллюлярным образованием льда, что сокращает время отдачи клеткой воды и сжатия, с другой стороны, с понижением температуры снижается

(изменяется) коэффициент пропускной способности мембран клетки для воды.

В настоящее время все применяемые на практике процедуры замораживания эмбрионов предусматривают введение затравки для индуцирования процесса льдообразования в переохлажденном растворе с эмбрионами. Цель внесения затравки – это выведение переохлажденного раствора с эмбрионами из метастабильного состояния и стимуляция образования льда при контролируемых условиях.

Искусственное индуцирование образования льда за 1-2°C до спонтанной кристаллизации предотвращает переохлаждение экстрацеллюлярной среды до минимума, способствует оптимальному протеканию осмотической реакции и играет важную роль для выживаемости зародышей.

Оптимальное время индуцирования кристаллизации зависит от типа и концентрации криопротектора /329/. В результате многочисленных исследований по определению температуры сидинга Wiladsen S.M. /271/ определил, что индуцирование кристаллизации при минус 0-7,10°C не имеет негативного влияния на выживаемость эмбрионов.

Работы Bilton R., Moore N. /126, 218/, Trounson A. et. al. /263/, а также Willadsen S. /272/ подтвердили мнение о том, что сидинг должен быть проведен как можно ближе к точке спонтанного образования льда в среде для замораживания биообъектов.

Эксперименты Whittingham D. et. al. /269/ показали, что внесение затравки при температурах -5°C или -12°C не вызывает повреждения эмбрионов. Однако, в первом случае из охлажденных в дальнейшем до -1960C эмбрионов выживает значительно большая часть, а во втором – меньшая. Дело в том, что внесение затравки определяет разовый переход раствора из жидкого состояния в твердое, и в первом случае концентрация глицерина (1,5M) резко возрастает до 5M, во втором случае – до 10M. Таким образом, в первом случае создаются условия оптимального обезвоживания клетки, во втором – осмотическое

воздействие будет значительно более жесткое, что обуславливает повреждение клетки при дальнейшем охлаждении.

Одним из важнейших факторов выживаемости эмбрионов, как отмечает Diller K. /146/, является длительность выдержки между индуцированием кристаллизации и началом дальнейшего понижения температуры. Этот период времени способствует эквilibрации клетки, обеспечивает возможность оптимального выделения воды и предотвращает криповреждение клетки. Однако, он не рекомендует чрезмерно длительную эквilibрацию, объясняя это тем, что незамороженная клетка имеет при этом длительный контакт со средой с высокой концентрацией солей. Niemann H. /224/ предлагает время выдержки 5-10 мин.

В результате криоконсервации около 15-20% эмбрионов коров становятся непригодными для трансплантации, а у оставшихся приживляемость после пересадки снижается. Поэтому представляется важным определить факторы, оказывающие наиболее сильное влияние на жизнеспособность замороженно-оттаянных эмбрионов /95, 274/.

Так, Нетеча В. и др. /61/ установили, что эмбрионы отличного и хорошего качества более успешно переносят условия замораживания и оттаивания в отличие от зародышей удовлетворительного качества. Похожие результаты были получены в исследованиях Смысловой Н. и др. /95/, у которых эмбрионы отличного и хорошего качества после оттаивания и пересадки дали 50% приживляемости. Ряд других исследователей /72/ при пересадке хороших и отличных эмбрионов получили 44 и 46% стельностей против 22,6 и 37% при пересадке удовлетворительных и условно пригодных. Адекватные результаты получены Мадисоном В. и др. /54/, которые отмечают необходимость более тщательного отбора эмбрионов по качеству для замораживания. Однако, как отмечают авторы, анализ результатов сохранности эмбрионами своего качества показывает, что эмбрионы отличного качества сохранили оценку "отлично" после оттаивания только в 14,3%

случаев, хорошие – в 22,1%, а удовлетворительные – в 41,4%. Доля эмбрионов отличного качества уменьшалась после оттаивания в 2,2 раза, а число зародышей удовлетворительного качества увеличивалось в 3 раза.

От пересадки эмбрионов отличного качества уровень стельности был в 1,4 раза выше, чем от пересадки эмбрионов удовлетворительного качества.

В центре трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота Всероссийского НИИ животноводства /54/ было заморожено 478 эмбрионов, сохранность которых составила 84%. При замораживании эмбрионов отличного и хорошего качества процент пригодных к пересадке эмбрионов составил 89,6%. Однако, отличные по качеству зародыши сохранили свой статус только в 15,4% случаев, в то время как 60% эмбрионов перешли в разряд хороших, а 19,2% дегенерировали. Заметно лучше переносили пониженные температуры эмбрионы, которые перед заморозкой были оценены как хорошие. Так, из 213 эмбрионов хорошего качества 51,2% сохранили после оттаивания свое качество. Одним из критериев оценки жизнеспособности зародышей является соответствие их возраста той стадии развития, на которой они находились во время извлечения.

В ряде исследований /95/ установлено, что у поздних бластоцист приживляемость была более высокой (41,7%) против 32% у морул и 39% ранних бластоцист. В исследованиях Frim, J. /157/ сохранность поздних бластоцист составила 100%. Ishida T. и др. /182/ отмечают, что более устойчивыми к криоконсервации являются хорошие бластоцисты, 85% которых сохранили свою жизнеспособность и дали 50% стельностей против 38% сохранившихся в хорошем состоянии морул. Мадисон В. и др. /54/ при заморозке ранних бластоцист получили 80,9% сохранности, морул – 77,3%.

Отмечается, что эмбрионы крупного рогатого скота и коз на стадии поздней морулы и ранней бластоцисты более пригодны для криоконсервации, чем экспандированные бластоцисты. После пересадки в первом случае получено 62,5%

стельностей по отношению к 52,9% во втором. В свою очередь, экспандированные бластоцисты на начальной стадии выхода из зоны пеллюцида также показали более высокий уровень сохранности, нежели экспандированные бластоцисты (23,8% против 21,9%). Эмбрионы крупного рогатого скота можно криоконсервировать и на более ранних стадиях развития так же, как и их половинки, помещенные в зону пеллюцида.

В своих более поздних исследованиях Смыслова Н. и др. /160/ указывают на то, что эмбрионы от поздней морулы до поздней бластоцисты одинаково выдерживают глубокое замораживание и стадия их развития не является критическим фактором для приживляемости эмбрионов.

В свою очередь Сергеев Н. и др. /90/, получивший более высокие показатели по сохранности ранних бластоцист, делает предположение о том, что более низкая выживаемость поздних морул объясняется наличием трех-четырёх слоев клеток и плотным межклеточным контактом, что затрудняет проникновение криопротектора и выход воды. Образование бластоцели облегчает протекание обменных процессов и увеличивает криорезистентность эмбрионов на стадии ранней бластоцисты. Однако, с дальнейшим развитием зародыша количество клеток возрастает, межклеточные контакты в эмбриобласте увеличиваются, и транспорт веществ во внутренних слоях замедляется, что требует применения для криоконсервации эмбрионов поздних стадий таких же методов, как для криоконсервации тканевых структур.

Основополагающим фактором, оказывающим самое непосредственное влияние на сохранность и последующую приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов, является криопротектор. Как было сказано выше, криопротекторы можно разделить на две большие группы, проникающие в клетку (ДМСО, глицерин, этиленгликоль) и непроникающие (сахароза и ряд других сахаров).

Сравнительный анализ ДМСО (диметилсульфоксид) и глицерина показал, что при использовании первого у крупного рогатого скота получено 84,6% пригодных к пересадке

зародышей. Криозащитные свойства глицерина оказались менее эффективными. Его использование при криоконсервации увеличивало выход дегенерированных эмбрионов до 39,3%. Эрнст Л., Сергеев Н. /113/ также отмечают тот факт, что для глубокого замораживания эмбрионов наиболее подходящими являются ДМСО и глицерин в концентрациях 1,5 М и 1,0-1,4 М, соответственно.

Однако, дальнейшими исследованиями было установлено, что глицерин является менее токсичным по сравнению с ДМСО.

В опытах Massip A. /211/ семидневные эмбрионы замораживали в 1,5 М растворе ДМСО и 1,37М глицерине. В первом случае среди замороженных 75,9% зародышей сохранили свою жизнеспособность. Их приживляемость после пересадки составила 35%. Во втором случае эти показатели составили 75% и 52,6%, соответственно.

Что касается концентрации глицерина при насыщении эмбрионов, то наиболее эффективными показали себя 1,4 М растворы глицерина на основании фосфатного буфера. Так, при использовании в качестве криопротектора 1,4 М глицерина приживляемость эмбрионов после пересадки составила 40,6%, а при использовании 1,0М – 27,3% /95/. Аналогичные результаты были получены и в исследованиях других авторов /72/, результаты опытов которых показали, что при использовании как одной, так и другой концентрации сохранность оставалась практически одинаковой 95,9 и 95,6%, приживляемость при использовании в качестве криопротектора 1,4М глицерина составила 40,8%, а при использовании 1,0 М раствора этот показатель находился на уровне 37,1%.

Особый интерес при криоконсервации эмбрионов представляет использование сахарозы, которая значительно ускоряет и упрощает подготовку эмбрионов к пересадке, а производительность труда повышает в 2 раза. При этом сохранность эмбрионов остается на высоком уровне.

Так, исследования некоторых авторов /54, 61/ показали, что использование сахарозы в концентрации 0,7М при удалении криопротектора позволяет сохранить жизнеспособность

80,0...87,5% эмбрионов, а приживляемость таких эмбрионов составляет 55,6%.

Самоделкин А. /85/ считает, что применение сахарозы при подготовке эмбрионов к замораживанию и оттаиванию позволяет получить до 87,7% жизнеспособных эмбрионов и повысить их приживляемость до 55,8%.

Использование сахарозы при криоконсервации позволило Niemann H. /224/ увеличить сохранность эмбрионов на 23,3%.

Исследования ряда последних лет направлены на поиск путей, упрощающих процесс криоконсервации и позволяющих сократить время на данный технологический процесс.

Одним из таких путей является поиск и применение новых криозащитных веществ, которые выгодно бы отличались от ДМСО и глицерина. Наиболее перспективным в данном отношении в настоящее время является этиленгликоль, криозащитные свойства которого, как оказалось, близки к таковым глицерина.

Анализ результатов работы по замораживанию эмбрионов с использованием этиленгликоля показал, что, хотя сохранность эмбрионов и была невысокая (68,7%), приживляемость находилась на уровне 55% /85/.

Высокие криозащитные свойства этиленгликоля были отмечены в работе Lange H. /194/, который проводил свои опыты на интактных и демиембрионах. Результативность трансплантации интактных эмбрионов, замороженных в этиленгликоле, составила 58,2% против 48,2% при использовании в качестве криопротектора глицерина. Аналогичные результаты получены и в случае пересадок разделенных эмбрионов – 68,7 и 37,5%, соответственно.

Suzuki T. et. al. /255/ сообщает о рождении 3 телят, полученных после пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов, оплодотворенных и культивированных вне организма. Авторы считают, что значительную роль в этом сыграл примененный в эксперименте криопротектор этиленгликоль в 1,8М концентрации в комплексе с поливинилпирролидоном.

Эмбрионы свиней по неясным пока причинам невозможно криоконсервировать с удовлетворительным результатом.

Таким образом, из выше сказанного следует вывод о высоких криозащитных свойствах этиленгликоля. В дополнение к этому использование этиленгликоля в качестве криопротектора позволяет проводить так называемые прямые пересадки ("direct transfer"), т.е. проводить пересадки эмбрионов реципиенту сразу после оттаивания без предварительного удаления криопротектора и оценки качества зародыша, что является значительным шагом вперед на пути упрощения технологии трансплантации замороженно-оттаянных эмбрионов и приближает ее по простоте исполнения к искусственному осеменению.

Процесс криоконсервации растянут во времени и продолжается в пределах 2,5...3 часов, что создает определенные трудности и неудобства. Поэтому в последние годы исследования многих ученых направлены на поиск путей, способных сократить затраты времени на криоконсервацию. Наиболее перспективный в этом отношении метод витрификации эмбрионов, сущность которого заключается в насыщении зародышей комплексом криопротекторов в высоких концентрациях с последующим кратковременным охлаждением и погружением в жидкий азот. Криоконсервация в таком случае проводится без программных замораживателей и специальных устройств. Этот способ позволяет сократить продолжительность замораживания до нескольких минут.

По оценкам некоторых исследователей /118, 211, 237/, метод витрификации позволяет получить уже на данном этапе разработки достаточно высокие результаты сохранности и приживляемости зародышей – 70-90 и 57,1%, соответственно.

По некоторым данным /146/, постепенное насыщение зародыша криопротектором до концентрации 40% позволяет получить до 66,7% жизнеспособных эмбрионов и при этом сохранить их приживляемость на уровне эмбрионов, замороженно-оттаянных по традиционному методу. В исследованиях Wilmut J. /274/ выживаемость эмбрионов,

замороженных таким образом, составила 86,8%. Данные результаты подтверждаются работами ряда других исследователей /234, 235/, в опытах которых было установлено, что витрификация позволила сохранить жизнеспособность эмбрионов в 70...87% случаев, а их приживляемость после пересадки составляла от 39,1% до 57,1%. Опыты по совершенствованию витрификационных растворов позволили добиться хороших результатов /146, 213/. В своих работах эти авторы использовали для замораживания и оттаивания эмбрионов 0,5М сахарозу и витрификационный раствор. Приживляемость эмбрионов, замороженных по такой методике, составила 44,8%, а в контроле – 53,5%, в другом случае сохранность эмбрионов удалось увеличить до 85,2%, а приживляемость – до 55,1%.

При криоконсервации важным условием сохранения зародышей является подбор оптимального режима замораживания, который бы позволил проводить обезвоживание клеток с наименьшими потерями для самих эмбрионов.

Медленное замораживание зародышей предусматривает и медленное их оттаивание, что способствует медленному проникновению воды в клетку и исключает повреждение мембран клеток вследствие быстрой регидратации (набухания).

Быстрое замораживание требует и быстрого оттаивания, потому что медленное оттаивание таких эмбрионов может вызвать рекристаллизацию и повреждение клеток /213/. Наиболее оптимальная скорость охлаждения для большинства типов клеток составляет 1°C/мин. Однако, оптимальная скорость охлаждения, обеспечивающая оптимальный уровень выживаемости, варьирует как для эмбрионов различных видов животных, так и в зависимости от стадии развития эмбрионов одного и того же вида животного /113/.

Существующие медленный и ускоренный режимы замораживания позволяют получать от 40 до 80% пригодных к пересадке эмбрионов и 30...45% стельностей после пересадки /95, 197, 263/. Согласно исследованиям этих же авторов охлаждение с минус семи до минус двадцати пяти градусов со

скоростью 0,3°C/мин. и искусственной кристаллизации при -7°C было получено 55,6% стельностей. Аналогичные результаты получены в опытах Niemann H. et. al. /224/. При одноступенчатом насыщении эмбрионов 1,4 М глицерином и охлаждении со скоростью 0,3°-0,1°C/мин. до -35°C было сохранено 95,3% эмбрионов, а их приживляемость составила 51%. Некоторые исследователи /259/ охлаждали клетки до -4° С со скоростью 1°C мин. и до -35°C со скоростью 40°C/мин. После пересадки эмбрионов, замороженных по такой схеме, уровень стельности составил 52%. Охлаждение зародышей до -5°C со скоростью 9°C/мин. с последующей эквilibрацией в парах жидкого азота до -11,9°C и последующим охлаждением до -25°C со скоростью 2°C/мин. позволило сохранить только 45,6% зародышей, приживляемость которых составила 40% /211/.

Таким образом, соблюдение правильной технологии замораживания позволяет получить до 90% биологически полноценных эмбрионов, а их приживляемость довести до 50...55%. Однако, в производственных условиях эти правила нередко нарушаются, что приводит к снижению результативности метода.

По некоторым данным известно, что использование криоконсервации в производственных условиях рентабельно только в том случае, когда сохранность зародышей находится на уровне не менее 80%, а процент стельности реципиентов составляет 55-60% /193/.

Lehn-Jensen H. /197/ установил достоверное снижение уровня стельности реципиентов в случае, если время от извлечения до криоконсервации превышало три часа. Инкубация эмбрионов более пяти часов снижала уровень стельности на 33% по сравнению с эмбрионами, пересаженными в течение трех часов. К такому выводу пришли и некоторые другие исследователи /224/, которые отмечают, что с увеличением продолжительности хранения эмбрионов от извлечения до замораживания снижалась их жизнеспособность после оттаивания. Так, наивысший процент стельности реципиентов

был при хранении эмбрионов до замораживания не более 2-х часов. Хранение эмбрионов с 2 до 4 часов снижало их приживляемость до 21,9%. Следовательно, для успешной пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов очень важно замораживать их сразу после извлечения и оценки качества.

Для создания и поддержки определенного режима криоконсервации зародышей в настоящее время разработан и внедрен в практику ряд электронных устройств, обеспечивающих заданный режим охлаждения. Среди таких устройств наибольшее распространение получили такие, как "Планер" (Англия), "Криоцель" (Германия), Миникул-АС-25 (Франция), а также Российского и Украинского УОП-1, УОП-2, ЗЭМ-4и МБИ-К.

Испытания показали достаточную надежность и эффективность данных приборов. Их использование позволяет получать в среднем до 80% жизнеспособных эмбрионов /93, 103/. Сравнительные испытания замораживателей R-204 (Англия), Миникул АС-25 (Франция) и УОП-1 (Украина) не выявило достоверных различий между ними. Так, сохранность эмбрионов находилась на уровне 80...90%, а приживляемость составляла около 46%. Выживаемость эмбрионов при использовании замораживателя "Криоцель" (Германия) находилась в пределах 88...95,5%, а их приживляемость составила 37,5%.

8.1. Влияние различных способов криоконсервирования и деконсервации эмбрионов на их сохранность

Согласно таблице 44 эмбрионы отличного качества при их заморозке с использованием этиленгликоля и оттаивании в растворе сахарозы, сохранили свою жизнеспособность в 100% случаев.

Таблица 45 - Сохранность эмбрионов в зависимости от криопротектора, способа оттаивания и качества эмбрионов

Качество эмбрионов	Криопротектор							
	этиленгликоль				глицерин			
	Способ оттаивания							
	стандартный		с сахарозой		стандартный		с сахарозой	
	оттаяно, п	приг-х, п-%	оттаяно, п	приг-х, п-%	оттаяно, п	приг-х, п-%	оттаяно, п	приг-х, п-%
Отличные	357	327-91,6	97	97-100	341	312-91,5	102	92-90,2
Хорошие	108	97-89,8	53	51-96.2	150	135-90,0	41	37-90,2
Удовл.	36	16-44,4	33	23-69,7	29	11-37.9	20	15-75,0

Практически такие же результаты были получены в случае с эмбрионами хорошего качества (96,2%), что касается эмбрионов удовлетворительного качества, то наименьший уровень сохранности отмечен при использовании в процессе заморозки глицерина и этиленгликоля – при стандартном методе оттаивания – 37,9 и 44,4% соответственно. В целом же, как при криоконсервации зародышей в этиленгликоле так и при их криоконсервации в глицерине отмечена тенденция снижения сохранности при оттаивании клеток с использованием стандартного метода по сравнению с использованием сахарозы по всем уровням качества эмбрионов.

В таблице 46 приведены результаты исследования по изучению влияния на сохранность эмбрионов криопротектора при замораживании, способа оттаивания и стадии развития эмбрионов.

Анализ полученных данных показывает, что независимо от используемого при замораживании криопротектора и способа оттаивания наибольшая выживаемость отмечена у ранних бластоцист по сравнению с морулами и поздними бластоцистами.

Следует отметить и тот факт, что сохранность эмбрионов при использовании стандартного метода оттаивания несколько снижалась по сравнению со способом оттаивания с применением сахарозы 88,4-89,0% против 92,1-92,5% при применении этиленгликоля и глицерина, соответственно, что еще раз подтверждает положительное влияние данного криопротектора на жизнеспособность эмбрионов при их замораживании и оттаивании.

Таблица 46 - Сохранность эмбрионов в зависимости от способа замораживания, оттаивания и стадии развития

Стадия	Криопротектор							
	этиленгликоль				этиленгликоль			
	Способ оттаивания							
	стандартный		стандартный		стандартный		стандартный	
	оттаяно, п	приг-х, п-%	оттаяно, п	приг-х, п-%	оттаяно, п	приг-х, п-%	оттаяно, п	приг-х, п-%
Мо	362	320-88,4	90	83-92,2	279	236-84,6	77	68-88,3
Бл I	104	93-89,4	60	57-95,0	185	173-93,5	59	53-89,8
Бл II	35	97-77,1	33	31-93,9	56	49-87,5	27	23-85,2

В таблице 47 представлены результаты сохранности эмбрионов в зависимости от их качества, стадии развития и криопротектора. Наивысшую сохранность (96,8%) показали ранние бластоцисты отличного качества, замороженные в этиленгликоле. Несколько ниже (95,3%) при заморозке в глицерине. А самую низкую – поздние бластоцисты удовлетворительного качества, замороженные в глицерине (50,0%). Достаточно высокую сохранность показали также морулы и бластоцисты хорошего качества: от 94,0% (ранние бластоцисты) до 92,8% – морулы.

Таблица 47 - Сохранность эмбрионов в зависимости от криопротектора, стадии развития и их качества

Качество эмбрионов	Криопротектор											
	этиленгликоль						глицерин					
	Стадия развития											
	Мо		Бл I		Бл II		Мо		Бл I		Бл II	
	оттаяно, п	пригодных, п-%	оттаяно, п	пригодных, п-%	оттаяно, п	пригодных, п-%	оттаяно, п	пригодных, п-%	оттаяно, п	пригодных, п-%	оттаяно, п	пригодных, п-%
Отл.	326	302-93	95	92-97	33	30-90,9	204	181-89	170	162-95	69	61-88
Хор.	83	77-92,8	50	47-94	28	24-85,7	117	105-90	62	57-92	12	10-83
Удовл.	43	24-55,8	19	11-58	7	4-57,1	35	18-51,4	12	7-58	2	1-50

8.2. Влияние некоторых факторов при криоконсервировании эмбрионов на их приживляемость

Одним из решающих критериев жизнеспособности как свежих, так и замороженно-оттаянных эмбрионов является их приживляемость.

В таблице 48 представлены результаты пересадки зародышей с учетом одного из факторов, влияющим на его приживляемость после оттаивания и пересадки. Из таблицы видно, что приживляемость свежих эмбрионов достоверно выше замороженно-оттаянных: 69,8% против 55,9 и 57,8% при использовании глицерина и этиленгликоля, соответственно.

Как правило, в качестве реципиентов используют клинически здоровых телок в возрасте 16-18 месяцев и живой массой 360-380 кг. Однако иногда обстоятельства заставляют включать в группу реципиентов и коров.

Сравнительный анализ эффективности использования в качестве реципиентов телок и коров показывает, что показатели приживляемости у телок достоверно ($P < 0,001$) выше по отношению к коровам – 64,2 и 53,3% соответственно.

Что касается стороны пересадки, то здесь какой либо существенной разницы не отмечено: 63,3% при пересадке в левый рог и 60,1% в правый рог.

Изучение влияния способа оттаивания эмбрионов на их последующую приживляемость показало, что уровень стельности практически не зависит от способа оттаивания зародышей 56,7% при стандартном и 57,4% при оттаивании в присутствии сахарозы.

Как влияет продолжительность охоты на эффективность эмбриотрансплантации? Анализ результатов наших исследований представленных на рисунке 97 показывает явную тенденцию увеличения уровня приживляемости эмбрионов независимо от используемого препарата при ее синхронизации 25-33,3% при продолжительности охоты до 3 часов до 62,5-71,4% при продолжительности охоты 12,1 и более часов.

В среднем показатель приживляемости увеличивался при продолжительности охоты 12 часов по сравнению с продолжительностью охоты до 3-х часов на 33,7 % при достоверной разнице ($P < 0,05$).

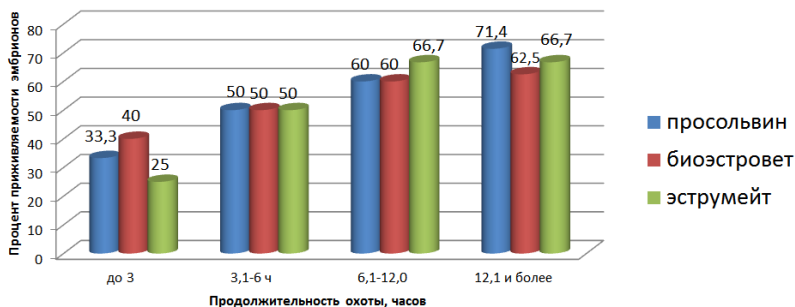


Рисунок 97 - Зависимость эффективности трансплантации эмбрионов от продолжительности охоты.

Для креоконсервации используют эмбрионы только хорошего и отличного качества, а одним из основных условий сохранения жизнеспособности является сокращение до минимума времени манипуляции с ними от извлечения и до замораживания. Как показывает анализ данных, представленных на рисунке 98. Более высокий уровень стельностей был отмечен при продолжительности кратковременного хранения до 1 ч. В этом случае результативность эмбриопересадок на 12,9% выше по сравнению с продолжительностью манипуляции от 1,1 до 2 часов и на 16,7% от 2,1 до 3-х и более, хотя разница и недостоверна тенденция отмечается четкая.

Анализ результатов приживляемости эмбрионов в зависимости от их качества стадии развития и криопротектора показал, что как и во всех предыдущих случаях в данном также наилучшую приживляемость показали эмбрионы хорошего и отличного качества на стадии поздней бластоцисты: 76,7 и 75,0% при применении в качестве криопротектора этиленгликоля, что на 15,4 и 9,4% выше по сравнению с ранними бластоцистами и на 17,9% и 22,1% по сравнению с морулами (табл. 49).

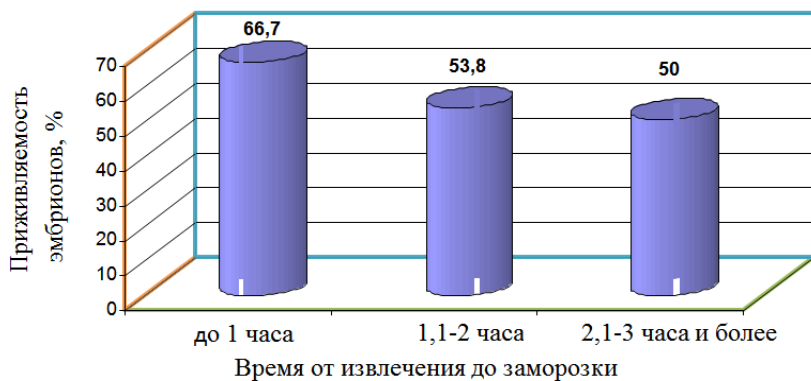


Рисунок 98 – Эффективности трансплантации эмбрионов в зависимости от времени с момента извлечения до заморозки

При использовании для заморозки глицерина наблюдалась несколько иная картина. Так, самую высокую приживляемость показали эмбрионы удовлетворительного качества (100%), второй результат был получен при пересадке отличных поздних бластоцист (63,9%) и самую низкую эмбрионы хорошего качества (20%).

Отсутствие какой-либо закономерности можно объяснить, во-первых малой выборкой (один эмбрион удовлетворительного качества), а во-вторых, что также немаловажно субъективным характером визуальной оценки качества эмбрионов. Поэтому какие-либо выводы по этому фрагменту исследований делать преждевременно.

Анализ приживляемости эмбрионов отличного качества при использовании для замораживания зародышей этиленгликоля и глицерина, показал увеличение приживляемости поздних бластоцист в случае применения этиленгликоля по сравнению с приживляемостью поздних бластоцист при использовании глицерина (76,7% против 63,9%), то же можно сказать о приживляемости поздних бластоцист хорошего качества (75,0 против 20,0 при $P < 0,001$) хотя и здесь

имеет место субъективность сравнения из-за небольшой выборки эмбрионов.

Таблица 49 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от криопротектора, стадии развития и качества эмбрионов

Качество эмбрионов	Криопротектор																	
	этиленгликоль			глицерин			интактные											
	Стадия развития																	
	Мо		Бл I	Бл II		Мо	Бл I	Бл II		Мо	Бл I	Бл II						
	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности						
Отличное	302	54,6	92	67,4	30	76,7	181	61,3	162	62,9	61	63,9	236	77,1	106	77,3	76	92,1
	77	57,1	47	59,6	24	75	105	37,1	57	61,4	10	20	115	56,5	31	61,3	16	68,7
	24	29,1	11	54,5	4	0	18	22,2	7	57,1	1	100	96	47,9	8	37,5	2	50

В таблице 50 приведены результаты исследований по изучению взаимовлияния на результативность эмбриопересадок криопротектора, качества эмбриона и качества желтого тела реципиента.

Анализ представленных данных выявил достоверное увеличение приживляемости эмбрионов только в случае пересадки эмбрионов хорошего качества реципиентам с отличным желтым телом при использовании этиленгликоля по сравнению с такими же и таким же желтым телом, но при использовании в качестве криопротектора глицерина.

Таблица 50 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от криопротектора, их качества и качества желтого тела реципиента

Качество эмбрионов	Криопротектор																	
	этиленгликоль						глицерин						интактные					
	Качество желтого тела																	
	отличное		хорошее		удовлетвор.		отличное		хорошее		удовлетвор.		отличное		хорошее		удовлетвор.	
	Количество пересадок	Уровень стельности	Количество пересадок	Уровень стельности	Количество пересадок	Уровень стельности	Количество пересадок	Уровень стельности	Количество пересадок	Уровень стельности	Количество пересадок	Уровень стельности	Количество пересадок	Уровень стельности	Количество пересадок	Уровень стельности	Количество пересадок	Уровень стельности
Отличное	175	62,8	224	58,4	25	36	218	68,8	179	55,3	7	42,8	222	87,4	176	73,9	20	50
	68	66,9*	73	57,5	7	42,8	72	45,8	93	45,2	7	14,3	46	60,8	101	59,4	15	46,7
Хорошее	16	31,2	15	40	8	25	5	20	19	42,1	2	0	13	69,2	62	45,1	31	41,9

Далее следует отметить достаточно высокий уровень приживляемости эмбрионов удовлетворительного качества при их пересадке реципиентам с хорошим желтым телом, как при использовании этиленгликоля так и глицерина 40 и 42,1%, соответственно. Отмечается стабильная тенденция снижения приживляемости эмбрионов всех категорий качества по мере снижения качества желтого тела реципиента. Это характерно как для этиленгликоля так для глицерина. Правда, во втором случае эта тенденция не так выражена.

Таблица 51 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от криопротектора стадии развития и качества желтого тела реципиента

Стадия развития	Криопротектор																	
	этиленгликоль				глицерин				интактные									
	Качество желтого тела																	
	отличное		хорошее		удовлетвор.		отличное		хорошее		удовлетвор.							
	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности						
Мо	172	58,1	205	53,6	26	23,1	144	55,5	152	48,7	8	0	158	79,7	239	61,1	50	42
Бл I	62	66,1	80	65	8	37,1	117	68,4	102	55,9	7	57,1	70	82,7	65	63,1	10	50
Бл II	25	76	27	62,9	6	83,3	34	70,6	37	48,6	1	0	53	88,7	35	88,6	6	66,7

Кроме этого следует отметить, что независимо от качества желтого тела и используемого криопротектора, удовлетворительные по качеству эмбрионы дали самый низкий уровень приживляемости.

Анализ эффективности трансплантации эмбрионов на разных стадиях развития реципиентам с разным по качеству желтым телом не выявил достоверных различий в показателях приживляемости ни по одному из факторов влияния (табл. 51). Следует отметить стойкую тенденцию снижения приживляемости эмбрионов всех стадий развития по мере снижения качества желтого тела, за исключением поздних бластоцист, пересаженных реципиентам с удовлетворительным по качеству желтым телом (83,3%) при использовании при

заморозке этиленгликоля и ранних бластоцист при использовании глицерина (57,1%).

Кроме этого, применение при криоконсервации этиленгликоля, позволило получить стабильно высокую приживляемость поздних бластоцист по сравнению с морулами и ранними бластоцистами.

В таблице 52 представлены результаты исследования эмбриопересадок в зависимости от того, в каком рогу и какого качества находится желтое тело.

Таблица 52 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от качества желтого тела, криопротектора и стороны пересадки

Качество желтого тела	Криопротектор											
	Этиленгликоль				Глицерин				Интактные			
	Сторона пересадки											
	левая			правая			левая			правая		
	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности	количество пересадок	уровень стельности
Отличное	106	61,3	153	62,1	119	62,2	176	62,5	143	77,6	138	86,9
Хорошее	151	68,9*	161	46,6	121	55,4	170	48,2	136	61,2	203	66,5
Удовлетвор.	14	42,8	26	30,8	11	27,3	5	20	39	48,7	27	40,7

Из приведенных данных видно, что достоверное увеличение результативности эмбриопересадок отмечено при пересадке эмбрионов в левый рог, когда там имеется желтое тело хорошего качества, а при заморозке применялся этиленгликоль (68,9% против 46,6%).

При использовании в качестве криопротектора глицерина также как и в случае с этиленгликолем при пересадке в левый рог с хорошим и удовлетворительным желтым телом полученные результаты выше по сравнению с пересадками в правый рог 55,4 и 27,3% против 48,2 и 20%, соответственно.

Сравнительный анализ эффективности эмбриопересадок в зависимости от стороны пересадки и качества желтого тела при

применении для заморозки разных криопротекторов показал достоверно более высокие результаты, когда в качестве криофиликта использовался этиленгликоль, а эмбрионы пересаживались в левый рог с хорошим желтым телом 68,9% против 55,4% при использовании глицерина ($P < 0.05$).

Значительно более высокие результаты были получены и при пересадке эмбрионов в левый рог с удовлетворительным желтым телом при применении этиленгликоля по сравнению с глицерином (42,8 против 27,3%).

Таким образом, следует отметить, что как в случае применения глицерина, так и этиленгликоля пересадка эмбрионов в левый рог даст более высокие результаты приживляемости.

Таблица 53 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от криопротектора, способа оттаивания и качества эмбрионов

Качество эмбрионов	Криопротектор							
	этиленгликоль				глицерин			
	Способ оттаивания							
	стандартный		с сахарозой		стандартный		с сахарозой	
	количество пересадок, n	уровень стельности, %	количество пересадок, n	уровень стельности, %	количество пересадок, n	уровень стельности, %	количество пересадок, n	уровень стельности, %
Отличные	341	59,5	83	56,6	315	62,2	89	62,9
Хорошие	105	58,1*	43	67,4*	144	44,4	28	42,8
Удовлетворит.	25	28,0	14	42,8	20	40,0	6	16,7

Исследования комплексного влияния на приживляемость эмбрионов криопротектора при замораживании, качества эмбрионов и последующего способа оттаивания, результаты которых приведены в таблице 53, показывают достоверное увеличение приживляемости зародышей хорошего качества замороженных в этиленгликоле и оттаяных по стандартному методу по сравнению с эмбрионами замороженными в

глицерине и оттаянными по тому же методу: 58,1% против 44,4 при $P < 0,05$. Аналогичные результаты получены и при пересадке эмбрионов оттаянных в присутствии сахарозы: 67,4% против 42,8% при $P \leq 0,05$.

К этому следует добавить, что эмбрионы хорошего и удовлетворительного качества замороженные в этиленгликоле показали более высокую приживляемость при условии их оттаивания в присутствии сахарозы. У эмбрионов отличного качества результаты были практически одинаковыми 59,5 и 56,5% соответственно.

При заморозке в глицерине прослеживается несколько иная тенденция: более высокий результат был получен при пересадке эмбрионов хорошего и удовлетворительного качества, оттаянных по стандартной методике – 44 и 40% и 42,8 и 16,7% при использовании сахарозы.

В таблице 54 представлены результаты исследований по изучению взаимовлияния на эффективность эмбриопересадок криопротектора, способа оттаивания и стадии развития эмбрионов.

Таблица 54 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от способа оттаивания, криопротектора и их стадии развития

Стадия развития	Криопротектор							
	этиленгликоль				глицерин			
	Способ оттаивания							
	стандартный		с сахарозой		стандартный		с сахарозой	
	количество пересадок, n	уровень стельности, %	количество пересадок, n	уровень стельности, %	количество пересадок, n	уровень стельности, %	количество пересадок, n	уровень стельности, %
Морула	331	54,4	72	50,0	243	51,4	61	47,5
Бластоциста I	103	63,1	47	65,9	180	61,1	46	67,4
Бластоциста II	37	70,2	21	71,4	56	58,9	16	56,2

Анализ приведенных данных не установил достоверного влияния не по одному из направлений исследований, хотя прослеживается четкая тенденция на увеличение приживляемости при пересадке поздних бластоцист при условии их заморозки в этиленгликоле. При использовании глицерина аналогичная ситуация складывается с ранними бластоцистами.

При этом следует отметить значительное превосходство по результатам пересадок поздних бластоцист при их заморозке в этиленгликоле по сравнению с глицерином не зависимо от способа оттаивания 70,2 и 71,4% против 58,9 и 56,2% соответственно. По данному направлению исследований также как и по предыдущему достоверных различий по приживляемости эмбрионов не установлено.

Таблица 55 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от криопротектора, способа оттаивания и качества желтого тела

Качество желтого тела	Криопротектор							
	этиленгликоль				глицерин			
	Способ оттаивания							
	стандартный		с сахарозой		стандартный		с сахарозой	
	количество пересадок, п	уровень стельности, %	количество пересадок, п	уровень стельности, %	количество пересадок, п	уровень стельности, %	количество пересадок, п	уровень стельности, %
Отличное	201	60,2	58	67,2	235	62,9	60	60,0
Хорошее	247	57,1	65	58,5	232	50,4	59	54,2
Удовлетворит.	23	39,1	17	29,4	12	25,0	4	25,0

В таблице 55 представлены результаты пересадки эмбрионов в зависимости от криопротектора способа оттаивания и качества желтого тела. Как и следовало ожидать самые высокие результаты были получены при пересадке эмбрионов реципиентам с отличным желтым телом: от 60,0 до 67,2 в зависимости от криопротектора и способа оттаивания. По мере

снижения качества желтого тела снижалась и результативность, а именно: при пересадке эмбрионов реципиентам с хорошим желтым телом уровень стельности составил от 50,4 до 58,5%, а реципиентам удовлетворительным – от 25 до 39,1%.

Несколько более высокие результаты (57,1 и 39,1% против 50,4 и 25,0%) были получены при пересадке эмбрионов, замороженных в этиленгликоле, реципиентам с хорошим и удовлетворительным желтым телом при стандартном методе оттаивания. Та же тенденция прослеживается и при использовании для оттаивания сахарозы – 58,5 и 29,4% против 54,2 и 25,0%.

Приживляемость деконсервированных эмбрионов не зависела также и от породных особенностей (табл. 56). и находилась на достаточно высоком уровне: от 45% у немецких голштинов, до 50% у герефордов.

Таблица 56 - Влияние породных особенностей доноров на приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов

Порода доноров	Количество пересадок	Стельных реципиентов	Уровень стельности, %
Черно-пестрая	208	100	48,1
Ангусы	62	29	46,8
Герефорды	58	29	50,0
Немецкие голштины	80	36	45,0

ГЛАВА 9. ПЕРЕСАДКА ЭМБРИОНОВ

Для более широкого внедрения использования эмбрионов в практике необходимо было разработать более простые и приемлемые для производства способы пересадки эмбрионов. В этой связи с этим в начале 50-х годов были начаты опыты по трансцервикальной пересадке зародышей /273/.

На начальном этапе попытки трансцервикальных пересадок до 60-х годов оказались безуспешными, однако они позволили выяснить причины, которые отрицательно влияют на приживляемость эмбрионов. Одним из таких факторов некоторые исследователи считают повышенную сократительную активность миометрия при трансцервикальном введении инструмента, вследствие чего возможен выброс эмбриона во влагалище /193/. Некоторое время спустя было установлено наличие между 6 и 9-м днями полового цикла только неспецифической электро активности матки, которая проявляется в момент трансцервикального введения и выведения инструмента. Что дало основание полагать, что выброс эмбриона после прекращения манипуляции маловероятен /63/. Важно то, что сокращения, появляющиеся в момент введения инструмента, увеличивают вероятность травмы слизистой матки с последующим открытым эндометритом, что влечет за собой гибель эмбриона /241, 260/.

Для снятия напряжения матки первоначально считалось целесообразным введение в полость рогов углекислого газа /241/. Но впоследствии выяснилось, что применение углекислого газа оказалось малоэффективным. T.Suige выявил, что причиной низкой выживаемости эмбрионов является изменение реакции среды вследствие воздействия углекислого газа.

В настоящее время для снятия сократимости матки наиболее часто применяют различные маточные релаксанты и достигают низкую сакральную анестезию введением раствора новокаина.

Однако избежать провоцирования воспалительных процессов часто не удается, так как они вероятнее всего

обусловлены инфекцией, к которой эндометрий очень чувствителен в лютеальную фазу полового цикла. Не исключают, что это является причиной абортов после нехирургической трансплантации. К несколько другим выводам приходят A.Brand et. al. /236/, которые отмечают маловероятность заноса инфекции при соблюдении правил асептики.

Положительный результат, прежде всего зависит от места аппликации эмбриона. Аппликация эмбрионов в верхушку рога матки дает лучшие результаты, чем в середину. По данным других исследователей такой зависимости не наблюдалось.

J.M.Screenan /248/ получил одинаковую приживляемость при аппликации эмбрионов в среднюю и краниальную части рога матки. В работах Renard J. et. al. /238/ при нехирургической пересадке эмбриона в среднюю часть рога матки приживляемость была выше, чем при хирургической.

Тем не менее, многие исследователи приходят к выводу, что выбор места аппликации эмбриона оказывает большое влияние на приживляемость. Замечено, что по прямой сосудистой связи между яичником и рогом матки, гормоны прямо поступает в верхушку рога. Достаточная концентрация прогестерона увеличивает местную маточную секрецию именно в верхушке рога матки. Вследствие этого, верхушка рога матки является наиболее благоприятным местом.

Долгое время ученые находились в поиске оптимального инструмента для трансцервикальной пересадки эмбрионов наиболее подходящим инструментом для нехирургической трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота в первое время стал катетер Кассу для искусственного осеменения. Впервые для целей трансплантации его применил J.M. Screenan /250/. Спустя некоторое время эффективность использования этого инструмента была отмечена и другими исследователями /263/. Однако использование катетера Кассу не позволяет достичь желаемого участка рога матки. Так как это устройство очень жестко и имеет достаточно заостренное отверстие в конце.

Это затрудняет прохождение им кривизны рога матки и травмирует ее слизистую.

В последствии был изготовлен инструмент, с помощью которого избежали такого недостатка и им можно было апплицировать эмбрион в верхушку рога и добиться приживляемости 35-40%.

Для повышения приживляемости A.Brand и др. /236/ предложили прибор, состоящий из трех концентрических трубок.

О инструменте, которое позволяет трансцервикальную аппликацию зародышей в производственных условиях, сообщают J.Perrin, H.Coupet (1982). Приживляемость эмбрионов после пересадки данным устройством была равна 60,8%.

По данным многочисленных литературных источников можно сделать вывод о том, что на современном этапе развития метода эффективность трансцервикальных пересадок повысилась и приблизилась к результатам хирургических пересадок, а в некоторых случаях и превзошла их.

В работах J.Nahn /168/ достигнута приживляемость эмбрионов 60% как после хирургических, так и нехирургических пересадок. Высокий результат после трансцервикальной пересадки зародышей (50-55%) получена в опытах H. Lehn-Jensen и др. /197/.

W.W. Lampeter и др. (1980) в своих исследованиях так же получил высокую приживляемость. Из 50 пересадок 31 оказалось удачной, то есть эффективность достигла 62%. Некоторые ученые с целью увеличения приживляемости пытались использовать отдельные стимулирующие препараты.

Так, при трансплантации зародышей за несколько дней до пересадок T. Greve et. al. /164/ реципиентами вводили по 1500 И.Е. хориогонина. Приживляемость эмбрионов составила 80,6%. При этом у опытных животных наблюдали увеличение размеров яичников и числа желтых тел от 2 до 5. Однако столь большая эффективность получения некоторыми исследователями при проведении нехирургических пересадок скорее исключение, чем правило. Так, во Франции и других странах, в которых метод

трансплантации эмбрионов на высоком уровне. Число стельностей относительно общего количества произведенных пересадок составляет 45-55%.

9.1. Влияние различных факторов на приживляемость эмбрионов

9.1.1. Порода

Как установлено многочисленными исследованиями Hasler et.al. (2001) существенных различий по уровню приживляемости между реципиентами молочных и мясных пород нет. Были ли эмбрионы заморожено-оттаянными или свежими. Однако Putney et.al.(1988) утверждает обратное: у реципиентов молочных пород приживляемость выше по сравнению с реципиентами мясных пород, хотя при использовании в качестве реципиентов коров вышеназванных пород различий не наблюдалось. Не установлено различий по приживляемости у реципиентов мясного скота породы брахман и европейским породным типом. Тем не менее сложилось четкое мнение среди специалистов о том, что уровень приживляемости у реципиентов *Bos indicus* ниже, чем у *Bos Taurus*. Причиной таких различий может быть и природные особенности скота. С самками *Bos indicus* более тяжело работать, у них более трудно четко определить время наступления охоты. И, что немаловажно, значительно сложнее пройти катетером шейку матки по сравнению с реципиентами *Bos Taurus*.

В наших исследованиях не выявлено влияние породных особенностей на приживляемость эмбрионов. Она колебалась в пределах 58,7 – 61,9% за исключением ангусов, приживляемость у которых составила 43,3%. (табл. 57) Причиной этому является то, что, пересаживались эмбрионы только третьего класса, а все остальные подвергались криоконсервации.

Таблица 57 - Приживляемость свежеполученных эмбрионов в зависимости от породных особенностей доноров

Порода	Количество пересадок	Стельных реципиентов, гол.	Процент стельности, %
Черно-пестрая	210	130	61,9
Ангус	130	57	43,3
Герефорд	120	72	60
Немецкие голштины	80	47	58,7

Межпородные пересадки эмбрионов (табл. 58) показали, что если по результативности, пересадки свежих эмбрионов различий практически не было (59,5 и 55,3%) то приживляемость заморожено-оттаянных эмбрионов при межпородных пересадках была выше – 52,7 против 45,8%, что подтверждается и другими исследователями /2/.

Таблица 58 - Межпородная пересадка эмбрионов

Однопородная пересадка						Межпородная пересадка					
Свежие			Заморожено.-оттаянные			Свежие			Замороженно-оттаянные		
Пересадок	Стельных	%	Пересадок	Стельных	%	Пересадок	Стельных	%	Пересадок	Стельных	%
131	78	59,5	345	158	45,8	38	21	55,3	93	49	52,7

В опытах по определению степени влияния некоторых факторов на приживляемость целых и разделенных эмбрионов, было отмечено; что подсадка дегенерированного эмбриона совместно с нормальным значительно повышает уровень стельности. Так, 115 телкам-реципиентам было пересажено лишь по одному нормальному эмбриону, а 44-м реципиентам по одному нормальному и одному дегенерированному эмбриону (табл. 59).

Таблица 59 - Влияние подсадки дегенерированного зародыша на приживляемость нормальных эмбрионов

Показатель	Пересажено		Всего
	один эмбрион	один эмбрион + дегенерирован.	
Число реципиентов	115	44	159
Число эмбрионов	115	88	203
Стельных реципиентов	47	32	79
Процент стельных реципиентов	40,9	72,7	49,7

Из таблицы 59 видно, что во второй группе уровень стельности составил 72,7% или на 31,9% выше, чем в первой группе (40,9%). Возможно, дегенерированный эмбрион оказывает стимулирующее влияние на установление связи между эмбрионом и маткой реципиента.

В таблице 60 представлен анализ приживляемости эмбрионов в зависимости от донора. Как видно из его результатов прослеживается четкая индивидуальная зависимость приживляемости эмбрионов. Ее уровень колеблется от 16,7% у Акации, до 100% у Гитары и Озорной.

Таблица 60 - Влияние индивидуальных особенностей донора на приживляемость эмбрионов

Донор	Пересадок/стельных, %			Получено телят		
	пересадок	Не проверено	стельных, %	♂	♀	всего
Заря	8	2	4-50,0	2	2	4
Королева	35		17-48,6	8	9	17
Акация	6		1-16,7		1	1
Гитара	6		6-100,0	5	1	6
Сказка	9	1	4-44,4	2		2
Загадка	7		5-71,4	4		4
Ладушка	5		3-60,0	2	2	4
Акация (В)	6		4-66,7			
Озорная (В)	2	2	2-100,0			
Мазурка	2	2	1-50,0		1	1
Пчелка	12	2	9-75,0			
ИТОГО	224	26	121-54,0	43	39	82

9.1.2. Источник эмбрионов

Наивысший уровень приживляемости показывают свежие эмбрионы, полученные *in vivo* по сравнению с эмбрионами после криоконсервации, различных микроманипуляций, а также с клонированными, трансгенными и полученными в культуре *in vitro*. Доступные источники указывают на то, что приживляемость свежих эмбрионов отличного качества, полученных *in vivo* составляет 76% заморожено-оттаянных - 64%. При использовании эмбрионов *in vitro* данные показатели составляют соответственно 56 и 42% (Hasler et.al., 1998). Аналогичные результаты по эмбрионам *in vivo* отличного качества получены голландскими учеными - 77.8 и 66.6% (Otter, 1994) В таблице 61 представлены результаты пересадки различных категорий эмбрионов.

Таблица 61 - Приживляемость различных категорий эмбрионов

Эмбрионы	Количество о пересадок	Уровень стельности, %(30дн.)	Уровень стельности, %(60д н.)	Потери, %
In vivo: свежие	1483	46	42	7
Замороженные в глицерине	93	42	37	13
Замороженные в этиленгликоле	2056	38	34	10
In vitro	1094	32	27	16

Из приведенных данных хорошо видно различие между разными категориями эмбрионов не только по уровню приживляемости, но и потерям между первым и вторым месяцами стельности. Во всех случаях превосходство отмечается у свежих эмбрионов. На начальных этапах внедрения в практику трансплантации эмбрионов их половинки после деления помещались назад в свободную зону пеллюцида. При

этом стельность на каждую половинку составляла 60% в то время как у интактных -70 %. Однако когда в конце 80-х годов прошлого столетия было установлено, что зона пеллюцида не обязательна для получения приемлемых результатов по приживляемости такая практика значительно сократилась. Так, Kipra et.al (1991) достиг 57% приживляемости половинок как с зоной пеллюцида, так и без нее. В последние годы в Северной Америке получило широкое развитие коммерческого клонирования. Появилось ряд фирм предлагающих свои услуги в этой области. Однако, несмотря на то, что эффективность получения клонов из соматических клеток со времени получения знаменитой Долли значительно повысилась ее вариабельность остается достаточно высокой. Первоначально уровень стельности во многих случаях на удивление многих был достаточно высок. Однако выход телят оставался низким из-за частых обортов клонированных эмбрионов. Так по данным Lanza et.al. (2001) из 247 реципиентов с клонированными эмбрионами, впервые 35-40 стельными было 45% животных. Однако 80 из них (73% против 7-24% при пересадке эмбрионов *in vitro*) абортывало. Аналогичная ситуация сложилась и в опытах Faber et.al. (2003). При 86% стельности до 40 дня телят родилось всего лишь 28%. При этом из этих 28% 21% процент телят умерло в первую неделю после рождения. Более поздние данные (Faber et.al. 2006) по 1000 пересадкам клонированных эмбрионов от доноров возрасте от 1 до 10 лет показали, что до 40 дней уровень стельности колебался от 36 до 51%, а к 210 дням стельности данный показатель снижался 13-16%.

9.1.3. Реципиент: корова или телка?

Согласно Hasler et.al., (1987,2001) использование в качестве реципиентов коров не снижает результативности по сравнению с телками молочных и мясных пород. Тем не менее, приживляемость эмбрионов у коров-реципиентов молочных пород была ниже в сравнении с телками молочных а также с коровами и телками от мясных пород. Имеется и ряд других

данных, говорящих о том, что приживляемость эмбрионов у голштинских коров ниже по сравнению с телками при пересадке свежих эмбрионов *in vivo* (Putney et.al.1988, Dochi et.al.,1988). Аналогичные данные получены и при пересадке эмбрионов *in vitro* Стельность коров-реципиентов голштинской породы была на 11.1% ниже по сравнению с телками (Aoki et.al.,2004)

9.1.4. Возраст реципиента

Хотя данные о влиянии возраста реципиента в доступной нам литературе отсутствуют можно предположить, что с возрастом реципиентов приживляемость будет снижаться. Казалось бы, что с широким внедрение в практику регуляции и стимуляции половой функции прогестагеновых имплантов появилась возможность использовать в качестве реципиентов неполовозрелых телок. Однако имеющиеся данные (Stroud et.al.2006) говорят о том, что количество телок в охоте после синхронизации в таком возрасте значительно ниже по сравнению со стимуляцией половозрелых животных. Более того, и уровень приживляемости у них значительно ниже: 36% против 73%.

9.1.5. Лактационный статус

По результатам исследований Wright et.al. (1981) не установлено различий по приживляемости эмбрионов лактирующим или не лактирующим коровам реципиентам мясных пород. В имеющейся литературе нет опубликованных данных об использовании лактирующих или нелактирующих коров молочных пород в качестве реципиентов, хотя такие данные были бы интересны с точки зрения использования в качестве реципиентов коров, лактирующих или нет, но у которых имеются проблемы с оплодотворением.

9.1.6. История репродуктивного статуса

Общеизвестно, что животные, имеющие проблемы с воспроизводством не могут быть хорошими реципиентами. Тем не менее, многие практики предлагают использовать в качестве реципиентов, особенно у молочного скота, животных с проблемами в репродукции. Так как трансплантация обходит этап оплодотворения и раннего эмбрионального развития стельность иногда оказывается на удивление высокой именно у скота, который имел проблемы репродукции. По данным Tanabe et. al., 1985 использование в качестве реципиентов «повторок» уровень стельности составил 70% в сравнении с 82% у нормально циклирующих животных. Аналогичные результаты получены и у мясного скота.

9.1.7. Кормление

Уровень и качество кормления являются одним из наиболее важных факторов влияющих на эффективность трансплантации эмбрионов. Тем не менее, фактов по данной проблеме достаточно мало. Хотя очевидно, что недостаточно упитанных животных при возможности выбирать необходимо из состава реципиентов исключать. Так, Marletoft et. al. (1986) Указывает на значительно более низкие показатели стельности у реципиентов с низкой упитанностью. Несмотря на отсутствие доказательств того влияния кормовых добавок на уровень стельности при эмбриотрансплантации необходимость их использования очевидна в свете их влияние на баланс рациона.

9.1.8. Сезон года и климат

В литературе имеется ряд данных о влиянии климата на эффективность трансплантации эмбрионов. Так, Putney et. al., 1989 не установил различий по стельности при пересадке в условиях температуры выше или ниже 32°C. Возможно более наглядное влияние климата может, проявиться в случае

нарушения полового цикла, или же при экстремально высоких или низких температурах. Хотя публикаций и мало, но отмечается тот факт, что при резком возникновении сильных зимних метелей цикл животных нарушается. В условиях температурных колебаний в Северной Америке сезон года не влияет на приживляемость эмбрионов (Coleman, 1987; Hasler, 1987, 2001, Putney et. al., 1988). Анализ результатов более чем 9000 пересадок свежих эмбрионов показал отклонения по уровню приживляемости всего лишь на один процентный пункт. Аналогичные данные получены и в Голландии.

9.1.9. Стрессы

Стресс это не тот фактор, который можно отнести к обычным касательно трансплантации эмбрионов. Однако в литературе имеется несколько публикаций поэтому поводу Авторы анализировали, эффект перевозки реципиентов автотранспортом перед или после трансплантации эмбрионов не считая. Если процесс перевозки занимал несколько часов это не отразилось на эффективности пересадки. Yavas, 1996 не отмечая влияния транспортировки на уровень стельности обращает внимание на резкое увеличение кортизола в крови уже через 1 час после ее начала. Эти исследования наравно с другими указывают на наличие определенного стресса характерного во время искусственного осеменения видимо также характерно и для трансплантации. Также можно говорить и о стрессе животных при перегруппировке скота с появлением в группе новых животных. Dobson et. al., (2001) полагает, что положение животного в социальной структуре не влияет на приживляемость, в то время как изменение иерархического положения может оказать на этот фактор значительное влияние

9.1.10. Стимуляция эструса

По данным Hasler, 1987 реципиенты со стимулированным половым циклом показали более высокий уровень

приживляемости по сравнению с реципиентами в спонтанной охоте. Похожий тренд (56% против 60%) у стимулированных телок отмечают и голландские ученые. В свою очередь Coleman, 1987 и Wright et. al., 1981 такой тенденции не подтверждают. Более высокая приживляемость у стимулированных телок может быть объяснена более четкой фиксацией охоты поскольку она была ожидаемой с одной стороны или положительным влиянием простагландинов на оплодотворяемость (Hasler, 1987). При пересадке 2000 эмбрионов стимулированным телкам уровень стельности составил 69% пересадка такого же количества эмбрионов интактным телкам показала приживляемость 60% (Macmillan et. al., 1982). Кроме этого (Hasler, 1987) на результативность трансплантации не влиял ни интервал от инъекции простагландина до проявления охоты ни количество предыдущих стимуляций (1 -13). Использование различных внутривагинальных имплантов позволило разработать ряд программ (CIDR) синхронизации охоты, которые позволяют трансплантировать эмбрионы без выявления охоты, а пересаживать их в строго определенное время.

9.1.11. Квалификация специалиста

В ряде исследований отмечается, уровень стельности может значительно отличаться между даже между опытными специалистами, работающими в одинаковых условиях. Так, Lamb (2005) отмечает, что уровень стельности у 23 специалистов в Бразилии колебался от 0.4 до 48 % при пересадке IVP эмбрионов. Такая же ситуация нашла свое подтверждение и при анализе других результатов (Schneider, 1980). При этом специалисты обладали достаточно большим опытом. В этих же исследованиях было установлено что в четверг уровень стельности был 50.8, % в то время как при пересадках в пятницу - 42.20%. И в завершении следует отметить влияние на конечный результат и фактора «удачи». На пример, в практике трансплантации 50% уровень приживляемости, как правило, является обычным делом, но в случае пересадки 4-х эмбрионов

приживляемость на уровне нуля или 100% . отмечается в 6% случаев, а на уровне 50% только в 38% случаев (Seidel et. Al., 2003).

9.1.12. Глубина пересадки

Как правило, для достижения максимального результата эмбрион пересаживается в рог ипсилатеральный желтому телу. Меньше данных имеется о том, как далеко в рог следует помещать эмбрион. Анализ результатов по пересадке 6000 эмбрионов показал, что более высокий уровень приживляемости, когда эмбрион пересаживался в верхушку (69.9%)или в середину(68.8 %) верхней трети рога по сравнению с нижней третью (59.8 %). Интересно, что не установлено влияние глубины пересадки на ее результативность, при пересадке эмбрионов отличного качества по сравнению с эмбрионами хорошего и удовлетворительного качества, но вместе с тем приживляемость снижалась при пересадке в нижнюю треть по сравнению с верхней. В исследованиях Beal et. al., (1998) пересадка эмбрионов в точку, прилегающую к бифуркации завершилась стельностью только в 29.6% случаев, тогда как трансплантация в точку, находящуюся на расстоянии 2/3 от бифуркации закончилась стельностью 65.9% реципиентов.

9.1.13. Сторона пересадки

При спонтанной охоте в 55% случаев овуляция происходит в правом яичнике. Анализ результатов нехирургической пересадки, хирургической по медио-вентральной и боковой линии не установили достоверных различий между сторонами пересадки (в левый или правый рог) (Hasler, Remsen et. al.) Аналогичные результаты получены и при пересадке более 12000 эмбрионов *in vitro* (Lamb et. al.). При этом следует отметить, что оценивалась работа 23 практикующих специалистов. Хотя могут быть и индивидуальные отклонения. Так Steel при пересадке 8000

эмбрионов установил небольшое, но достоверное преимущество при пересадке в правый рог (65% против 62.2% в левый. Объясняет это он тем, что ему при работе левой рукой вводить катетер в правый рог удобней и проще.

9.1.14. Метод пересадки

Сравнение эффективности трансплантации эмбрионов различными методами нехирургическим или хирургическими носит весьма условный характер, поскольку никогда не проводились одновременно в одном опыте. В сравнение, Hasler, (2001) приводит пример когда в одном локальном опыте различий между хирургическими и не хирургическими методами независимо были ли эмбрионы замороженные или свежие не было установлено, в то время как во втором - при хирургической пересадке свежих эмбрионов стельность составила 80% (n=3716) при нехирургическом -72% (n=1600) Hasler, (2006).

9.1.15. Уровень прогестерона

Ряд исследований не показал каких-либо различий по уровню прогестерона во время пересадки у реципиентов, которые стали стельными или которые перегуляли (Chagas et. al. 2002, Ellington et. al. 1991, Hahn et..al. 1977). По другим данным (Bierschwal et. al. 1985, Niemann et. al. 1985) уровень прогестерона в пределах 5-8 мг/мл свидетельствует о низкой приживляемости

9.1.16. Лекарственные препараты и гормоны

Помимо прогестерона в систему трансплантации эмбрионов могут быть вовлечены и многие другие лекарственные препараты, и гормоны с целью увеличения уровня приживляемости. Однако во множестве случаев препараты не оказывают какого-либо действенного влияния на

приживляемость. Так, в тех случаях, когда использование препаратов или гормонов приводило к увеличению уровня стельности в опытных группах, в контроле уровень стельности был таким, который нельзя считать нормальным. По другим данным положительное влияние повышения концентрации прогестерона на увеличение уровня стельности, несмотря на то, каким образом оно проводилось толи путем инъекции препаратов, высвобождающими прогестерон (прогестерон-релизинг факторами), толи инъекцией препаратов, поддерживающих функционирование желтого тела: GnRH (Ellington, 1991 Smithet 2002). hCG (Greve, 1982), LH (Small 2004) не имеет постоянного характера. Инъекция рекомбинатного соматотропина в период охоты и перед трансплантацией в одном случае (коровы) увеличивало (Moreira et. al., 2001) а в другом (телки), когда он ижецировался сразу после пересадки снижал уровень стельности реципиентов телок (Hasler, 2003). Использование маточных релаксантов (clenbuterol) в одних случаях не приводил к повышению уровня приживляемости (Almedia,1989, Walton,1986) в других его применение ее увеличивало (Coulthart, 1982) Использование ибупрофена, который способен снижать синтез простагландинов в крови , в количестве 5мг/кг живой массы за 1час до трансплантации заморожено-оттаянных эмбрионов повысил уровень стельности на 26% (82 против 56%), (Elli, 2001). Аналогичные результаты были получены при использовании другого активного ингибитора секреции простагландинов. Его инъекция за 2-5 минут до пересадки в количестве 10мл. повышало уровень стельности с 51.1% в контроле до 63.8 % в опыте (Schrack et. al., 2001) Однако в других опытах, проведенных на большом количестве эмбрионов (n=506) таких различий не получено 66% проти в 66.4 %.

9.1.17. Качество желтого тела

Качество желтого тела, при пересадке эмбрионов определяемое визуально или же ректальной пальпацией по ряду исследований не коррелирует с уровнем приживляемости (Coleman, 1987; Hasler, 1987; Donaldson et. al., 1985a; Looney et. al., 1984). Не установлено также взаимосвязи между объемом желтого тела, измеренного с помощью ультразвука, и уровнем приживляемости (Spell et. al., 2001).

9.1.18. Влияние биопсии при определении пола на результативность эмбриопересадки

Общеизвестно, что соотношение полов, как у человека, так и у животных с растениями относительно постоянно и близко 1:1. Соотношение полов в потомстве очень важное обстоятельство для нормального самовоспроизведения видов.

С разработкой и развитием технологии трансплантации эмбрионов и ее широким внедрением в практику разведения и селекции крупного рогатого скота, главная особенность которого молочная продуктивность, является признаком ограниченным полом, исследования по определению пола животных на стадии раннего эмбриогенеза стало одной из первоочередных задач в развитии биотехнологии /375/.

Есть несколько путей получения потомства заданного пола. Общепринятым фактом является то, что женский организм несёт набор XX хромосом, а мужской XY. В связи, с чем у исследователей данной проблемы возникла идея разделения X и Y хромосом, что позволило бы регулировать пол путем осеменения самок семенем с набором X или Y хромосом, с получением потомства заданного пола. Основной для разделения X и Y хромосом явилось то, что Y-хромосомы имеют меньшую массу и размеры (2,22 мкм) по сравнению с X-хромосомами (6,17 мкм). Исходя из этого с целью разделения спермиев с X и Y-хромосомами применялось

центрорегулирование и сидиментация однако в большинстве случаев результаты опытов не подтвердили ожиданий в связи с чем данные методы не нашли широкого распространения.

Не дало положительных результатов использования электрофореза и метода фильтрации спермиев.

В 50-е годы нашего столетия, после того как был обнаружен НУ-антиген начали разрабатываться иммунологические методы, которые показали более высокие результаты. Так, в исследованиях Booman et. al. /132/ при оценке 112 эмбрионов получена точность от 73 до 77%.

Однако отмечается, что сама процедура может оказать воздействие на последующую жизнеспособность эмбрионов.

В итоге что разработанные методы по разделению спермиев не нашли широкого применения в производстве /133/.

В связи с разработкой и внедрением в практику метода трансплантации эмбрионов появилась возможность определения пола ранних зародышей и первая такая попытка была предпринята Gardner R. et. al. /161/, которые устанавливали пол зародышей кроликов по наличию или отсутствию полового хроматика.

После того как было установлено, что удаление части клеток трофобласта не оказывает отрицательного воздействия на жизнеспособность эмбрионов их пол начали определять с помощью хромосомного анализа отторгнутых клеток трофобласта /123/.

Точность метода составила в среднем 68...70%. Недостаток данного метода заключается в том, что для анализа пригодны только эмбрионы поздних (12...15 суток) стадии развития, что снижало эффективность их пересадки и криоконсервации.

В 1978 были проведены первые работы по определению пола у 6...7 дневных эмбрионов /132/.

Было отмечено, что хотя отделение трофобласта не имеет негативного влияния на жизнеспособность эмбриона но недостаток митотических клеток лимитирует надежность метода которая не превышает в среднем 50%.

Современные методы определения пола зародышей основаны на анализе ДНК.

Использование полимеразой цепной реакции значительно расширило возможности метода, точность которого в лучших лабораториях достигает 90-95%, а приживляемость достигает 55,6% по свежим эмбрионам и 44,4% по заморожено-оттаянным /227/.

Таким образом, последние разработки научных лабораторий вплотную подошли к тому, чтобы данные методы нашли широкое применение в практике разведения и селекции крупного рогатого скота.

В последнее время экономические условия в странах с развитым животноводством все чаще заставляют фермеров решать вопрос определения пола эмбрионов на ранних стадиях их развития. Современные достижения биотехнологии позволяют делать это с достаточно высоким уровнем достоверности (93...95%).

В наших исследованиях мы пытались изучить влияние биопсии клеток при определении пола на дальнейшую жизнеспособность эмбрионов. В таблице 62 представлены результаты определения пола у ранних зародышей в зависимости от стадии их развития и качества эмбрионов.

Таблица 62 - Результаты определения пола ранних зародышей

Параметры	Количество эмбрионов (%)	Пол	
		бычок %	телочка %
Протестировано эмбрионов, всего	1675		
Не определен пол	151 (9,0)	-	-
Определен пол	1524 (90,9)	51,6	48,4
Стадия развития:	-	-	-
Морула	1138 (74,7)	51,8	48,2
Бластоциста	386 (25,3)	51,3	48,7
Качество эмбрионов	-	-	-
отличное и хорошее	1241 (81,4)	50,7	49,3
удовлетворительное	283 (18,6)	55,8	44,2

Как видно из результатов исследований, соотношение полов примерно одинаковое. Хотя несколько больше все-таки рождается бычков. Стадия развития никакого влияния на него не оказывает, то же можно сказать и о качестве эмбрионов. Хотя следует отметить тот факт, что при пересадке эмбрионов удовлетворительного качества количество бычков выше на 11,6% против 44,2%.

В таблице 63 представлены данные влияния биопсии зародышей на их дальнейшую приживляемость. При пересадке свежих эмбрионов стельность составила 55,6% при биопсии и 53,0% у интактных эмбрионов. Что касается заморожено-оттаянных, эти показатели составили 44,4% и 49,5% соответственно.

Таблица 63 - Влияние биопсии эмбрионов при определении пола на уровень стельности

Характеристика эмбрионов	Количество пересадок п	Уровень стельности, %
Свежие:	-	-
с биопсией	410	55,6
без биопсии	953	53,0
Заморожено-оттаянные:	-	-
с биопсией	90	44,4
без биопсии	200	49,5

Как видим, биопсия не имеет достоверного влияния на дальнейшую жизнеспособность эмбрионов, а при пересадке свежих даже несколько увеличивает их приживляемость (55,6% против 53,0%). Если рассмотреть этот вопрос в разрезе качества зародышей, то и здесь данная тенденция сохраняется (табл. 64).

Таблица 64 - Влияние качества свежих эмбрионов при определении пола на уровень их приживляемости

Качество эмбрионов	с биопсией			интактные		
	Кол-во пересадок	Стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %	Кол-во пересадок, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Отличн.	183	109	59,5	457	261	57,1
Хорош.	184	100	54,3	375	201	53,6
Удовл.	43	19	44,2	121	43	35,5
Итого	410	228	55,6	953	505	53,0

Эмбрионы, подвергнутые биопсии, показывают увеличение приживляемости по сравнению с интактными. В случае с заморожено-оттаянными эмбрионами (табл. 65) данные показатели меняются наоборот. Биопсия клеток перед заморозкой зародышей несколько снижает их последующую жизнеспособность по всем уровням качества с 50,0 до 46,8 у отличных и с 38,1 до 35,7% у эмбрионов удовлетворительного качества. В целом с 49,5 до 44,4%.

Таблица 65 - Влияние качества заморожено-оттаянных эмбрионов при определении пола на уровень их приживляемости

Качество эмбрионов	с биопсией			интактные		
	Кол-во пересадок	Стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %	Кол-во пересадок, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Отличн.	47	22	46,8	88	44	50,0
Хорош.	29	13	44,8	91	47	51,6
Удовл.	14	5	35,7	21	8	38,1
Итого	90	40	44,4	200	99	49,5

Интересным для изучения был и вопрос влияния биопсии клеток зародышей на дальнейшую приживляемость в зависимости от стадии их развития.

Таблица 66 - Влияние стадии развития свежих эмбрионов при определении пола на уровень стельности

Стадия развития	с биопсией			интактные		
	кол-во пересадок п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %	кол-во пересадок п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Мо	110	56	50,9	284	139	48,9
Вl I	153	85	55,5	351	187	53,3
Вl II	147	87	59,2	318	179	56,3
Итого	410	228	55,6	953	505	53,0

Таблица 67 - Влияние стадии развития замороженно-оттаянных эмбрионов при определении пола на уровень стельности

Стадия развития	с биопсией			интактные		
	кол-во пересадок	стельных реципиентов, гол.	Уровень стельности, %	кол-во пересадок	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Мо	21	9	42,8	67	32	17,7
Вl I	39	18	46,1	79	41	51,8
Вl II	30	13	43,3	54	26	48,1
Итого	90	40	44,4	200	99	49,5

Анализ результатов, представленных в таблице 66 и 67 показывает, что определение пола не оказывает достоверного влияния на жизнеспособность как свежих, так и замороженно-оттаянных эмбрионов. Уровень стельности остается на достаточно высоком уровне. При пересадке же свежих, как и в предыдущих случаях, уровень стельности при их пересадке даже несколько выше, а при пересадке замороженно-оттаянных данный показатель несколько снижается, но разница незначительна.

В трансплантации эмбрионов всегда принципиальным остается вопрос подбора реципиентов. Наилучшим вариантом всегда оставалось использование в качестве реципиентов телок.

Но бывают моменты, когда вынужденно в качестве реципиентов используются и коровы. Результаты исследований по этому вопросу представлены в таблицах 68 и 69.

Таблица 68 - Влияние реципиента при определении пола свежих эмбрионов на их последующую приживляемость

Реципиент	Эмбрионы с биопсией			Эмбрионы интактные		
	кол-во пересадок	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %	кол-во пересадок	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
телка	297	177	59,6	689	392	56,9
корова	113	51	45,1	264	113	42,8
Итого	410	228	55,6	953	505	53,0

Таблица 69 - Влияние реципиента при определении пола замороженно-оттаянных эмбрионов на их последующую приживляемость

Реципиент	Эмбрионы с биопсией			Эмбрионы интактные		
	кол-во пересадок	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %	кол-во пересадок	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Телка	67	31	46,3	147	77	52,4
Корова	23	9	39,1	53	22	41,5
Итого	90	40	44,4	200	99	49,5

Как при пересадке интактных эмбрионов, так и при пересадке эмбрионов с определенным полом уровень приживляемости у телок значительно выше 56,9 и 42,0% и 59,6 и 45,1% соответственно. При этом у опытных эмбрионов, как у коров так и утелок приживляемость оказалась несколько выше. При пересадке замороженно-оттаянных зародышей эти показатели несколько снижаются: с 52,4 до 46,3% у интактных эмбрионов и с 41,5 до 39,1% у эмбрионов, у которых перед криоконсервацией был определен пол. При этом как и в случае со свежими эмбрионами у телок результативность пересадок была выше.

Еще одним вопросом, без решения которого невозможна эффективная трансплантация зародышей, является наличие и

качество желтого тела. Взаимосвязь данного показателя и приживляемости эмбрионов с определенным полом представлены в таблице 70, из которой видно, что при пересадке свежих эмбрионов наиболее высокая приживляемость (57,5%) была получена при их трансплантации реципиентам с хорошим желтым телом. В контроле этот показатель был выше у реципиентов с отличным желтым телом (56,2%).

Таблица 70 - Влияние качества желтого тела при пересадке свежих эмбрионов с определенным полом на их приживляемость

Качество желтого тела	с биопсией			интактные		
	Кол-во пересадок п	Стельных реципиенто в гол.	уровень стельности, %	Кол-во пересадок п	стельных реципиенто в, гол.	уровень стельности, %
Отличн.	161	90	55,9	432	243	56,2
Хорош.	153	88	57,5	389	198	50,8
Удовл.	96	50	52,1	132	64	48,5
Итого	410	228	55,6	953	505	53,0

ГЛАВА 10. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕЛЯТ-ДВОЕН

Двойни у крупного рогатого скота, особенно среди животных молочных пород, при благоприятных условиях окружающей среды, хорошем кормлении и содержании – явление редкое. Так, по данным Н.Boyd и др. /133/ в молочном стаде зарегистрировано рождение 2,7% двоен. Аналогичную цифру (2,7%) по 2323 отелам приводит P.F. Scanlan /245/. Коровы, отелившиеся двойнями, характеризуются повышенной продуктивностью/37/. Попытки индуцировать двойневые овуляции у крупного рогатого скота уровнем кормления, в отличие от овец, оказались малоэффективными.

О возможности селекции по двойневому признаку вопреки очень низкой наследуемости этого признака, сообщалось финскими учеными С.Р. Hendy и др. /173/, I.I. Rutletge /242/.

После анализа 600 тыс. отелов у финских айширских коров К. Maijala и др. /208/ пришли к выводу о возможности в течение 10 лет создания породы крупного рогатого скота, которая будет давать до 20% отелов двойнями.

По мнению R.A. Cady и др. /137/ селекция по двойневому признаку у голштинских коров, если бы она имела коммерческие преимущества, была бы трудна и потребовала бы значительного времени. Двойни могут возникать за счет созревания и выделения двух яйцеклеток во время эстрального цикла и их оплодотворения. Имеет место появление и монозиготных близнецов.

Механизм спонтанного возникновения однайцевых близнецов мало изучен. Предполагают, что образование близнецов происходит во время первых делений зародыша. Плацентарная связь у таких близнецов такая же, как и у дизиготных /350/. Они имплантируются и развиваются отдельно. Образование близнецов может осуществляться благодаря удвоению внутренней клеточной массы на стадии бластоцисты с образованием двух эмбриональных узлов. Возникновение близнецов может быть на стадии гастрюляции в результате деления нервной трубки /134, 219/.

Возникновение двух бластоцист в одной зоне пеллюцида является следствием асинхронного развития второго бластомера. Это нашло подтверждение в опытах Gordon J. /163/ по получению химер. Так, из гигантской бластоцисты, которая состояла из четырех различных овечьих зигот, развились два идентичных ягненка. Поскольку бластоциста ко времени пересадки имела единую внутреннюю клеточную массу, то образование близнецов могло быть в более позднее время.

Двойневые отелы можно получать целенаправленным применением гонадотропинов, однако значительная вариабельность в реакции яичников, может привести к рождению троен и даже большего числа телят. В таких случаях наблюдается высокий процент их смертности после рождения /245/.

P. Mulvihilla et. al. /220/, I.M. Screenan /249/ получили от 10 до 20% двоен у коров от первого осеменения после обработками низкими дозами ГСЖК (750...800 И.Е.). Причем, отелов более двух телят не наблюдалось. Напротив, французские исследователи P. Mauleon et. al. /287/, используя аналогичные дозы ГСЖК (800 И.Е.) получали до 5% троен и один отел четырьмя близнецами.

Основной проблемой при многоплодной стельности, вызванной гонадотропинами, имеет ограниченность числа развивающихся плодов максимум двумя. Коровы, имеющие три и более плода abortируют до пятого месяца стельности. Отмечаются также преждевременные роды, осложнения во время отела или коровы приносят потомство с высокой смертностью в родовой и послеродовой периоды.

Делались попытки ограничить число овуляций путем применения однократной небольшой дозы частично очищенного экстракта гипофиза на 16-й день эстрального цикла. В день охоты инъецировали хорионический гонадотропин. Такая схема гормональной обработки позволила значительно снизить число животных с многоплодной стельностью (3 и более телят). Из 15 обработанных коров только у одной была тройня, у 10 – двойни D.E. Weldt et. al. /267/.

Одним из отличительным признаков между многоплодными животными (например, овцы) и коровами, выявленным английскими учеными /38,163/ является то, что даже две овуляции в одном яичнике чаще всего приносит одного теленка. Это связано с тем, что миграция зародышей из одного рога матки в другой у коров наблюдается редко, хотя у овец и свиней – обычное явление. Таким образом использование методов, способствующих увеличению двойневых овуляций, не всегда заканчивается двойневыми отелами.

В одной из работ было показано, что в одном роге стельность встречается крайне редко, хотя двойневые овуляции в яичнике наблюдаются также часто, как и одинарные. Очевидное противодействие организма матери к имплантации в

одном рогу более одного эмбриона было доказано и в опытах других исследователей /249/.

Поэтому, несмотря на наличие обнадеживающих сообщений об использовании гонадотропинов при получении двоен все же наиболее приемлемым и эффективным является подсадка одного эмбриона осемененному реципиенту или пересадки двух эмбрионов по одному в каждый рог матки подходящего реципиента /134, 180, 245/. Такой метод нуждается в разработке соответствующих приемов получения и пересадки эмбрионов и их кратковременного хранения. Успешно можно получать двойни при пересадке одного эмбриона в контрлатеральный рог матки предварительно осеменненным реципиентам.

10.1. Пересадка одного эмбриона предварительно осемененному реципиенту

Как было сказано выше одним из методов получения двойневых отелов является подсадка эмбриона предварительно осемененному реципиенту.

После пересадки одного зародыша осемененному реципиенту около половины их становятся стельными двойнями. Совершенствование метода может обеспечить до 70% двоен. В результате вполне возможно, что при одном покрытии будет произведено почти вдвое больше телят, чем обычным путем.

По данным ученых при пересадке эмбрионов осемененным коровам можно получить до 140...145 телят на 100 коров.

Однако нет оснований ожидать двойни от коров с низкими воспроизводительными способностями. Хорошо известно, что на оплодотворяемость яйцеклеток влияет много факторов. В исследованиях I.M. Screeman /251/ показано, что выживаемость зародышей, после пересадки в рог матки реципиента на стороне желтого тела, может достигать до 50%. Однако при такой же пересадке, но в контрлатеральный рог осемененных

реципиентов этот показатель снижается до 25%. Причины низкой выживаемости зародышей, пересаженных в контрлатеральный рог матки не ясны и требуют своего решения. Можно предположить, что зародыш, пересаженный неосемененному реципиенту, в меньшей степени способен предотвратить рассасывание желтого тела, по сравнению с собственным зародышем осемененного реципиента. Такое предположение вполне допустимо, если исходить из современных представлений о том, что у беременного животного практически исключается рассасывание желтого тела благодаря гормональной защите. Возможно поэтому выживаемость двух зародышей пересаженных в контрлатеральный рог осемененного реципиента выше, чем одного.

Кроме того, защитное действие двух эмбрионов, по всей видимости значительно больше, чем пересаженного туда же одного зародыша.

Важным условием высокой приживляемости эмбрионов является синхронность половых циклов реципиента и донора. По данным Н.И. Сергеева /89/ высокий уровень стельности двойнями может быть достигнут лишь при синхронности эстрального цикла у донора и реципиента день в день.

Цель наших исследований заключалась в определении эффективности получения двоен и изучении влияния некоторых факторов на результат пересадки эмбрионов осемененным реципиентам.

Использовали коров, как в спонтанной, так и стимулированной охоте. Реципиентов осеменяли замороженно-оттаянной спермой двухкратно с интервалом 12 часов.

Пересадку свежеполученных эмбрионов проводили на 7-й день эстрального цикла в рог матки противоположный рогу с желтым телом в яичнике. Всего было пересажено 40 эмбрионов, стельными оказались 29 реципиентов (72,5%). Двойнями отелилось 15 коров (51,7%). В таблице 71 приведены результаты пересадки эмбрионов осемененным коровам разного возраста и числа лактаций. Из таблицы видно, что пересадка эмбрионов

осемененным первотелкам не эффективна. У них был намного ниже общий уровень стельности (54,5%), значительно снижалась приживляемость эмбрионов в противоположном роге матки (18,2%). Меньше было получено отелов двойнями (33,3%) от числа стельных реципиентов. Наиболее подходящими для этой цели являются коровы в возрасте 4-х лет по второй лактации. У них отмечена, высокая оплодотворяемость после первого осеменения (81,3%), стельность двойнями (61,5% и приживляемость эмбрионов (50%). Высокие показатели были получены по группе коров пятилетнего возраста на третьей лактации. Оплодотворяемость от первого осеменения составила 76,9%, стельность двойнями – 50%, приживляемость эмбрионов – 38,5%. Однако, эти показатели были ниже, чем у коров по второму отелу на 4,4; 11,5; 11,5%, соответственно. Это объясняется, вероятно тем, что наши опыты проведены на высокопродуктивных коров с удоем 6 и более тысяч кг молока, которые к 5-летнему возрасту начинают страдать нарушением обмена веществ и другими отклонениями от нормы. В целом от 29 коров с подсадкой эмбрионов было получено 44 теленка или 1,5 теленка на корову.

Таблица 71 - Приживляемость эмбрионов у осемененных коров в зависимости от возраста и числа лактаций

Показатель	Возраст коров, год		
	3	4	5
	Число лактаций		
	первая	вторая	третья
Число осемененных коров-реципиентов	55	80	65
Пересажено эмбрионов	55	80	65
Стельных реципиентов	30	65	50
Общий процент стельности	54,5	81,3	76,9
Стельных реципиентов двойнями	10	40	25
Процент стельности двойнями от числа стельных реципиентов	33,3	61,5	50,0
Процент приживляемости эмбрионов от числа пересаженных	18,2	50,0	38,5
Получено телят	40	105	75

В наших исследованиях сделана попытка выяснить влияние продолжительности сервис-периода на оплодотворяемость коров и приживляемость эмбрионов после нехирургической пересадки (табл. 72).

Общий уровень стельности составил 72,5% и рождение двоен от числа стельных коров – 51,7%. Продолжительность сервис-периода оказывало определенное влияние на оплодотворяемость коров и приживляемость эмбрионов при нехирургической пересадке.

Таблица 72 - Влияние продолжительности сервис-периода на оплодотворяемость коров и приживляемость эмбрионов

Показатель	Продолжительность сервис-периода (день)		
	до 60	60-100	100-130
Число коров в группе	60	85	55
Пересажено эмбрионов	60	85	55
Стельных реципиентов	35	70	40
Процент стельности	58,3	82,4	72,7
Стельных реципиентов двойнями	15	50	10
Процент стельности двойнями	42,9	71,4	25,0
Процент приживляемости эмбрионов от числа пересаженных	25,0	58,8	18,2

Так, при осеменении коров до 60 дня после отела, оплодотворяемость составила 58,3%, приживляемость эмбрионов – 25%. С увеличением продолжительности сервис-периода от 60 до 100 дней оплодотворяемость коров и стельность двойнями заметно повышалась и составила 82,4 и 71,4% соответственно. Повышался и уровень приживляемости эмбрионов до 58,8%. Дальнейшее увеличение сервис-периода от 100 до 130 дней снижало оплодотворяемость коров на 9,7%, стельность двойнями на 25% и приживляемость эмбрионов на 18,2%.

Важным условием развития зародышей, помимо их полноценности, является физиологическое состояние реципиента и, в частности, функциональное состояние эндометрия, обеспечивающее условия нормального эмбриогенеза. Определяющим фактором в этой связи будет синхронность развития эмбриона у донора и дифференциации эндометрия у реципиента.

Исследованиями установлено, что у животных с индуцированным половым циклом стельность была выше на 6,5% (76,9% против 70,4%), стельность двойнями – на 12,6% по сравнению с группой коров со спонтанной охотой.

Отмечены колебания в проценте стельности в зависимости от интенсивности охоты. Так, в группе реципиентов с хорошо выраженной охотой приживляемость собственных и пересаженных эмбрионов составила 83,3%, слабовыраженной – 60% и очень сильно выраженной – 66,7%. Однако, стельность двойнями была выше в группе реципиентов, интенсивность охоты у которых была выражена очень сильно – 62,5% против 53,3% в группе коров с хорошо выраженной и 33,3% в группе со слабовыраженной охотой.

При нехирургической пересадке также прослеживается зависимость уровня стельности от стадии развития эмбрионов. Оказалось, что наиболее подходящими для пересадки были ранние бластоцисты на стадии развития 7-го дня (табл. 73).

Таблица 73 - Приживляемость эмбрионов у коров в зависимости от стадии их развития

Показатель	Стадия развития		Всего
	поздние морулы	ранние бластоцисты	
Число реципиентов	80	120	200
Пересажено эмбрионов	80	120	200
Стельных реципиентов	55	90	145
Процент стельности	68,8	75,0	72,5

Стельность от пересадки ранних бластоцист достигала 75,0% и что на 6,2% выше по сравнению с коровами, которым пересаживали поздние морулы. В среднем, стельность от пересадки 200 свежеполученных эмбрионов, составила 72,5%. При этом необходимо подчеркнуть, что 40% и более двойневых стельностей при контрлатеральной нехирургической пересадке можно получить только при высокой оплодотворяемости коров (65-70%) после искусственного осеменения. При низкой оплодотворяемости коров (45-50%) получают только 20-25% двойневой стельности при пересадке эмбрионов предварительно осемененному реципиенту. Как было показано в исследованиях J. Gordon /163/ лютеотропный эффект эмбриона в ипсилатеральном роге благоприятствует развитию второго эмбриона в контрлатеральном роге, но для этого необходимо иметь высокий индекс оплодотворяемости реципиента.

В наших исследованиях изучалось влияние уровня синхронизации охоты донора и реципиента. Лучшие результаты были получены, когда донор и реципиент совпадали по эстральному циклу день в день (табл. 74).

Таблица 74 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от синхронности эстрального цикла у донора и реципиента

Показатель	Синхронность эстрального цикла (день)		
	+1	0	-1
Число реципиентов	50	105	45
Пересажено эмбрионов	50	105	45
Стельных реципиентов	35	85	25
Процент стельности	70,0	81,0	55,6
Стельных реципиентов двойнями	20	50	5
Процент двойневости от числа пересаженных эмбрионов	40,0	47,6	11,1
Получено телят	55	135	30

Стельность наступила в 85 случаях (81,0%) при точно синхронизированной охоте у реципиента с донором, в 35 – когда

реципиент был раньше донора в охоте на один день (70%) и в 25 случаях (55,6%) – когда на один день позже.

Общий уровень стельности составил 72,5% и рождение двоен от числа стельных – 51,7%. От 145 стельных реципиентов было получено 220 телят, что составило 151,7% на стельных и 110% на всех реципиентов. Эти данные несколько ниже результатов J. Gordon на кроссбредных герефордских телках при убое их на 30-й день после пересадки, но несколько выше результатов, полученных J.P. Renard, J. Ozil /238/ в опытах на телках разных пород (44,4%) и L.E. Rowson др. /240/ в экспериментах на 49 коровах (58%).

Таким образом, существенное влияние на получение двоен, путем пересадки одного эмбриона предварительно осемененному реципиенту, оказывает число лактаций, возраст, продолжительность сервис-периода, интенсивность охоты у реципиента, синхронность эстрального цикла реципиента с донором, качество и стадия развития эмбриона.

10.2. Пересадка двух эмбрионов одному реципиенту

Пересадка двух эмбрионов в каждый из рогов матки неосемененного реципиента приводит к получению двоен у 60% животных

Некоторые исследователи при пересадке двух эмбрионов в рог на стороне желтого тела наблюдали активное их перемещение в другой, противоположный рог матки. Однако, такие перемещения бывают крайне редко.

Двойнесть, полученная в результате пересадки эмбрионов, имеет ряд важных преимуществ перед естественной. Во-первых, в каждом роге матки развивается по одному зародышу. Это увеличивает вероятность благополучного исхода стельности по сравнению с естественной двойнестью, при которой оба зародыша обычно находятся в одном роге.

По данным французских ученых I.Testart и др. /260/, при размещении зародышей в обоих рогах, в каждом из них в равной степени образуется плацента. При размещении зародышей в

одном роге площадь плаценты в свободном роге составляет менее 10% всей площади. Было отмечено также образование вдвое больших по размерам плацент при стельности одиночками или двойнями в обоих рогах матки. Это может быть основной причиной задержания последа при естественных двойнях, размещенным в одном роге. В связи с этим I.Gordon и др. /163/ высказали предположение, что осложнений в связи с двойнями у крупного рогатого скота в значительной степени можно избежать, если создать оптимальные условия, а также тем, что ветеринарные специалисты могут, в случае необходимости, заранее подготовиться к оказанию помощи при сложных отелах. Исходя из практических наблюдений, при искусственно созданной двойнености уменьшается число случаев трудных отелов.

Для успешной приживляемости зародышей важно не только их полноценность, но и физиологическое состояние реципиента, в частности морфофункциональное состояние эндометрия рогов матки. Определяющим фактором также является синхронность развития эмбриона у донора и полового цикла реципиента. Средний уровень приживляемости у телок-реципиентов молочных пород при пересадке двух эмбрионов составляет 61,5%, при рождении двоен в 50% процентных случаев.

По данным Л.К.Эрнст, Н.И.Сергеева /113/ уровень стельности при двусторонней пересадке получен у коров и телок герефордской породы – 76%. При односторонней пересадке, предварительно осемененному реципиенту – 60%. Двойневые отелы зарегистрированы у 71% и 67% животных, соответственно.

Целью наших исследований было изучить эффективность получения телят-двоен путем пересадки двух эмбрионов. Было пересажено всего 268 эмбрионов: из них 112 эмбрионов по одному такому же числу реципиентов, 106 эмбрионов 53 реципиентам по два эмбриона в один рог, 50 эмбрионов – 25 реципиентам по одному в каждый рог матки (табл. 75).

Таблица 75 - Результаты получения двоен при пересадке разного числа эмбрионов

Показатель	Группы		
	один эмбрион	два эмбриона в 1 рог	по 1 эмбриону в каждый рог
Число реципиентов	112	53	25
Пересажено эмбрионов	112	106	50
Число стельных реципиентов	58	33	18
Процент стельности	51,8	62,3	72,0
Процент стельных от числа пересаженных эмбрионов	51,8	31,1	36,0
Число стельных двойнями	-	14	18 9
Процент двойневых стельностей от общего числа стельных	-	42,4	50,0
Получено телят	56	41	26
Процент полученных телят от числа стельных реципиентов	96,6	124,2	144,4

Самый высокий процент стельности был в группе, где реципиентам пересаживали по одному эмбриону в каждый рог матки (72%), когда два эмбриона пересаживали в один рог матки процент стельности составил 62,3% а в группе телок, которым пересаживали один эмбрион – 51,8%. Однако, процент стельности от числа пересаженных эмбрионов был выше в первой группе (51,8%) и значительно ниже во второй и третьей группах (31,1% и 36% соответственно). Число двойневых стельностей в третьей группе было выше на 7,6%, по сравнению со второй (50% против 42,4%). Необходимо отметить, что во всех трех группах наблюдались аборт. В первой группе два аборта – 3,4%, во второй 6 аборт – 9% в третьей- один аборт – 5,6%. По выходу телят показатель выше был в третьей группе – 144,4% против 124,2%, во второй и 96,6% в первой.

Таким образом, в результате исследований установлено, что наиболее эффективный способ получения телят-двоен – пересадка по одному эмбриону в каждый из рогов матки.

Нами изучено влияние стадии развития эмбриона на эффективность получения телят-двоен. Эмбрионы перед пересадкой строго дифференцировали по качеству и стадии развития. Телкам первой группы (n=46) пересаживали морулы, второй группе (n=72) бластоцисты, третьей группе (n=40) морулу + бластоцисту (табл. 76).

Таблица 76 - Приживляемость эмбрионов в зависимости от стадии развития эмбриона

Показатель	Мо+Мо		Бл+Бл		Мо+Бл	
	2 эмбриона в 1 рог	по эмбриону в каждый рог	2 эмбриона в 1 рог	по эмбриону в каждый рог	2 эмбриона в 1 рог	по эмбриону в каждый рог
Количество реципиентов	36	10	44	28	28	12
Число пересаженных эмбрионов	72	20	88	52	56	24
Стельных реципиентов	22	8	28	20	16	8
Процент стельности реципиентов	61,1	80	63,6	71,4	57,1	66,7
Процент стельности от числа пересаженных эмбрионов	30,5	40	31,8	38,5	28,6	33,3

При анализе данных, полученных в результате опыта видно, что наиболее высокий процент стельности получен при соответствии обоих эмбрионов одной стадии развития (Мо + Мо или Бл + Бл).

В зависимости от числа эмбрионов, пересаженных в один или два рога матки процент стельности был различным. Он был выше, когда две морулы аплицировали в разные рога матки (80%) и заметно ниже, когда два эмбриона пересаживали в один рог матки (61,1%). Аналогичные результаты были получены и при пересадке бластоцист (71,4 и 63,6% соответственно) и эмбрионов на разных стадиях развития (66,7 и 57,1%). Необходимо также отметить, что при пересадке двух морул в разные рога матки процент стельности был выше, чем при соответствующей пересадке двух бластоцист (80 и 71,4%). Однако, при пересадке двух морул в один рог приживляемость была на 2,5% ниже, чем при пересадке двух бластоцист (61,1 и 63,6%). По результатам анализа полученных данных можно заключить, что приживляемость эмбрионов повышается, когда они соответствуют друг другу по стадии развития и при их пересадке в каждый рог матки реципиента.

В исследованиях была сделана попытка определить связь качества желтого тела и приживляемости эмбрионов. При этом было установлено, что процент стельности у реципиентов с отличными и хорошими желтыми телами в яичниках выше, чем у реципиентов с желтыми телами удовлетворительного качества (табл. 77).

Процент стельности у телок, которым было пересажено по одному эмбриону составил в группе реципиентов с отличными телками – 59,3%; с хорошими – 50,0%, удовлетворительными – 36,5%. Пересадка двух эмбрионов способствовала повышению процента стельности и практически зависела также от качества желтого тела. Процент стельности у реципиентов с отличным желтым телом составил 70,6 и 76,9; хорошим – 61,1 и 70,0; удовлетворительным – 55,6 и 50,0, соответственно.

Двойных отелов было больше у телок с отличными желтыми телами по сравнению с аналогичными телками второй группы. А у телок с хорошими желтыми телами был выше, чем у телок с удовлетворительными желтыми телами.

Таблица 77 - Приживляемость в зависимости от качества желтого тела в яичнике реципиента и числа пересаженных эмбрионов

Качество желтого тела и число пересаженных эмбрионов	Кол-во реципиентов	Стельных реципиентов	Процент стельности	Число отелов двойнями	Процент отелов двойнями от числа стельных реципиентов
Отличное: 1	54	32	59,3	-	-
2	34	24	70,6	12	50,0
3	26	20	76,9	12	60,0
Хорошее: 1	32	16	50,0	-	-
2	36	22	61,1	10	45,5
3	20	14	70,0	6	42,9
Удовлетворительное: 1	26	10	38,5	-	-
2	36	20	55,6	6	30,0
3	4	2	50,0	-	-

Примечание:

1 – пересажено по одному эмбриону

2 – два эмбриона в один рог матки

3 – два эмбриона в разные рога матки

Из приведенных материалов можно сделать вывод, что приживляемость эмбрионов находится в прямой зависимости от качества желтого тела реципиентов на день пересадки. Прослеживается зависимость этого показателя и от числа пересаживаемых эмбрионов. Со снижением качества желтого тела (удовлетворительные) процент приживляемости повышается при пересадке двух эмбрионов в один рог матки.

Нехирургические пересадки двух эмбрионов в разные рога матки, технологически сложный процесс. Осуществляется он при использовании катетера для нехирургической пересадки с обязательным двухразовым прохождением цервикального канала.

Недостатком этого катетера является невозможность одновременной пересадки двух эмбрионов, не удаляя его из шейки матки.

Нами разработан способ пересадки эмбрионов и сконструирован катетер для пересадки эмбрионов поочередно в каждый рог матки реципиента, не удаляя его из канала шейки матки (патент № 4735372/15 от 27.06.89 г.). Животным пересаживали по два эмбриона в каждый рог матки двумя способами. Первый способ – пересадка двух эмбрионов двумя катетерами, при двукратном прохождении шейки матки. Второй способ – пересадка новым катетером, позволяющим одновременно пересадку двух эмбрионов не вынимая катетера из шейки матки.

Первым способом 25 телкам первой группы было пересажено 50 эмбрионов, вторым – 27 телкам пересажено 54 эмбриона. Число стельных реципиентов оказалось в первой группе 18 (72,0%), во второй 21 (77,8%) что выше на 5,8% (табл. 78).

Таблица 78 - Результаты пересадки двух эмбрионов одним и двумя катетерами в оба рога матки

Показатель	Пересадка двух эмбрионов двумя катетерами	Пересадка двух эмбрионов одним катетером
Число реципиентов	25	27
Пересажено эмбрионов	50	54
Стельных реципиентов	18	21
Процент стельности	72,0	77,8
Процент стельности от числа пересаженных эмбрионов	36,0	38,9
Получено отелов двойнями	9	9
Процент отелов двойнями от числа стельных реципиентов	50,0	42,9
Получено телят	24	30
Процент полученных телят от числа стельных реципиентов	133,3	142,9

Процент стельности реципиентов от числа пересаженных эмбрионов во второй группе также был несколько больше (на 2,9%). Однако, отелов двойнями в обеих группах было одинаковым, а в процентном отношении этот показатель был в пользу первой группы (на 7,1%). Процент выхода телят от числа стельных реципиентов составил 133,3 в первой группе и 142,9 во второй.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что использование нового катетера для пересадки двух эмбрионов позволяет получать приемлемые результаты по приживляемости эмбрионов.

10.3. Пересадка замороженно-оттаянных эмбрионов мясных пород телкам-реципиентам черно-пестрой породы

Изучена возможность пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов от мясных пород телкам-реципиентам молочной породы с целью получения телят-двоен. Для этого из Болгарии были завезены замороженные эмбрионы от коров-доноров герефордской, абердин-ангусской породы и породы салерс.

Всего было пересажено 40 эмбриона 26 телкам-реципиентам. Телки были разделены на три группы. Первой группе телок (n=12) пересадили по одному эмбриону, второй группе (n=8) по 2 эмбриона в один рог матки и реципиентам третьей группы (n=6) – по одному эмбриону в каждый рог матки.

Спустя три месяца после пересадки при ректальном исследовании установлено, в первой группе 4, во второй – 4 и в третьей – 2 стельности.

Более высокий процент стельности был зарегистрирован во второй группе – 50,0, в первой и третьей группах этот показатель был одинаковым – 33,3%, или на 11,1% ниже, чем в первой группе. Однако, необходимо отметить, что устойчивость эмбрионов от разных доноров, к воздействию низких температур была не одинаковая. Так, в третьей группе из 12 пересаженных эмбрионов 8 получены от коровы-донора № 160 и не один из

них не прижился. Аналогичные результаты были получены после пересадки эмбрионов от коровы-донора № 101. Из 8 эмбрионов 6 пересадили телкам второй группы и 2 – телкам первой группы. После их пересадки стельностей не установлено (табл. 79). У одной телки второй и у одной третьей группы получены отелы двойнями. Одна телка-реципиент второй группы на пятом месяце стельности abortировала двойней, поэтому выход телят в этой группе составил 37,5%.

Всего в результате опыта было получено 10 телят-трансплантатов, из них 9 телят герефордской породы и 1 теленок породы саллерс. В целом приживляемость эмбрионов составила 38,5%.

Таблица 79 - Результаты межпородной пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов мясных пород

Показатель	1 эмбрион в 1 рог матки	2 эмбриона в 1 рог матки	2 эмбриона в 2 рога матки	Всего
Число эмбрионов	12	16	12	40
Число реципиентов	12	8	6	26
Стельных реципиентов	4	4	2	10
Процент стельности	33,3	50,0	33,3	38,5
Число реципиентов стельных двойнями	-	1	1	2
Процент отелов двойнями от числа	-	25,0	50,0	20,0
Получено телят	4	3	3	10

10.4. Получения монозиготных телят-двоен

Одним из наиболее перспективных и имеющих высокое прикладное значение биотехнологических приемов, позволяющих увеличить количество исходного эмбриоматериала, повысить эффективность воспроизводства и

селекции, является микрохирургическое разделение ранних зародышей на две или более частей /89/. Все клетки зародышевого комплекса эмбриона тотипотентные и содержат полную генетическую информацию о всем организме, вследствие чего при разобщении связей между первичными бластомерами или группами бластомеров сохраняется способность развития целого организма из разобщенных частиц. Это подтверждается обширными практическими исследованиями во всем мире.

Одна из попыток разделения зародышей на отдельные бластомеры завершилась получением пяти пар монозиготных двоен у овец /272/.

Долгое время попытки разделения эмбрионов крупного рогатого скота на стадиях развития на отдельные бластомеры, с последующим доведением их развития до стадии бластоцисты, были безуспешны. Например, у эмбрионов мышей, у которых удаляли прозрачную оболочку или она оказывалась поврежденной развитие протекало не далее стадии поздней морулы /113/. В последующем Willadsen, S.M. /272/ удалось получить идентичных близнецов крупного рогатого скота. Техника деления заключалась в извлечении зародышей из яйцеводов донора хирургическим способом на стадии 2 бластомеров (2...3-ий день), путем отделения их от прозрачной оболочки и разделением на бластомеры и размещении каждого из них в свободную оболочку. Сконструированные полуэмбрионы размещали в микроцилиндре, состоящего из физраствора и агар-агара (1%). В свою очередь, цилиндр с эмбрионами помещали в более широкий цилиндр, состоящий из одного агар-агара и хирургическим методом переносили в перевязанный яйцевод овцематки (промежуточный реципиент) на 24...48 часов после чего эмбрионы извлекали и пересаживали телкам-реципиентам. Было пересажено 52 эмбриона 13 реципиентам, по 2 в каждый рог матки. Стельными стали 9 реципиентов. После отела было получено одна тройня, две двойни и один одинцовый теленок.

Впоследствии стали применять способ деления 7-дневных

эмбрионов, на стадии поздней морулы или ранней бластоцисты на две половинки. Одновременно совершенствовались и микрохирургические манипуляции.

Несколько упрощенный способ использовали французские ученые D.Osil et. al. /230/. Семидневные эмбрионы разделяли на специальном микроманипуляторе, включающем несколько видов инструментов для различных микрохирургических операций. Деление производили с помощью микроскальпеля через прозрачную оболочку на две половинки. Затем каждую половинку переносили в пустую оболочку неоплодотворенной яйцеклетки или дегенерированного эмбриона. После кратковременного культивирования в течение 2...4 часов пересаживали реципиенту нехирургическим способом. При таком способе разделения приживляемость полуэмбрионов составляла около 50%.

Несколько выше результаты были получены в опытах Y. Nahn /168/. Ими было отмечено, что деление эмбрионов не оказывает отрицательного влияния на приживляемость эмбрионов. Так, при пересадке половинок эмбрионов стельность составила 58%, а при пересадке целых эмбрионов – 63%.

Auran T. /121/ считает, что решающим условием для получения монозиготных двоен является предварительный тщательный отбор эмбрионов. Только эмбрионы на стадии морулы высокого качества можно использовать для деления. Это означает, что из 10 вымытых эмбрионов только один может быть пригоден для разделения и последующего получения монозиготных двоен.

В литературе имеется сообщение о попытке в ФРГ в 1983 г. использовать этот способ в коммерческих целях одной из станций по пересадке эмбрионов крупного рогатого скота. После разделения 23 эмбрионов на стадии морулы было получено 46 полуэмбрионов, которые были тут же пересажены реципиентам. У 32 реципиентов была установлена стельность (71,1%), из них у 22 реципиентов прижились обе половинки, т.е. 11 эмбрионов (48,9%).

По оценке специалистов этой станции, включение метода

получения монозиготных близнецов в программе трансплантации эмбрионов даст возможность значительно увеличить выход телят от высокоценных коров.

В наших исследованиях мы использовали эмбрионы только "отличного" и "хорошего" качества. Оценку качества эмбрионов производили по их морфологической характеристике и в соответствии со шкалой оценки морул и бластоцист/32/.

Деление эмбрионов производили двумя методами. Первый метод – деление осуществляли металлическим микроскальпелем под лупой, без подсадки в зоны пеллюцида (в условиях производства). Второй метод – эмбрионы делили с использованием микроманипулятора в лабораторных условиях. Полуэмбрионы после деления помещали в зоны пеллюцида. После деления эмбрионов все половинки оценивались в зависимости от их размера и морфологической характеристики. Было разделено 22 эмбриона и получено 40 нормальных половинок (90,9%).

Округлившиеся, компактные, симметричные половинки эмбрионов оценивались как "отличные". Полуэмбрионы выглядевшие неравномерными, неправильной формы относились к "хорошим". Условно годными половинками считались полуэмбрионы совершенно не округлившиеся и размер которых был меньше половины целого эмбриона.

После деления эмбрионов "отличного" и "хорошего" качества было получено 29,5% "отличных" половинок, 38,6% – "хороших", 22,7% – "условно годных" и 9,1% не пригодных к пересадке. Первым методом было разделено 10 эмбрионов и получено 18 (90%) половинок, вторым – 12 эмбрионов и получено 22 половинки (91,7%). Телкам первой группы ($n = 8$) пересаживали полуэмбрионы разделенные первым методом, а второй группе ($n = 10$) полуэмбрионы разделенные вторым методом. В обеих группах получено по 4 стельности (табл. 80). Стельность реципиентов после пересадки половинок эмбрионов в первой группе была выше на 10%, чем во второй. В результате эксперимента получено три стельности двойнями – одна в первой и две во второй группе. Из 11 телят шесть были из числа

отелов двойнями. Выход телят в первой группе, также был несколько выше и составил 62,5%.

Таблица 80 - Результаты пересадки разделенных эмбрионов

Показатель	Методы деления		
	первый	второй	всего
Разделено эмбрионов	10	12	22
Получено половинок (п-%)	18-90,0	22-91,7	40-90,9
Пересажено половин	16	20	36
Число реципиентов	8	10	18
Стельных реципиентов	4	4	8
Процент стельности	50,0	40,0	44,4
Получено телят	5	6	11
в том числе:			
двоен	2	4	6
одинцов	3	2	5
Приживляемость половинок	31,2	30,0	30,6

Рациональное использование эмбрионов является одной из основных задач специалиста. Поэтому целью нашей работы было изучить, снижается ли уровень использования эмбриоматериала при пересадке разделенных эмбрионов (табл. 81).

Из таблицы 81 видно, что при использовании одинакового числа целых эмбрионов получено в первой группе телок 8 стельностей, во второй – 10 стельностей. Уровень стельности был выше в первой группе (48,9%), чем во второй (45,5%). Показатель выхода телят от числа целых эмбрионов составил в первой группе 50%, во второй 45,5%, а от числа стельных реципиентов превышение в первой группе составило 37,5%.

Таблица 81 - Уровень использования эмбриоматериала при пересадке половинок и целых эмбрионов

Показатель	Полуэмбрионы	Целые эмбрионы
Использование эмбрионов	22	22
Пересажено половинок и целых эмбрионов	36	22
Число реципиентов	18	22
Стельных реципиентов	8	10
Процент стельности реципиентов	44,4	45,5
Получено телят	11	10
Процент выхода телят от числа целых эмбрионов	50,0	45,5
Процент выхода телят от числа стельных реципиентов	137,5	100,0

При трансплантации реципиентам по одному демиэмбриону уровень приживляемости составил 47,4% или 90,0% по отношению к числу интактных эмбрионов (из 10 разделенных эмбрионов получено 19 пригодных демиэмбрионов, из числа которых 9 прижились). При пересадке одному реципиенту двух полуэмбрионов уровень стельности был сопоставим с пересадкой интактных эмбрионов: 54,5 и 61,9% соответственно (табл. 82).

Таблица 82 - Эффективность дисекции ранних зародышей коров

Показатели	Интактные эмбрионы	Демиэмбрионы	
		по 1 на реципиента	по 2 на реципиента
Количество реципиентов	210	19	22
Стельных реципиентов	130	9	12
Уровень стельности, %	61,9	47,4	54,5

В таблице 83 представлены данные по влиянию возраста эмбрионов на эффективность десекции эмбрионов.

Таблица 83 - Влияние возраста эмбрионов при их дисекции на приживляемость

Стадия развития эмбрионов	Количество пересадок	Стельных реципиентов, гол.	Стельность, %
Мо II	36	14	38,9
Бла I	72	30	41,7
Бла II	60	27	45,0

По результатов исследования установлено, что наиболее высокую приживляемость после деления показали поздние бластоцисты уровень приживляемости половинок которых составил 45,0%.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что в результате деления эмбрионов без микроманипулятора в производственных условиях можно получить дополнительно до 40% телят. Приживляемость половинок при этом методе достигала 31,2%.

ГЛАВА 11. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ IN VITRO

Исследования в области экспериментальной эмбриологии привели к выдающимся результатам, особенно в области медицины, где в 1981 году получили потомство после оплодотворения женской яйцеклетки в культуре in vitro.

В настоящее время все шире разворачиваются исследования и на сельскохозяйственных животных.

Хорошо известно, что репродуктивный материал самок крупного рогатого скота определяется десятком тысяч потенциальных яйцеклеток, подавляющая часть из которых атрезирует и в воспроизводстве не участвует.

Развитие трансплантации как биотехнологического метода позволило более эффективно использовать репродуктивный потенциал высокопродуктивных животных, резко увеличить коэффициент размножения высококлассных особей. Однако

разработанные методы стимуляции не позволяют в полной мере использовать потенциальный воспроизводительный фонд, заложенный в яичниках.

При этом индуцирование высокой степени множественной овуляции отрицательно сказывается на выходе полноценных эмбрионов. Высокая вариабельность и непредсказуемость реакции яичников на гонадотропин делает известные методы ненадежными. Одна из основных ролей в решении данного вопроса отводится биотехнологии *in vitro*, которая в большей мере могла бы удовлетворить потребности как в производстве эмбрионов на определенных стадиях развития, так и в развитии приоритетных направлений в биотехнологии.

Получение полноценных эмбрионов крупного рогатого скота в условиях *in vitro* зависит от множества факторов, которые обуславливают нормальное ядерное и цитоплазматическое созревание ооцитов, их оплодотворение и развитие эмбрионов до предтрансплантационных стадий. Строгое соблюдение технологических параметров, стандартизация условий культивирования стабилизируют результативность опытов.

Начальным этапом всех работ по технологии *in vitro* является получение в достаточном количестве исходного материала и его кратковременное или длительное хранение. Как отмечает Гузеватый О.Е. и др. [20] нерегулярность поступления яичников с мясокомбината является сдерживающим фактором по проведению экспериментов по оплодотворению ооцитов коров вне организма. Разработка методов краткосрочного хранения ооцитов позволила бы планомерно проводить опыты, добываясь наиболее оптимальных сроков культивирования и оплодотворения.

Кратковременное хранение ооцитов можно проводить как в яичниках, так и в синтетических питательных средах. Однако хранение в яичниках до 12-15 часов не отличается высокой эффективностью. До метафазы 2 созревают только около 5-10% клеток из-за закисления фолликулярной жидкости [19]. Поэтому большинство исследователей склоняется к тому, чтобы снизить

до минимума затраты времени от убоя до постановки эксперимента и, что для максимального эффекта это время не должно превышать 1,5-2 часов [35, 98]. Однако для успешного проведения работ важно не только время доставки яичников в лабораторию, но и состав, и температура питательной среды, в которую они помещаются после вазоэктомии. Так по данным Старостки В.В. [98] наиболее оптимальный режим для транспортировки яичников в лабораторию в течение 1,5-2 часов – +31-+37°C. Индекс дробления в этих условиях на 21,7 и 13,7% выше по сравнению с доставкой яичников при температуре 0-6 и 18-23°C соответственно. Аналогичные результаты получены в исследованиях Байбекова Ф.Р. [5], который отмечает, что наивысшая степень экспансии кумулюса (84,7%) наблюдалась в опытной группе, яичники которой транспортировались при температуре 37°C. В группе, которая доставлялась в лабораторию при 40°C экспансия кумулюсных клеток снижалась на 11% (при $P < 0,05$).

В исследованиях Martino A. et al. [210] вреда для созревания, оплодотворения и получения эмбрионов. Кратковременное воздействие температуры (100 и ниже) также особо отрицательного влияния не оказывает. Однако длительное воздействие таких температур негативно отражается на жизнеспособности клеток.

Как отмечалось выше, при более длительном хранении яичников (10-15 часов) основная часть ооцитов, сохраняемых таким образом, вообще не инициирует мейоз, поэтому в течение такого срока лучше сохранять изолированные ооциты с созданием для них соответствующих условий (5%CO₂ в воздухе, максимальная влажность, а также присутствие необходимых энергетических и гормональных добавок).

Значительна вариабельность результатов культивирования и оплодотворения яйцеклеток вне организма в зависимости от индивидуальных особенностей доноров и в первую очередь – от возраста [47]. В отдельных исследованиях по этому вопросу отмечается, что если процент инициации мейоза и оплодотворяемость ооцитов у коров 5-6 лактаций, животных в

возрасте 1,5-2 лет и телочек 1-2 месяцев практически одинаковы, то при дальнейшем культивировании зародышей выявлено, что максимальное число эмбрионов на стадиях морулы и бластоцисты получено из ооцитов молодняка второй и третьей групп. Это подтверждается и исследованиями Журавель Р.И. [27], которая утверждает, что все 100% ооцитов от 1-2-месячных и 48-месячных животных реинициировали мейоз при постановке их на культивирование. Значительно хуже созрели клетки от старых коров (6-8 лет). Наименьший процент ооцитов с дегенерированными клетками обнаружен при культивировании клеток от животных 1-2 месяцев.

В тоже время существует и другое мнение. Gandolfi F. et al [159] исследовали сравнительную способность к созреванию *in vitro* ооцитов, полученных от неполовозрелых телят (10-14 недель) и от зрелых коров. Отмечается, что ооциты телят характеризуются меньшим диаметром по сравнению с ооцитами коров, низкой скоростью метаболизма пирувата и глутамина и пониженной белоксинтезирующей активностью, что рассматривается как факторы, снижающие способность ооцитов к созреванию *in vitro*.

Функциональное состояние яичников также имеет немаловажное значение при получении эмбрионов вне организма. Как известно, яичники претерпевают морфологические и физиологические изменения в течение всего полового цикла. Наименьший процент клеток с дегенерированными хромосомами был обнаружен, когда культивировали ооциты с плотным кумулюсом из яичников в стадии фолликулярного роста и наибольший при культивировании яичников с признаками овуляции. При этом разница была достоверна ($P < 0.05$) [27187, 209].

Немаловажным фактором, влияющим на эффективность получения эмбрионов *in vitro*, является фаза полового цикла, в которую отбирали яичники. Voedino A. et al [130] были проведены опыты с целью изучения эффективности использования яичников коров в лютеальную фазу. В первом опыте отбирали яичники в лютеальной фазе с активным желтым

телом и яичники в фолликулярной фазе. Количество ооцитов, выделенных из яичников, и уровень дробления эмбрионов практически не отличались 12 и 10; 84 и 89% в лютеальную и фолликулярную фазы соответственно, но выход бластоцист был значительно выше ($P<0,05$) в 1-й группе против 2-ой. Во втором опыте отбирали яичники с желтым телом и без него. Среднее количество ооцитов на яичник с желтым телом и без него не отличались (15 и 15). Уровень дробления эмбрионов был выше ($P<0,01$) в группе без желтого тела, по сравнению с группой с желтым телом (88 и 75% соответственно). Однако выход бластоцист в группе яичников с желтым телом был выше ($P<0,01$) по сравнению с группой без желтого тела – 24 против 13%. Таким образом, приведенные данные показывают, что высокие результаты можно получить не только при использовании яичников в фолликулярной, но и в лютеальной фазе.

Лобченко В.А. [52] считает, что наиболее подходящим источником ооцитов в количественном и качественном отношении могут быть яичники животных в диэструсе или проэструсе, а яичники в метэструсе практически не пригодны для получения полноценных ооцитов, способных к дальнейшему развитию.

Наличие и размер фолликулов также оказывает влияние на полноценное развитие клеток [186]. Так, наиболее высокие результаты получены при культивировании ооцитов, полученных из яичников, в которых имелся один фолликул диаметром более 10 мм или более 10 фолликулов диаметром от 2 до 5 мм по сравнению с яичниками, у которых фолликул диаметром более 10 мм отсутствовал вообще или фолликулов диаметром от 2 до 5 мм было менее 10. Аналогичные результаты получены и в исследованиях других авторов [120, 234, 181].

Hawk H. et al [170] так же считают, что размер фолликулов влияет на созревание ооцитов. В процессе проведенных ими опытов фолликулы разделялись на три группы: плохие, средние, хорошие, а ооциты на хорошие и плохие. Исследовали фолликулы диаметром менее 3мм, от 3 до 8 мм. При анализе

уровня созревания, ооциты плохого качества показали самые низкие результаты, независимо от качества и диаметра фолликулов. Наиболее высокие результаты были получены при культивировании клеток из средних по качеству фолликулов диаметром 3-8 мм.

Stock A. и Smith K. [433] проведены аналогичные исследования, указывающие на влияние размера фолликула и кумулюса на созревание ооцитов. В эксперименте использовались ооциты из малых фолликулов диаметром менее 6 мм. Эти ооциты культивировались совместно с кумулюсом ооцитов из больших и малых фолликулов или с ооцитами без кумулюса из аналогичных по размеру фолликулов. По уровню дробления разницы между группами не установлено. Однако выход эмбрионов на стадии морула - бластоциста резко сокращался в среде с добавлением кумулюса ооцитов из больших фолликулов, что показывает на негативное влияние кумулюса ооцитов из больших фолликулов на развитие ооцитов из малых фолликулов.

Однако, некоторые из них считают, что созревание ооцитов не зависит от клеточного окружения, целостности ооплазмы и стадии хроматина. По мнению этих исследователей, существует тесная связь между типом кумулюса окружающего ооцит и созреванием ооцита [207].

Популяция ооцит — кумулюсных комплексов из антральных фолликулов гетерогенна в связи с тем, что в яичнике одновременно идут процессы роста и развития одних фолликулов и ооцитов и атрезия зрелых, что проявляется не только морфологически, но и в способности ооцитов созревать вне организма до стадии оплодотворения.

Критериев, которые позволили бы быстро отличить третичский ооцит от растущего не разработаны, поэтому наиболее распространенным способом определения жизнеспособности ооцитов в настоящее время является их оценка по морфологическим показателям: состоянию кумулюса, его взаимосвязи с ооцитом, состоянию зоны и ооплазмы.

Первым признаком, говорящим о биологической

полноценности клетки, является наличие плотного многослойного кумулюса, плотно связанного с равномерной по толщине без видимых, изъязнов апполесцирующей блестящей оболочкой, а также без видимых признаков гранулярной конденсации, мелкозернистой ооплазмой, равномерно заполняющей перивителлиновое пространство. Наличие каких либо отклонений говорит о снижении качества ооцита или его гибели.

Анализ результатов исследований Гузеватого О.Е. и др. [71] говорит о положительном влиянии предварительного отбора ооцитов. При этом уровень клеток, реинициировавших мейоз и завершивших мейотическое созревание, был на 28,4 и 20,7% выше по сравнению с неотсеleccionированными.

Аналогичные показатели получены в исследованиях Байбекова Ф. [5]. Наивысшую степень реиниации мейоза, по кумулюсной экспансии (84,7%) показали ооциты, оцененные как хорошие. В группах средних и плохих уровень профилирации кумулюсных клеток составил 62,1 и 24,5% соответственно.

Разработанные в настоящее время методы культивирования ооцитов позволяют получать до 90% клеток на стадии «метафаза II». Однако при последующем оплодотворении и культивировании до предимплантационных стадий развивается не многим более 30%. Причиной этому служат многие факторы. В первую очередь необходимо понимать, что созревание ооцитов это комплексный процесс, включающий в себя мейотическое преобразование ядра, цитоплазматическое созревание и преобразование мембраны. Поэтому если для завершения ядерного созревания *in vitro* ооцитам достаточно обеспечить в средах энергетический и гормональный минимум, то цитоплазматическое созревание обеспечивается целым рядом биологически активных веществ, обеспечивающих в дальнейшем успешное оплодотворение яйцеклетки и развитие ранних зародышей до предимплантационных стадий.

Для полноценного созревания ооцитов в культуре *in vitro* необходимо создать условия, максимально соответствующие

естественным, т.е. тем, в которых обеспечиваются нормальное функционирование механизмов регуляции оогенеза *in vivo*. По мнению Кауффольда П. и др. [32] для создания таких условий требуется присутствие сыворотки крови, содержащей компоненты, способствующие выживанию и развитию клеток, среди которых особое значение имеют полипептидные факторы роста (ППФР), а именно: инсулиноподобный фактор (ИФР) и факторы роста эпидермиса (ФРЭ), тромбоцитов (ФРТ) и фибробластов (ФРФ). В настоящее время получены данные о действии ППФР только на процессы мейотического деления клеток.

Кривохарченко А. [43] установил, что сложные, содержащие аминокислоты, витамины и другие вещества среды могут применяться для культивирования ооцитов мышей без каких-либо белковых добавок. При этом процент эмбрионов, развивающихся до стадии вылупившейся бластоцисты, не снижается. Более высокие показатели выхода бластоцист были в том случае, когда использовались инактивированные сыворотки – 23,1% против 6,7% без инактивации [35].

В исследованиях Mingoti G. [216] оценивалась эффективность нескольких сывороток: фетальной крупного рогатого скота, коров в стадии проэструса, эструса или метаэструса. По результатам испытаний выявлено, что в целом добавление сывороток в питательную среду повышало синтез прогестерона и эстрадиола. Более высокий уровень дробления клеток достигнут при использовании эстральной сыворотки. Кроме этого установлено, что сыворотка стабилизирует pH, оказывает антипролеотическое действие и способствует более быстрой адаптации культивируемых объектов к условиям культуральных сред.

Игнатенко Л.В. и др. [31,191] провели опыт по изучению влияния фетальной сыворотки на созревание ооцитов. Применяли следующие системы созревания клеток: 1. Среда Паркера (МРМ) 20% фетальной сыворотки 40 мкг/мл гепарина. 2. Монослой клеток кумулюса сформированных за 144 часа в среде МРМ 15% фетальной сыворотки 40 мкг/мл гентамицина.

Кондиционная среда, собранная с монослоя через 144 часа. В среде Паркера через 24 часа до стадии телофаза I – метафаза II созревало 80% ооцитов. Остальные 20% ооцитов имели признаки дегенерации.

Однако существует и другое мнение по поводу необходимости использования белковых добавок при получении эмбрионов вне организма. Так, Ymaschita T. et.al [276], Azato M. [120] утверждают, что бессывороточные среды показали большую эффективность при получении биологически полноценных эмбрионов по сравнению со средами с добавлением фетальной сыворотки.

Такого же взгляда придерживается Tornesi M. [262], в исследованиях которого различий между сывороточными и бессывороточными средами не обнаружено, хотя он и отмечает, что этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Помимо сыворотки крови нормальному созреванию ооцитов, как считает, Гузеватый О.Е. [20] способствует введение в культуральную среду свежих или инкубированных гранулезных, а также кумулюсных клеток, что позитивно влияет не только на дозревание фолликулярных ооцитов до стадии метафаза II, но значительно увеличивает индекс дальнейшего дробления эмбрионов.

Fukui Y. et. al. [158] в своих исследованиях также показали необходимость присутствия в культуре *in vitro* клеток гранулёзы. Ооциты извлекали из фолликулов размером 1 – 5 мм и культивировали с клетками гранулёзы и без них. Клетки гранулёзы извлекали из фолликулов суперовулировавших коров – доноров в день охоты. Процент ооцитов, завершивших созревание с клетками гранулёзы и без них, практически не различался (70 и 73%), так же как процент оплодотворенных ооцитов и процент ооцитов с мужским пронуклеусом (94 и 91%). Однако дальнейшего развития эмбрионов из ооцитов, созревших без клеток гранулёзы, не отмечено (0/44), а эмбрионы из ооцитов, созревших с клетками гранулёзы, развивались до морул и бластоцист в 36% случаев.

По результатам других исследований [105] установлено,

что в целом введение в культуральную систему клеток гранулёзы приводит к торможению созревания ядер. Так, до стадии телофазы и метафазы II созрело 60,8% против 35,5% при использовании свежих и 37,1% при использовании проинкубированных гранулёзных клеток. Однако, в то же время установлено, что применение проинкубированных гранулёзных клеток во время созревания привело к повышению процента оплодотворения и дробления по сравнению со свежими 49,4; 21,0% и 29,6; 9,1% соответственно.

Не менее важной составляющей синтетических питательных сред являются гормоны, активизирующие процессы созревания ооцитов в культуре *in vitro*. При этом по данным Сироткина А. и др. [92], действие вводимых гормонов носило различный характер. Так, ЛГ, СЖК и вазоцин стимулируют реиниацию и прохождение созревания; люлибирин, вазопрессин, окситоцин и малые дозы ФСГ на эти процессы не влияли, а пролактин и большие дозы ФСГ тормозили мейоз на стадиях диплотены метафазы I. Авторы предполагают, что на ранних стадиях фолликулогенеза ФСГ стимулирует пролиферацию фолликулярных клеток и продукцию ими ингибиторов созревания ооцитов, а по мере созревания фолликул приобретает чувствительность к ЛГ, который блокирует секрецию и действие этого ингибитора, а также стимулирует ядерное созревание яйцеклеток. В пользу этого предположения свидетельствует факт стимуляции созревания сывороткой жеребых кобыл (СЖК), обладающей ФСГ и ЛГ активностью. В работе Arlotto T. [119] установлено, что при добавлении в среду эстральной сыворотки эффект ФСГ/ЛГ активности теряется, но влияет на количество клеток в эмбрионе. Так, если при добавлении ФСГ/ЛГ в среду, где имеется сыворотка число клеток в расчёте на бластоцисту составило 117, то без ФСГ/ЛГ их количество возросло до 125.

Brackett B. et.al. [135], анализируя влияние гормонов на эффективность созревания ооцитов, отмечают, что добавление в раствор бычьего гормона роста активизирует ядерное созревание по сравнению с ФСГ, эффективность которого значительно

ниже. Однако в присутствии совместно с ингибитором протеинкиназы. А его стимулирующая активность значительно возрастает. Не менее важную роль гормон роста оказывает и на цитоплазматическое созревание клеток [135].

К настоящему времени собрано значительное число данных об участии пролактина (ПРЛ) в регуляции фолликуло- и оогенеза, в которых показано положительное его влияние на ядерное созревание ооцитов, окруженных клетками кумулюса [119]. В исследованиях Torner H. et al. [261] пролактин в дозе 50 мг/мл положительно повлиял не только на выход ооцитов на стадии метафазы II, но и повысил уровень дробления, а также выход полноценных эмбрионов на 7-й день культивирования. В концентрации 25 мг/мл ПРЛ снижал на 11,6% долю ооцитов с дегенерированными хромосомами и увеличивал процент созревания яйцеклетки на 15,2% [190].

Выше отмечалось, что эффективность созревания и оплодотворения ооцитов вне организма зависит от функционального состояния яичников. Причина этого кроется в том, что гормональный состав фолликулярной жидкости зависит от стадии развития фолликула [189, 233]. В исследованиях Лебедевой И.Ю. и др. [48] проведено сравнение уровней пролактина (ПРЛ) и соматотропина (СТГ), участвовавших в регуляции фолликулогенеза у млекопитающих, в жидкости антральных фолликулов различного диаметра из яичников на стадиях фолликулярного роста и развитого желтого тела. Обнаружено возрастание концентрации ПРЛ в фолликулярной жидкости с увеличением диаметра фолликулов в яичниках на стадии фолликулярного роста. В яичниках с желтым телом такой зависимости не установлено. То же самое можно сказать и о концентрации соматотропного гормона, уровень которого был значительно выше в жидкости фолликулов диаметром 6-10 мм по сравнению с фолликулами диаметром 3-5 мм.

Углубленные исследования реакции клеток на гормональные воздействия позволили выявить сложную систему местных специфических факторов, осуществляющих контроль роста и дифференциации различных видов клеток путем

изменения их протеолитической активности. Среди факторов межклеточного взаимодействия важную роль играют ростовые факторы или факторы роста (ФР) – биологически активные соединения, стимулирующие или ингибирующие деление и дифференцировку различных клеток и являющиеся основными переносчиками митогенного сигнала клетки [46, 105]. В отличие от гормонов ФР, как правило, продуцируются неспецифическими клетками, находящимися во многих тканях. Наиболее изученными факторами роста являются инсулиноподобный фактор роста (ИФР), эпидермальный фактор роста (ЭФР), фибринальный фактор роста (ФФР) и некоторые другие.

Как отмечает Kato H. et.al. [186] эпидермальный фактор роста, присутствующий в жидкости яйцеводов, стимулирует экспансию кумулюса, а также дробление зародышей после оплодотворения, но не оказывает практически никакого влияния на выход биологически полноценных эмбрионов, что подтверждается и другими исследователями [100, 159, 233]. Как отмечает Lorenzo P. [207] присутствие в среде фетальной или эстральной сыворотки это процесс только усиливает. Однако следует отметить, что системы культивирования, используемые в разных лабораториях, могут сильно отличаться как по типам и дозам гормонального и энергетического субстрата так и по типам основных питательных сред, объему культуральной среды и плотности ооцитов на единицу объема [158, 156, 170], а также использованию различных монослойных культур и клеток.

Технология получения эмбрионов вне организма, основанная на использовании яичников, полученных с мясокомбината, имеет один существенный недостаток – ооциты мы можем получить только один раз и только после убоя животного, что значительно снижает перспективу участия этого метода в селекционных программах. В связи с чем в последние годы особое внимание уделяется исследованиям, направленным на получения ооцитов посредством прижизненной трансвагинальной пункции фолликулов с использованием ультразвука. Данный метод позволяет собирать ооциты у

животных с известным генетическим потенциалом на любой стадии полового цикла без стимуляции множественного роста фолликулов с достаточно высокой повторяемостью сеансов аспирации без какого – либо ущерба здоровью животного. Однако в настоящий момент эффективность метода значительно варьирует и зависит от многих факторов [136,141].

Для успешного проведения работ по получению эмбрионов вне организма необходимо соблюсти два неперенных условия: ооциты должны достичь стадии оплодотворения, а сперматозоиды пройти процесс капацитации. В естественных условиях сперматозоиды проходят подготовку к оплодотворению в половых путях самки. Вне организма капацитацию сперматозоидов проводят искусственно в питательных синтетических средах. Природа капацитации до конца не ясна [264], а время, требуемое для нее у разных видов животных не одинаково. Капацитация включает в себя удаление семенной плазмы с поверхности спермы, которая может маскировать рецептор, необходимый для взаимодействия «спермий - яйцеклетка». Маточная фаза капацитации изменяет плазменную и внешнюю акросомальную мембраны. Через деструктурированную мембрану вымываются протеолитические ферменты, необходимые для пенетрации сперматозоидом зоны пеллюцида.

Капацитация и последующая акросомная реакция необходимы для успешного оплодотворения ооцитов. После выдержки спермы в гипертонической среде происходит изменение характера движения спермиев, которое отражает нарастающую метаболическую активность, имеющую отношение к кислородному обмену в сперме при капацитации *in vitro* [128, 154, 166, 292].

По мнению многих авторов капацитацию сперматозоидов рекомендуется проводить при температуре +390С. Считается, что только при такой температуре индуцируется акросомная реакция. Однако опыты Uchockiene D. et. al. [264] показали, что оплодотворение ооцитов спермой, инкубированной при +380С и +38,50С по сравнению с капацитацией при 390С повышало их

оплодотворяемость на 4,4 и 18,8% соответственно. Среди веществ, способных вызвать в условиях *in vitro* капацитацию и акросомную реакцию важную роль играют двухвалентные и одновалентные катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} . Особый интерес вызывает применение растворов высокой ионной силы (Кребса-Риггера, Тироде) и гепарина. Использование этих веществ при подготовке сперматозоидов быка способствовало получению потомства после оплодотворения. Так, добавление в сперму при капацитации гепарина повышает уровень дробления зародышей с 38,5% до 43,8% [135], что подтверждается и другими исследователями [56]. По их утверждению увеличение концентрации гепарина с 2 до 10 мкг/мл увеличивает пенетрацию ооцитов с 46,6% до 68,3%. В средах с высокой ионной силой и в присутствии гепарина наблюдалось набухание акросомы и везикуляция мембраны, характерные для капацитации. Наилучшие результаты были получены при использовании ионов кальция в стимулированных гепарином сперматозоидах быка [142] Авторы отмечают, что присутствие гепарина в среде для капацитации увеличивает концентрацию цитоплазматического Ca^{2+} на 60%. Это увеличение происходит за счет поступления ионов кальция из вне через кальциевые мембранные каналы.

Важную роль в индукции капацитации и акросомной реакции играют отмывание сперматозоидов от семенной плазмы. Показано, что сперматозоиды кролика, быка и человека, отмывые от семенной плазмы самопроизвольно связывают экзогенную ДНК. Выделено три фазы взаимодействия ДНК со сперматозоидами: адсорбция, проникновение и элиминация [153].

Процесс капацитации сперматозоидов неразрывно связан с оплодотворением. Для оплодотворения созревших *in vitro* ооцитов, т.е. достигших стадий созревания метафазы II, в большинстве лабораторий используют следующие среды: Тироде, ХЭМ-Ф10 с добавлением эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, пенициллина, стрептомицина, гентомицина и других компонентов [30].

Маленко Г.П. [56] предлагает созреть *in vitro* ооциты и сперматозоиды инкубировать в среде Тироде с 6 мг/мл альбумина, 10 мкг/мл гепарина и 40 мкг/мл гентамицина. При таких условиях оплодотворяемость ооцитов составила 67,2%.

Качанская В.В., Кузьмина Т.И. [33] предлагают добавление в среду для оплодотворения (среда Бринстера) гиалуронидазы в концентрации 10мкг/мл. При этом процент выхода эмбрионов увеличивается с 14 до 22,6% при достоверной разницы.

Экстракорпоральное оплодотворение ооцитов включает ряд процессов, обеспечивающих слияние гамет: контакт и пенетрацию окружающих ооцит сперматозоидами, проникновение через зону пеллюцида, слияние мембран ооцита и сперматозоида, слияние пронуклеусов.

В первых опытах по оплодотворению оплодотворяемость не превышала 20%. В 1982 году впервые был получен теленок после оплодотворения тубального ооцита [11]. При этом процесс оплодотворения происходил в среде Тироде Б. По данным большинства авторов оплодотворяемость тубальных ооцитов колеблется от 48 до 70% при дроблении яйцеклеток на уровне 10-40%. В настоящее время к оплодотворению тубальных ооцитов прибегают редко. Вся работа по получению эмбрионов *in vitro* проводится с изолированными клетками, т.е. с ооцитами, выделенными из фолликулов.

В 1983 году родился первый в СССР теленок после оплодотворения созревшего *in vitro* фолликулярного ооцита. Каждому реципиенту пересаживали по несколько 2-4 клеточных эмбрионов. В результате такой трансплантации и родился живой теленок. Однако трансплантация зародышей на такой стадии требует хирургического вмешательства, поскольку эмбрионы в таком возрасте необходимо трансплантировать в яйцевод, что существенно усложняет процедуру пересадки. Поэтому основным направлением исследований в последнее время является получение эмбрионов на предтрансплантационных стадиях, пригодных для трансплантации нехирургическим путем.

Начальным этапом таких работ в бывшем СССР явилось использование промежуточных хозяев и в частности яйцеводы крольчих, т.е. после экстракорпорального оплодотворения зиготы помещались в лигатированные яйцеводы ложно беременной крольчихи, где они и развивались до стадии морулы-бластоцисты. После извлечения и оценки жизнеспособности их трансплантировали синхронным по циклу реципиентам. Другим вариантом такой работы было осеменение созревших *in vitro* ооцитов в половых путях крольчихи. Следует отметить, что в этом случае количество биологически полноценных, пригодных к трансплантации эмбрионов было в 2-3 раза больше. Помимо этого было установлено, что приживляемость эмбрионов, полученных после оплодотворения в яйцеводе крольчихи, составила 27,3%, а от экстракорпорального – лишь 4,8% [30].

Однако, несмотря на положительные результаты, достигнутые в работах по оплодотворению ооцитов вне организма, сам метод оставался громоздким и не отличался достаточной эффективностью, в связи с чем исследования по его совершенствованию продолжают до настоящего времени. Достигнутый за это время прогресс в изучении воспроизводительной функции, физиологии оогенеза и раннего эмбриогенеза крупного рогатого скота, разработке и производстве высокоэффективного оборудования, препаратов и питательных сред позволил поднять технологию *in vitro* на качественно новый уровень. Как известно, развитие половых клеток млекопитающих как *in vivo* так и *in vitro* всецело зависят от внутренних условий метаболизма и внутриклеточной регуляции, что в свою очередь обеспечивается полноценностью окружающей клетку питательной среды и эффективностью транспортировки через мембрану клетки необходимых компонентов, участвующих в процессах роста, развития и дифференцировки клеток.

Как показали исследования Campbell K. et al [138], одна из основных ролей в транспорте извне и во внутрь клетки принадлежит интегринам.

Интегрины – это семейство трансмембранных рецепторов, регулирующих внутри и внеклеточные механизмы восприятия (опознания) молекул и молекулярных соединений.

Интегрины находятся на поверхности гамет и принимают непосредственное участие в инициации взаимодействия между сперматозоидом и ооцитом во время оплодотворения.

В связи с чем, исследования последних лет направлены на создание условий для созревания, капацитации, оплодотворения и культивирования ранних зародышей, максимально приближенных к естественным условиям репродуктивного тракта самки и выявление основных факторов, оказывающих решающее воздействие на полноценное созревание, оплодотворение и развитие эмбрионов до стадии морулы-бластоцисты.

Результаты, достигнутые разными группами исследователей с использованием различных систем культивирования, не поддаются анализу. Их эффективность, начиная от технологических элементов, используемых авторами, их квалификации, лабораторного обеспечения, питательных и газовых сред в каждой лаборатории варьирует в значительной степени, что в свою очередь ведет к значительной вариабельности результатов исследования [16].

Как было установлено, максимально снизить вариабельность выхода эмбрионов на стадии бластоцисты можно путем использования проверенных базовых сред и дополнительным добавлением к ним активизирующих процесс капацитации и оплодотворения химических компонентов (гепарин, кофеин, гипотаурин, ионофор и т.д.).

Другими элементами, влияющими на достижение положительного результата, являются: объем питательной среды, количество ооцитов на единицу площади, концентрация спермы и многие другие [135]. Так, например, Boguest W. et. al. [131] отмечает, что при присутствии в среде для оплодотворения глутатиола отмечается тенденция увеличения выхода зигот со вторым пронуклеусом. Кроме того, глутатиол характеризуется оксидантными свойствами, предохраняя мембрану от жирового

переоисления. Положительное влияние глутатиола на формирование пронуклеуса отмечает и Soom A. et. al. [247]. Добавление глутатиола в среду для оплодотворения удваивало количество бластоцист (42% против 23%), а также уровень вышедших из зоны (20% и 9% соответственно). Как отмечает Taneja M. [259] эффективность глутатиола еще более возрастает в присутствии кофеина и гепарина. Выход бластоцист увеличивается по сравнению с контролем на 9,3% и 29,4% соответственно [259].

О важности присутствия кофеина в среде для оплодотворения говорит и опыт Brackett B. et al. [135], которые отмечают, что присутствие последнего значительно увеличивало уровень оплодотворяемости ооцитов. С этим соглашается и Abeydeera L. et. al. [116] в опытах которого присутствие кофеина увеличивало уровень пенетрации независимо от его концентрации.

Исследованиями Brackett B. et al. [135] установлено, если концентрация спермы от 1 до 8 млн. на 1 мл не влияла на уровень дробления, то концентрация 1 и 2×10^6 улучшала выход морул и бластоцист.

На процесс и эффективность оплодотворения вне организма огромное влияние оказывает качество и состав питательной среды, в которой происходит совместная инкубация ооцитов и спермиев.

Наряду с качеством и составом сред для оплодотворения важное значение имеет время совместного инкубирования ооцитов со сперматозоидами. По мнению одних авторов ооциты со спермиями должны инкубироваться совместно 12-16 часов [62], других – 18 часов [140]. Согласно третьим существенной разницы между продолжительностью совместного культивирования в течение 5 часов и в течение 20 часов не обнаружено [160, 254].

Однако, несмотря на очевидный прогресс в повышении эффективности оплодотворения ооцитов вне организма, выход бластоцист, пригодных к пересадке, по-прежнему остается невысоким. Одним из факторов, влияющим на развитие

эмбрионов *in vitro*, является так называемый окислительный стресс, причиной которого является постоянно увеличивающееся количество продуктов окисления в процессе метаболизма в клетке. Одним из антиоксидантов, предохраняющим гаметы и эмбрионы от разрушительного воздействия окисления является гипотаурин, присутствующий в жидкости яйцеводов.

По результатам исследования Guader C. et al [152] установлено, что наиболее высокую эффективность гипотаурин оказывает в концентрации 0,5;1 и 2 мМ. Выход бластоцист в этом случае составил 40,9; 41,1 и 35,1% соответственно. Немаловажную роль в поддержании соответствующего pH среды играет и газовый состав атмосферы, окружающей эмбрионы при их культивировании *in vitro*.

Оплодотворенные яйцеклетки, культивируемые при 10% концентрации O₂ в воздухе, хотя и дробились, но развивались достаточно медленно, что говорит об ингибирующем воздействии на профилиративные процессы в клетках высоких концентраций кислорода [221].

Анализ результатов воздействия различных концентраций кислорода на эффективность получения бластоцист *in vitro* в исследованиях Saamano J. [153] подтвердил вывод, сделанный выше. Если при концентрации O₂ 20% выход бластоцист составил 13,7%, то её снижение до 5% увеличило их выход практически в 2 раза (25,1%).

Nagaо Y. [221] отмечает в свою очередь, что уровень концентрации кислорода зависит от количества эмбрионов в капле питательной среды. В его исследованиях установлено, что наиболее высокий выход бластоцист отмечен в том случае, когда при культивировании одного эмбриона уровень кислорода составлял 1%; 2-х – 2,5%; а 25 эмбрионов – 5%.

Уровень концентрации CO₂ может зависеть от питательной среды. Так, по утверждению Farin C. et al. [156] использование среды Менезо требует меньшей концентрации CO₂ по сравнению с TC-199 (3% против 5% соответственно).

Много внимания при получении эмбрионов *in vitro*

уделяется вопросу энергетического обеспечения их роста и развития. Pinyorummiter T. et al. [233] отмечают, что только единичные зародыши достигли стадии дробления без экзогенных источников энергии, а глютамин как в отдельности, так и в сочетании с глюкозой не поддерживает раннее развитие эмбрионов. Лактат и пируват каждый в отдельности являются хорошими источниками энергии. Аминокислоты не поддерживают процесс дробления, однако в комбинации с лактатом кальция значительно увеличивают развитие бластоцист [231], с пируватом натрия такого не наблюдается. О том, что добавление в питательную среду витамина Е ускоряло формирование экспандированных и вышедших из зоны пеллюцида бластоцист, отмечают и Olson S. et al. [229]. Ускоряет процесс появления 9-16 клеточных эмбрионов и формирование морул-бластоцист также добавление фетальной или эстральной сыворотки крупного рогатого скота [259, 155, 170, 195].

Выбор компонентов среды представляет особый интерес в плане стандартизации условий культивирования. Важная роль в этом отношении отводится фолликулостимулирующему гормону (ФСГ), который принимает самое непосредственное участие в инициации мейоза и развитии ранних зародышей даже в небольших количествах [122]. Так, снижение его концентрации с 0,05 И.Е./мл до 0,01 И.Е./мл не оказало отрицательного влияния на развитие оплодотворенных ооцитов до бластоцисты и количество в ней клеток. Baranao J. [122] добавлял ФСГ в дозах от 0 до 2000 мг/мл. По результатам исследования было установлено, что если выход морул увеличивался по мере увеличения концентрации гормона с 21,6% в контроле до 38,5% при концентрации 2000мг/мл, то выход бластоцист был наиболее высоким при уровне ФСГ 200 мг/мл. Далее их выход снижался.

Хорошим гормональным и энергетическим субстратом при культивировании эмбрионов *in vitro* является монослой из клеток репродуктивного тракта самок, а также клеток кумулюса, которые способствуют преодолению блока дробления на 8-16

клеточной стадии и благоприятствуют развитию зародышей до стадии морулы-бластоцисты [155, 204]. Еще одной группой биологически активных веществ, влияющих на эффективность получения эмбрионов *in vitro*, являются ростовые факторы, к которым относятся инсулиноподобный фактор роста, фибринальный фактор роста, эпидермальный фактор роста и ряд других. По данным Lee E. et al. [196] добавление ростовых факторов не влияло на выход дробящихся зародышей до 2-8 клеточной стадии, однако увеличивало, и значительно ($P < 0,05$) выход морул-бластоцист. Наиболее эффективным фибринальный фактор роста оказался в концентрации 0,05 мг/мл. О позитивном влиянии вышеперечисленных факторов на развитие и биологическую полноценность эмбрионов говорится и в работе Gandolfi F. et. al. [160].

Много внимания уделяется и вопросу плотности ооцитов на объем среды. Так, выход бластоцист на 10 день был ниже в малых группах ооцитов (1-6 в капле) нежели в больших. Однако не было различий, от величины групп на выход эмбрионов, когда ооциты культивировались на монослое клеток печени буйвола. Тем не менее, когда эмбрионы культивировались по отдельности, количество клеток (клеточная масса) у них было меньше, чем при культивировании в группах.

Бластоцисты появлялись значительно раньше в случае когда они инкубировались с клетками печени буйвола, при этом и количество клеток в эмбрионе у них была выше [151].

Аналогичного мнения придерживается и O'Doherty E. [228], который также утверждает, что ооциты, созревающие в группах, показали значительно лучший результат по сравнению с «одиночками». По уровню клеток, достигших метафазы II, эта разница составила 18,8%, а по выходу бластоцист – 7%. Кроме того, было установлено, что концентрация сперматозоидов ниже 2000 снижает уровень дробления и выход бластоцист. Оптимальное соотношение 2000 сперматозоидов в 20 мл среды для оплодотворения.

Таким образом, несмотря на достигнутые успехи в области экстракорпорального оплодотворения ооцитов крупного

рогатого скота и получения на этой основе эмбрионов, пригодных для пересадки, вопросы получения, оценки, созревания и оплодотворения ооцитов, подготовки спермы к оплодотворению вне организма, культивирование ранних зародышей до настоящего времени остаются открытыми.

В настоящее время получение эмбрионов вне организма животных прочно занимает одно из ведущих мест в комплексе биотехнических направлений ускоренного размножения сельскохозяйственных животных. Разработка новой биотехнологии, в которой сочетаются трансплантация эмбрионов, культивирование и оплодотворение ооцитов *in vitro*, а также трансплантация эмбрионов полученных таким образом не только существенно повысит потенциал гамет в расчете на одну племенную корову, но и позволит достоверно оценить генотип и, следовательно, резко увеличить генетический прогресс в популяции. Получение на этой основе большого числа эмбрионов крайне важно для создания банка эмбрионов, а в последствии и многочисленных семейств выдающихся по продуктивности животных.

В настоящее время разработаны методы, позволяющие выделять из яичников коров до 200 ооцитов, культивировать их и оплодотворять *in vitro*. Однако выход биологически полноценных эмбрионов остается низким, поэтому продолжают интенсивные исследования с использованием современных биологических методов.

Оплодотворение ооцитов *in vitro* достигнуто у 20 видов млекопитающих. В 1968 г. появилось первое сообщение о нормальном потомстве, полученном от мышей, в 1974 г. - от крыс, в 1981 г. - от человека и крупного рогатого скота, в 1983 г. - от свиней и в 1984 г. - от овец..

В Республике Беларусь первый теленок из эмбриона, полученного в культуре *in vitro* был получен в 1995 сотрудниками лаборатории генетики и разведения крупного рогатого скота БелНИИЖ на базе на базе Брестского ГПП

Благодаря достигнутому за последние 20 лет прогрессу в понимании сложных процессов, связанных с культивированием

in vitro экстракорпоральным оплодотворением ооцитов и эмбриональным развитием млекопитающих, появилась возможность существенно усовершенствовать метод оплодотворения вне организма.

11.1. Факторы, влияющие на эффективность технологии in vitro

11.1.1. Взаимосвязь морфофункционального состояния яичников и способа выделения ооцитов с эффективностью получения эмбрионов in vitro

Как показали наши исследования, эффективность созревания ооцитов и выход эмбрионов на предимплантационных стадиях взаимосвязана с морфофункциональным состоянием яичников и физиологическим состоянием доноров.

Данные по морфологическим показателям яичников, использованных в процессе получения эмбрионов в культуре in vitro (табл. 84) показали, что длина яичников находилась в прямой зависимости от их объема и колебалась от $26,5 \pm 1,44$ мм (объемом до 4,0 см³) до $39,4 \pm 1,6$ мм (объемом более 8,0 см³). Аналогичная картина наблюдалась и при анализе данных о ширине яичников, которая колебалась от $15,4 \pm 0,97$ (объемом до 4,0 до $25,5 \pm 1,23$ (объемом более 8,0 см³).

Таблица 84 - Морфологические показатели яичников, использованных для получения эмбрионов in vitro

Объем яичника, см ³	Длина яичника, мм	Ширина яичника, мм
До 4,0 (n=13)	$26,5 \pm 1,44$	$15,4 \pm 0,97$
4,1-6,0 (n=20)	$29,4 \pm 1,35$	$18,9 \pm 0,78^{**}$
6,1-8,0 (n=20)	$32,5 \pm 1,58^{**}$	$21,1 \pm 0,96^{***}$
Более 8,0 (n=16)	$39,4 \pm 2,05^{***}$	$25,5 \pm 1,23^{***}$

Таким образом, средние параметры, использованных нами

яичников выглядели следующим образом: объем - $6,9 \pm 0,28$ см³, длина яичников - $31,9 \pm 1,61$ мм, ширина яичников $20,2 \pm 0,99$ мм.

При анализе функциональной характеристики яичников мы учитывали такие показатели как количество, качество и размер фолликулов, наличие циклического желтого тела, персистентного желтого тела, наличие кист, желтого тела беременности, гиподисфункцию яичников.

Взаимосвязь объема яичников с количеством фолликулов и их размерами, а также количеством и качеством ооцитов представлены в таблице 85. Количество антральных фолликулов в зависимости от объема яичников колебалось от $20,2 \pm 1,5$ при объеме яичника до $4,0$ см³ до $29,0 \pm 1,2$ при объеме яичника $6,1-8,0$ см³. Среднее количество антральных фолликулов на яичник составило $25,7 \pm 1,8$. Что касается диаметра фолликулов, то здесь складывается следующая картина. Так, при объеме яичника до $4,0$ см³ количество антральных фолликулов диаметром до 4 мм составляло $13,6 \pm 1,35$, свыше $4,0$ - $7,6 \pm 0,92$. При объеме яичника $4,1-6,0$ см³ данные показатели выглядели следующим образом: количество антральных фолликулов диаметром до $4,0$ мм составляло $17,3 \pm 1,14$, диаметром свыше $4,0$ мм - $8,5 \pm 1,0$. При объеме яичников $6,1-8,0$ см³ и свыше $8,0$ мм³ $19,8 \pm 1,61$; $9,7 \pm 1,13$ и $22,4 \pm 2,83$; $7,5 \pm 1,3$, соответственно. Среднее количество фолликулов диаметром до $4,0$ мм составляло $18,3 \pm 1,73$, свыше $4,0$ мм $8,3 \pm 1,1$. В целом количество антральных фолликулов на один яичник составило $13,3 \pm 1,4$.

Анализ приведенных данных по установлению взаимосвязи количества и размеров фолликулов с количеством и качеством полученных ооцитов показывает, что уровень выхода клеток колебался от $19,3$ - $19,6$ до $34,0$. Причем отмечена достоверная разница по выходу ооцитов между яичниками объемом до $4,0$ - $4,1-6,0$ см³ по сравнению с яичниками объемом, которых составил $6,1-8,0$ см³. В среднем количество ооцитов составило $26,7 \pm 3,86$. Аналогичная тенденция наблюдалась и по выходу качественных ооцитов. Так, выход клеток у яичников объемом $4,1-6,0$ см³ превышал аналогичный показатель яичников диаметром до $4,0$; $6,1-8,0$ и выше $8,0$ см³ на $3,9$; $8,7$ и

8,4%, соответственно.

Таблица 85 - Мофoфункциональные показатели яичников

Показатели		Количество антральных фолликулов			Получено ОКК	
		п	в т.ч.		всего	В т.ч. качественных
			диаметром, мм	п		
Объем яичника, см ³	≤4	20,2±1,5	≤4	13,6±1,3	19,3±3,1	11,3±1,9
			≥4	7,6±0,9		
	4-6	25,3±1,0	≤4	17,3±1,4	34,0±4,53	20,0±2,9
			≥4	8,5±1,0		
	6-8	29,0±1,9	≤4	19,8±1,6	34,0±5,2	16,1±2,9
			≥4	9,7±1,1		
	≥8	28,5±2,8	≤4	22,4±2,8	19,6±2,6	11,6±1,7
			≥4	7,5±1,3		
	в среднем	25,7±1,8	≤4	18,3±1,7	26,7±3,9	14,7±2,4
			≥4	8,3±1,1		

Таким образом, оптимальными параметрами яичников для эффективного получения достаточного по качеству и количеству ооцитов являются следующие: длина яичника - 29,4 мм, ширина - 18,9 мм, объем -4,1-6,0 см³. При этом общий выход ооцитов составляет 34, в том числе 20 качественных.

При изучении эффективности различных способов выделения ооцитов (надрез лезвием бритвы стенки фолликула, рассечение ткани яичника, аспирация) установлено, что при рассечении ткани яичника общее количество яйцеклеток колебалось от 19 до 121 при среднем показателе 54,5±8,85, и на 58,4 и 56,9% оказалось выше по сравнению с надрезом фолликула и аспирацией, соответственно (табл. 86). Аналогичная картина наблюдалась и по выходу качественных клеток. При рассечении ткани яичника выход качественных ооцитов превышал аналогичный показатель при использовании метода надреза фолликула и аспирации более чем в два раза.

Таблица 86 - Сравнительная эффективность различных способов выделения ооцитов

№ опыта	Надрез стенки фолликула лезвием безопасной бритвы		Рассечение ткани яичника лезвием безопасной бритвы		аспирация	
	Выделено ооцитов		Выделено ооцитов		Выделено ооцитов	
	всего	пригодных	всего	пригодных	всего	пригодных
1	49	21	27	10	55	23
2	38	12	39	18	71	31
3	19	7	41	20	29	12
4	27	18	100	47	19	9
5	21	13	19	8	7	5
6	17	9	78	29	11	7
7	20	10	33	21	13	5
8	37	19	44	19	21	10
9	15	10	121	58	17	8
10	12	5	113	61	31	20
11	11	7	27	13	15	10
12	13	6	32	16	16	7
13	15	7	78	30	11	6
14	38	21	22	9	23	13
15	9	7	44	20	13	7
итого	341	182-53,4%	818	379-46,3%	352	173-49,2%
M±m _m	22,7±1,16	11,5±1,46	54±8,8	25,3±4,39**	23,5± 4,54	11,5±1,93

Но в тоже время процентное соотношение жизнеспособных ооцитов, к общему количеству полученных оказалось в пользу первой группы клеток против 46,3% - во второй, и на 49,2% - в третьей.

Таким образом, полученные результаты по выходу жизнеспособных клеток свидетельствуют, что, рассечение ткани яичника является более эффективным способом выделения ооцитов по сравнению с надрезом фолликула и аспирацией.

11.1.2. Влияние температуры среды и длительности кратковременного хранения яичников на выход и качество ранних зародышей

В задачи исследований входило определение наиболее оптимальных параметров температуры, состава среды и длительность кратковременного хранения яичников вне организма, а также влияние этих факторов на выше 7. качество ранних зародышей.

Представленные результаты исследований по изучению влияния среды для кратковременного хранения яичников на эффективность получения эмбрионов показывают, что существенных различий по данному показателю практически не было (табл. 87).

Таблица 87 - Влияние среды хранения яичников на эффективность получения эмбрионов вне организма

Группы	Среда	Количество ооцитов, п	Уровень дробления		Выход Мо-В1	
			п	%	п	%
Контроль	Физ. раствор	507	208	41,0	75	14,8
Опыт	Дюльбекко	572	282	49,3	106	18,5
	Хенкса	632	309	48,9	125	19,8
	ТС-199	538	241	44,8	103	19,1
итого опыт		2249	1040	46,2	409	18,2

Уровень дробления после оплодотворения колебался от 44,8% при использовании среды ТС-199 до 49,3% при использовании солевого раствора Дюльбекко. Аналогичные показатели получены и по выходу жизнеспособных эмбрионов. Следует отметить тот факт, что использование для кратковременного хранения физиологического раствора снизило выход полноценных эмбрионов по сравнению с остальными средами на 3,7 - 5,0%, хотя количество дробящихся зародышей находилось на уровне первых трех вред.

На эффективность кратковременного хранения яичников оказывает влияние не только состав среды, но и ее температура, а также продолжительность хранения. Как показали наши исследования при температуре 20-25 и 2-4 °С продолжительность хранения не должна превышать 3-6 часов, а при температуре 32-36 °С – 3 часа. Невыполнение данных условий приводит к значительному снижению эффективности работы (табл. 88).

Таблица 88 - Влияние продолжительности и температуры хранения на эффективность оплодотворения ОКК в культуре *in vitro*

Показатели	Температура хранения, °С											
	32-36				20-25				2-4			
	Продолжительность хранения, ч											
	≤3	3-6	6-9	9-12	≤3	3-6	6-9	9-12	≤3	3-6	6-9	9-12
Оплодотворено ОКК, п	273	229	186	210	209	195	182	187	139	147	165	127
Уровень дробления, %	55,7	38,0	30,1	27,6	50,7	50,3	50,5	49,2	48,3	52,4	57,6	46,5
Выход Мо-Бл, %	25,3	10,5	7,0	1.0	26,3	26,7	19,8	20,9	27,3	22,4	18,2	14,2

11.1.3. Влияние физиологического состояния доноров яичников на эффективность получения эмбрионов вне организма

Как правило, в качестве доноров яичников используются животные и возрастов, продуктивности, на разных стадиях полового цикла и с различным функциональным состоянием яичников. Чтобы установить, каким образом физиологическое состояние доноров влияет на эффективность работы по получению эмбрионов на ранних стадиях развития вне организма нами проведены исследования по изучению влияния возраста на количество и качество эмбрионов, а также выход эмбрионов (табл. 89).

Таблица 89 - Влияние возраста доноров на количество и качество эмбриопродукции

Показатели		Возраст доноров			
		Телки случного возраста	коровы (лактация)		
			1-3	4-5	6 и более
Качество использованных доноров, п		11	10	18	15
Получено ооцитов всего, п		319	310	740	435
в т.ч. на донора		29±1,4	31,0±2,1	41,1±1,1	29±1,8
Получено качественных ооцитов всего	п	159	180	423	187
	%	49,8	58,1**	57,2***	42,9
в т.ч.на донора		14,5±2,1	18,0±1,9	23,5±2,2	12,5±1,3
Оплодотворено ооцитов, п		159	180	423	187
Уровень дробления	п	101	107	278	102
	%	63,5	59,4	65,7	54,5
Выход Мо-Бл	п	31	51	90	28
	%	19,5	28,3	21,3	14,9

Установлено, что наибольшее количество качественных ооцитов получено от доноров 1-3 и 4-5 лактации (58,1 и 57,2% соответственно), что на 8,3 и 15,2% и на 7,4 и 14,3% выше по сравнению с телками случного возраста и коровами старше 6-й лактации. Соответственно и выход созревших ооцитов в расчете на донора оказался выше: 18,0 и 23,5% против 14,5% у телок и 12,5% у животных старше 6-й лактации.

Аналогичная зависимость наблюдалась и по уровню дробления и выходу жизнеспособных эмбрионов. Самый низкий уровень дробления оказался у доноров 6-ой и более лактации и составил 54,5%, что на 9-11,2% по сравнению с другими возрастными группами. Использование яичников от доноров старше 6-й лактации снизило выход качественных эмбрионов на 4,8% по сравнению с телками, на 13,4% по сравнению с живот-1-3 лактации и на 6,4% по сравнению с донорами 4-5 лактации.

Таким образом, оптимальным возрастом доноров для получения ооцитов являются животные 1-3 и 4-5 лактации. Их использование позволяет получить до 59,4 - 65,7% дробящихся зародышей от числа поставленных на созревание и до 28,3 - 21,3% жизнеспособных эмбрионов, соответственно.

На следующем этапе мы изучали влияние уровня продуктивности на эффективность получения эмбрионов вне организма. В опыте и животные с продуктивностью 5-6, 6-7 и свыше 7 тыс. кг. молока за лактацию. Анализ полученных данных показывает, что показатели а и качества полноценных ооцитов и эмбрионов были выше у с продуктивностью 5-6 тыс. кг. молока. Так по количеству ооцитов донора эта разница составила 9,6 и 9,7 ооцита, а по выходу жизнеспособных ооцитов на 5,8 и 11,4% по сравнению с донорами с продуктив-6-7 и более 7 тыс. кг. молока за лактацию, соответственно (табл. 90).

Таблица 90 - Влияние продуктивности доноров на количество и качество эмбрионов

Показатели		Продуктивность доноров, тыс. кг		
		5-6	6-7	7 и более
Количество использованных доноров, п		21	10	7
Получено ооцитов, всего п		777	274	191
На донора		37,0±2,4	27,4±2,1	27,3±2,3
Получено качественных ооцитов, всего	п	487	156	98
	%	62,7	56,9	51,3
На донора		23,2±1,8	15,6±2,0	14,0±1,4
Оплодотворено ооцитов, п		487	156	98
Уровень дробления	п	298	102	58
	%	61,2	65,4	59,2
Выход Мо-В1	п	143	40	34
	%	29,4	25,6	34,7

По уровню оплодотворения и выходу эмбрионов на предимплантационных стадиях можно сказать следующее. Если по уровню дробления показатели были примерно одинаковыми (59,2 - 65,4%), то по выходу зародышей на стадии морула-

бластоциста лучшие показатели отмечались у доноров с продуктивностью более 7 тыс. кг. молока. При использовании таких доноров выход эмбрионов на данной стадии увеличивался на 5,3 и 4 по сравнению с донорами с продуктивностью 5-6 и 6-7 тыс. кг молока за лактацию.

Таблица 91 - Использование животных, больных маститом и эндометритом, в качестве доноров ооцитов

Показатели		группы животных		
		здоровые	эндометрит	мастит
Количество использованных животных, гол/		17	17	9
Получено ооцитов, всего, п		425	629	300
Получено ооцитов на донора, п		25±0,73	37,III,32	33,3±2,21
Получено качественных ооцитов, всего	п	268	241	161
	%	63,0***	38,3	53,7
Получено качественных ооцитов на донора, (п)		15,8±0, 71	14,2+1,81	17,8±1,87
Оплодотворено ооцитов		150	241	161
Уровень дробления	п	91	109	91
	%	60,7	45,2	56,5
Выход Мо-В-1	п	34	16	22
	%	22,7*	6,6	13,7

Установлено, что заболевание эндометритом достоверно снижает выход ооцитов на 24,7%, а заболевание маститом на 9,3% по с контрольной группой. Выявлено, что уровень оплодотворения ооцитов, полученных от доноров заболевших маститом практически не отличался от контрольной группы и составил 56,5% в (контроле - 60,7%). В время выход морул-бластоцист снижался на 9% (22,7% в контроле и л в опыте). Заболевание эндометритом снижало как уровень дробления (на 15,5%), так и выход предимплантационных зародышей (на 16,1%).

Одним из наиболее важных показателей влияющих на эффективность дальнейшей работы по получению эмбрионов в

культуре *in vitro* от созревания до оплодотворения является морфофункциональное состояние яичников. До настоящего времени идет спор о том, на какой стадии полового цикла лучше всего получать ооциты. Проведенные и проводимые исследования по этому вопросу однозначного ответа не дали. Получаемые данные нестабильны и носят противоречивый характер.

Исследования по оценке эффективности получения эмбрионов в культуре *in vitro* в зависимости от функционального состояния яичников показали, что по уровню дробления значительно более высокие результаты попри использовании ооцитов из яичников первых 3-х групп (на фолликулярной и лютеиновой фазе полового цикла, а также с желтым телом беременности). Использование яичников с персистентным желтым те-с кистой и с гипофункцией резко снижало уровень дробления. Так, средний уровень дробления при использовании яичников первых трех составлял 58,1%, то последних 3-х всего лишь 33%, то есть на 25,1% (табл. 92).

Таблица 92 - Влияние физиологического состояния яичников на эффективность получения эмбрионов вне организма

Физиологическое состояние яичников	Показатели				
	оплодотворенно, n	уровень дробления		Выход Мо-Бл	
		n	%	n	%
Фолликулярная фаза	100	61	61,0	33	33,0
Лютеиновая фаза	103	59	57,3	25	24,3
Желтое тело цикла	95	53	55,8	20	21,1
Персистентное желтое тело	112	36	32,1	4	3,6
Киста	103	40	38,8	3	2,9
Гипофункция	27	4	14,7	-	-

Аналогичная картина наблюдалась и по выходу жизнеспособных эмбрионов. Выход морул и бластоцист у яичников на фолликулярной стадии составил 33% и превысил

аналогичный показатель яйчников в лютеиновую на 8,7%, с желтым телом беременности - на 11,9%, с персистентным желтым телом - на 29,4%, с кистозным преобразованием - на 30,1%. При использовании яйчников с гипофункцией полноценных эмбрионов не получено.

Установлено, что наиболее эффективным в наших исследованиях оказалось использование яйчников в фолликулярной фазе. Однако следует отметить, что в работу необходимо включать весь полученный биоматериал, несмотря на его морфофункциональное состояние, особенно если донор I в себе высокоценную генетику.

С целью изучения оплодотворяемости ооцитов в зависимости от их содержания в одном яйчнике было сформировано три группы: I - яйчники, из которых выделено менее 10 ооцитов, II - от 10 до 20, III - более 20 клеток. Анализ данных свидетельствует, что наиболее эффективной по уровню дробления оказалась группа с количеством ооцитов от 10 до 20 на один яйчник - на 5,7% по сравнению с третьей и на 11,4% по сравнению с первой группой (табл. 93).

Таблица 93 - Оплодотворяемость ооцитов в зависимости от их среднего количества в яйчнике

Группы ооцито	Кол-во ооцитов в яйчнике	Количество прокультивированных ооцитов, п	Количество оплодотворенных ооцитов, п	Уровень дробления		Выход Мо-Бл	
				п	%	п	%
I	<10	154	154	73	47,4	42	27,3
II	10-20	250	250	147	58,8	53	21,2
III	>20	290	290	154	53,1	64	22,1

По выходу жизнеспособных эмбрионов более высокие результаты получены при использовании яйчников I группы. Выход зародышей на предимплантационных стадиях в этой группе превышал на 6,1 и 5,2% вторую и третью группы, соответственно.

11.2. Использование биологически активных веществ в культуральных системах *in vitro*

11.2.1. Эффективность использования фолликулярной жидкости в культуральных системах *in vitro*

Для получения фолликулярной жидкости ее аспирировали из фолликулов заданного диаметра. Для предотвращения коагуляции добавляли гепарин в концентрации (0,1 мг/мл). Затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут, фильтровали через миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,22 μm и замораживали и по мере необходимости оттаивали.

В процессе экспериментов определялась эффективность использования фолликулярной жидкости из фолликулов диаметром 2-3 мм, 3-6 мм и > 6 мм фолликулярной жидкости из фолликулов коров, находящихся в лютеиновой и фолликулярной фазах полового цикла в концентрации 5, 10, 15 и 20% от объема питательной среды.

Результаты эффективности использования фолликулярной жидкости крупного рогатого скота из фолликулов разного диаметра представлены в таблице 94.

Таблица 94 - Эффективность использования фолликулярной жидкости крупного рогатого скота из фолликулов разного диаметра и разные фазы цикла

Группа	Диаметр фолликулов, мм; фаза цикла	Кол-во ооцитов, n	Количество дробящихся, n-%	В том числе	
				Мо+Бл, n-%	Из них Бл, n-%
1.	контроль	110	57 - 54,8	38 - 34,5	13 - 11,8
2.	2-3 мм	97	65 - 67,0	39 - 40,2	14 - 14,4
3.	3-6 мм	130	75 - 57,6	54 - 41,5	17 - 13,1
4.	> 6 мм	84	41 - 48,8*	30 - 35,7	10 - 11,9
5.	Фолликулярная фаза	68	37 - 54,4	20 - 29,4	7 - 10,3
6.	Лютеиновая фаза	73	36 - 49,3	16 - 21,9	6 - 8,2

Анализ результатов, представленных в таблице 1, показывает, что уровень оплодотворения во второй группе на 9,4 – 18,2% превышал уровень оплодотворения в других группах. При этом разница между второй и четвертой группами оказалась достоверной ($P < 0,05$). По выходу эмбрионов на предимплантационных стадиях у второй и третьей групп показатели получены практически одинаковые 40,2 и 41,5%, соответственно, что на 5,7; 4,5 и 7; 5,8% выше по сравнению с контролем и четвертой группой, ооциты которой культивировались в присутствии фолликулярной жидкости из фолликулов диаметром более 6 миллиметров.

Что касается уровня выхода эмбрионов на стадии развития бластоциста, то здесь особых различий не наблюдалось, колебания составляли от 11,9% в присутствии фолликулярной жидкости из больших фолликулов до 14,4% из малых фолликулов (2-3 мм). В контроле данный показатель составил 11,8%. По качеству все бластоцисты были отличными. Уровень трансформации морул в бластоцисты в контроле составил 34,2%, в первой опытной – 35,9%, во второй – 31,5% и в третьей – 33,3%.

Таким образом, достоверных различий по выходу эмбрионов на стадии бластоциста в ходе опытов не установлено, что также относится и к эффективности использования фолликулярной жидкости от доноров, находящихся на разных стадиях полового цикла.

В таблице 95 представлены результаты исследований по определению влияния концентрации фолликулярной жидкости на эффективность получения эмбрионов в системе *in vitro*.

Как видно из приведенных данных наиболее эффективным оказалось использование фолликулярной жидкости в концентрации 10%. Так, выход дробящихся зародышей в этой группе составил 65,2%, что достоверно превышало данный показатель в группе ооцитов, культивировавшихся в присутствии 5% фолликулярной жидкости ($P < 0,01$) и в группе ооцитов, культивировавшихся в присутствии 20% фолликулярной жидкости ($P < 0,05$). Общий выход морул-

бластоцист в этой группе превышал аналогичный показатель в первой группе на 4,4%, в третьей на 5,2% и в четвертой на 8,1%; в том числе по выходу бластоцист на 3,8%; 2,1%; 3,2%, соответственно. Что касается качества бластоцист, то наиболее низкий показатель оказался в группе ооцитов с концентрацией фолликулярной жидкости 20% и составил 66,7%, что на 33,3%; 26,6%; 22,2% ниже по сравнению с первой, третьей и четвертой группами, соответственно.

Таблица 95 - Влияние концентрации фолликулярной жидкости на уровень оплодотворения и выход жизнеспособных зародышей

№ п/п	Конц. фол. ж-ти, %	Кол-во ооцитов, п	Количество зародышей, п - %		
			дробящихся	Мо-Бл	в том числе
					Бл
1.	5	96	43–44,8***	20–20,8	7–7,3
2.	10	135	88–65,2	34–25,2	15–11,1
3.	15	100	55–55,0	20–20,0	9–9,0
4.	20	114	57–50,0**	19–16,7	9–7,9

In vivo фолликулярная жидкость является естественной средой созревания и развития ооцитов. В искусственных условиях для обеспечения необходимых условий созревания ооцитов и культивирования ранних зародышей чаще всего используется эстральная сыворотка крупного рогатого скота, включающая многочисленные компоненты, в том числе гормоны факторы роста и белки, способствующие эффективному созреванию ооцит-кумулюсных комплексов.

В таблице 96 представлена сравнительная эффективность использования в культуральных системах фолликулярной жидкости и эстральной сыворотки крупного рогатого скота.

Добавление данных компонентов в питательную среду проводилось в два этапа. В среде для созревания их концентрация составляла 5% от объема среды, через 96 часов после оплодотворения добавлялось еще 10%. Как показывает анализ полученных результатов достоверной разницы ни по

одному из показателей не установлено, за исключением выхода эмбрионов на предимплантационной стадии, в том числе бластоцист. В случае использования фолликулярной жидкости выход эмбрионов на 1,3%, а бластоцист на 2,2% был выше по сравнению с эстральной сывороткой. Что касается качества полученных зародышей - в первой группе данный показатель (Мо+Бл) превышал показатель второй группы на 5,8%, в то время как по качеству бластоцист получены обратные результаты. Качество эмбрионов, полученных в присутствии эстральной сыворотки, превышало аналогичный показатель первой группы на 22,2%.

Таблица 96 - Сравнительная эффективность использования в системе *in vitro* фолликулярной жидкости и эстральной сыворотки крупного рогатого скота

№ п/п	БАВ	Количество ооцитов, п	Количество зародышей, п - %		
			дробящихся	в том числе	
				Мо+Бл	из них Бл
1.	Фолликулярная жидкость	78	50 – 64,1	15–19,2	9–11,5
2.	Эстральная сыворотка	118	77 – 65,2	21–17,8	11–9,3

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что использование в культуральных системах *in vitro* фолликулярной жидкости наиболее эффективно, когда она получена из фолликулов диаметром 2-6 мм и добавлена в питательную среду в концентрации 10%. Такой вариант ее использования обеспечивает уровень оплодотворения 57,6 – 67,0%, а выход бластоцист 13,1 – 14,4% от числа поставленных на созревание ооцитов. При сравнительном анализе эффективности использования фолликулярной жидкости и эстральной сыворотки крупного рогатого скота достоверной разницы не установлено. Все показатели находились практически на одном уровне.

11.2.2. Эффективность использования эстральной сыворотки в культуре *in vitro*

Несмотря на достаточно высокий уровень разработки данной проблемы эффективность получения биологически полноценных эмбрионов в системе *in vitro* остается на сравнительно невысоком уровне. По некоторым данным [6, 8], в лучших лабораториях мира выход качественных зародышей (стадия бластоцисты) не превышает 35-40% от числа поставленных на созревание ооцитов, а в среднем этот показатель колеблется от 10 до 20% и зависит от ряда экзо- и эндогенных факторов, к которым, в первую очередь, относится создание оптимального газового и влажностного режимов культивирования, а также обеспечение растущих и развивающихся клеток необходимыми гормональными и энергетическими добавками.

В связи с выше сказанным, целью наших исследований явилось определение эффективности использования сыворотки крови крупного рогатого скота в системе *in vitro*.

Для полноценного созревания ооцитов в культуре *in vitro* им необходимо создать условия максимально соответствующие естественным, то есть тем, в которых обеспечивается нормальное функционирование механизмов регуляции оогенеза *in vivo*. При этом необходимо понимать, что созревание ооцитов - это комплексный процесс, включающий в себя мейотическое преобразование ядра, цитоплазматическое созревание и преобразование мембраны. Поэтому, если для завершения ядерного созревания *in vitro* ооцитам достаточно обеспечить в средах энергетический и гормональный минимум, то цитоплазматическое созревание обеспечивается целым рядом биологически активных веществ, обеспечивающих в дальнейшем успешное оплодотворение яйцеклетки и развитие ранних зародышей до предимплантационных стадий. Также необходимо отметить, что системы культивирования, используемые в разных лабораториях, могут сильно отличаться как по типам и дозам гормонального и энергетического

субстрата, так и по типам основных питательных сред, объему культуральной среды и плотности ооцитов на единицу объема [2, 5, 7], а также использованию различных монослойных культур и клеток. Для культивирования ооцитов используют стандартные среды: ТС-199, Бринстера, Биггера, ХЭМ-Ф-10, в которые добавляют сыворотки крови крупного рогатого скота или северных оленей, а также гормоны и другие, биологически активные вещества. Сыворотка крови, добавляемая в питательную среду в качестве биологически активной добавки для повышения выхода ооцитов со стадией развития метафаза-2 по некоторым данным, стабилизирует рН, оказывает антипротеолитическое действие и способствует более быстрой адаптации культивируемых объектов условиям культуральных сред. Кроме этого, сыворотка крови содержит компоненты, способствующие выживанию и развитию клеток, среди которых особое значение имеют полипептидные факторы роста (ППФР), а именно: инсулиноподобный фактор (ИФР), факторы роста эпидермиса (ФРЭ), тромбоцитов (ФРТ) и фибробластов (ФРФ). В настоящее время получены данные только о действии ППФР на процессы мейотического деления клеток.

На практике используется как сыворотка плодов телят, так и сыворотка коров. Если фетальная сыворотка плодов коровы производится на коммерческой основе и ее качество контролируется производителем, то эстральная сыворотка получается в частном порядке от клинически здоровых доноров в тот же период полового цикла, что и возраст эмбриона или в период непосредственной охоты.

В своих исследованиях мы изучали эффективность использования сыворотки крови, полученной от коров, находящихся на разных стадиях полового цикла, добавляя ее в питательную среду по мере роста и развития эмбрионов, согласно их возрасту, то есть в питательную среду с эстральной сывороткой (0 день) помещались зиготы. Эмбрионы, на вторые сутки после оплодотворения помещались в среду с сывороткой второго дня цикла и т.д.

По результатам исследований установлено достоверное превосходство второй и третьей групп клеток по выходу морул и бластоцист от числа оопитов поставленных на созревание по сравнению с контрольной - 41,6% и 48,4%, соответственно против 18,2% ($P < 0,001$). В том числе, по выходу бластоцист данный показатель превышал контроль на 7,0 и 9,8 % при $P < 0,05$ и $P < 0,01$, соответственно. Между второй и третьей группами достоверных различий не установлено.

Таким образом, использование в культуральных системах сыворотки крови от коров на разных стадиях полового цикла не снижает эффективности метода. Однако из-за достаточной сложности самой процедуры предпочтительней использовать сыворотку крови, полученную от коров в период охоты.

Как правило, кровь для получения сыворотки берется у животных во время спонтанного полового цикла, когда наличие и концентрация биологически активных веществ в ней отвечает физиологической норме животного на данный момент времени. Однако с разработкой методов гормональной регуляции полового цикла появилась возможность стимулировать активность физиологических процессов в организме животного. Так, при гормональной обработке коров-доноров с целью вызывания множественной овуляции к росту стимулируется не один фолликул, как обычно, а несколько, что вызывает определенные сдвиги в гормональном фоне животного в сторону увеличения концентрации тех гормонов, которые непосредственно отвечают за фолликуло-и эмбриогенез - гормоны гипофиза, яичников, щитовидной железы и надпочечников. В связи с чем, встает закономерный вопрос об эффективности использования сыворотки крови от суперовулировавших коров-доноров в культуре *in vitro* при получении эмбрионов крупного рогатого скота.

В наших исследованиях донорами крови служили одни и те же животные, у которых была взята кровь на 0, 6 и 7 день спонтанного и стимулированного полового цикла. Нулевой день - это день охоты, шестой день - день, предшествующий

извлечению эмбрионов (стимулированный половой цикл) и седьмой день - это день извлечения эмбрионов.

Установлено что уровень дробления ранних зародышей в опытной группе (стимулированный половой цикл) хотя и не достоверно, но был выше по сравнению с контрольной группой (спонтанный половой цикл) на 11,7; 7,8 и 8,8% при использовании сыворотки крови, полученной на нулевой, шестой и седьмой дни полового цикла, то разница по выходу эмбрионов на стадии морула-бластоциста была уже в пользу контрольной группы при использовании сыворотки нулевого дня на 5,3%, шестого дня на 1,6% и седьмого дня на 6,3%. В том числе, по выходу бластоцист данный показатель составил 1,9; 2,9 и 3,5%, соответственно.

При этом следует отметить, что использование сыворотки нулевого дня как в контрольной, так и в опытной группе оказалось более эффективной по сравнению с сывороткой шестого и седьмого дня в контрольной группе на 10,1% и 8,2% и в опытной на 6,1 и 9,2%. В том числе, по выходу бластоцист превышение составляло 6,6 и 8,0%; 7,6 и 9,6%, соответственно. Снижение результативности получения эмбрионов на предимплантационной стадии при использовании сыворотки крови коров, полученной в стимулированный половой цикл, скорее всего можно объяснить повышенной гормональной нагрузкой на организм животного и определенным изменением гормонального фона по сравнению со спонтанным половым циклом.

Помимо изучения эффективности использования сыворотки, полученной в стимулированный половой цикл, нами изучалась эффективность в системе *in vitro* сыворотки, полученной в период непосредственно гормональной обработки (табл. 97). Кровь у доноров брали в течение четырех дней обработки спустя 3 часа после утренней инъекции гонадотропина. Из полученных данных, что уровень дробления в контрольной группе достоверно превышал уровень дробления в остальных группах ($P < 0,001$). Аналогичные показатели получены и по выходу эмбрионов на

предимплантационных стадиях. Так, общий выход морул-бластоцист в контрольной группе превысил опытные на 17,7 - 23,3%, в том числе бластоцист на 11,9 -21,7%.

Такое снижение эффективности получения эмбрионов в культуре *in vitro* при использовании сыворотки крови, полученной в процессе инъекции гонадотропных гормонов можно объяснить стрессовым состоянием животного в этот период, когда в кровь вырабатывается большое количество кортизола.

Таблица 97 - Эффективность использования сыворотки крови коров-доноров, полученной в период гормональной обработки

Группа	День обработки (взятие крови)	Кол-во овул.	Кол-во ооцитов	Количество зародышей, n-%		
				В том числе		
				Дробящихся, всего	в том числе	
					Мо+Бл	Бл
1	контроль	-	285	197-69,1**	106-37,2	27-25,5
2	1	10-13	154	73-47,4	30-19,5	2-6,7
		3-6	149	76-51,0	23-15,4	2-8,7
		0-2	136	62-45,6	23-16,9	2-8,7
3	2	10-13	143	55-38,5	24-16,8	3-12,5
		3-6	129	52-4,3	18-13,9	2-11,1
		0-2	151	63-41,7	29-19,2	3-10,3
4	3	10-13	137	71-51,8	22-16,0	2-9,1
		3-6	155	77-49,7	22-14,2	3-13,6
		0-2	152	75-49,3	24-15,8	2-8,3
5	4	10-13	136	53-38,9	26-19,1	1-3,8
		3-6	148	70-47,3	26-17,6	2-7,7
		0-2	143	70-48,9	20-14,0	1-5,0

Как было установлено предыдущими исследованиями, наиболее оптимальной является эстральная сыворотка крупного рогатого скота в концентрации от 5% при созревании ооцитов до 15% по мере роста и развития зародыша. В какие периоды

увеличение концентрации сыворотки является наиболее эффективным, мы попытались установить в одном из своих опытов, результаты которого представлены в таблице 98.

Таблица 98 - Эффективность получения ранних зародышей в культуре *in vitro* в зависимости от времени добавления эстральной сыворотки

№ п/п	Интервал времени, ч	Конц-я сыв-ки, %	Количество, п		Количество зародышей, п - %		
			опытов	ооцит ов	дробящихся	в том числе	
						Мо+Бл	Бл
1	24	15	3	115	55-47,8	33-60	10-18,2
		20	3	115	62-53,9	35-56,4	8-12,9
2	48	15	3	125	71-56,8	36-50,7	14-19,7
		20	3	120	60-50	27-45,0	8-13,3
3	72	15	3	97	52-53,6	36-69,2	12-23,1
		20	3	85	52-61,2	35-67,3	10-19,2
4	96	15	3	111	70-63,1	58-82,8**	24-34,3
		20	3	120	65-54,2	49-75,4**	18-27,7
5	120	15	3	131	65-9,6	35-53,8	12-18,5
		20	3	113	52-46,0	23-4,2	6-11,5

Как и в предыдущих наших исследованиях колебания уровня дробления во всех случаях не отличалось какой-либо закономерностью и составляло от 46,0 до 63,1%, чего нельзя сказать о выходе морул и бластоцист, наиболее высокий уровень которых наблюдался при добавлении сыворотки через 96 часов после оплодотворения и составлял 75,4% (при концентрации сыворотки 20%) и 82,8% (при концентрации сыворотки 15%) от числа дробящихся зародышей. В среднем - 79,2%, что на 11,2% и 29,7% превышал средний показатель выход зародышей на данной стадии развития при добавлении сыворотки через 72 и 120 часов, соответственно. При этом во втором случае разница высоко достоверна ($P < 0,001$). Таким образом использование в культурных системах сыворотки крови коров, находящихся на разных стадиях полового цикла, позволяет увеличить выход бластоцист на 9,8% по сравнению с контролем. Наиболее оптимальным периодом времени увеличения концентрации

сыворотки в процессе культивирования ранних зародышей является интервал в 96 часов. Выход морул-бластоцист от числа дробящихся клеток увеличивался на 11,2 и 29,7% по сравнению с интервалом времени в 72 и 120 часов при достоверной разнице $P < 0,001$. Использование сыворотки крови коров в стимулированный половой цикл снижало выход бластоцист на 1,9 - 3,5%; в период гормональной обработки на 11,9 - 21,7% при достоверной разнице - $P < 0,001$.

11.2.3. Оценка эффективности получения эмбрионов в системе *in vitro* в условиях разной концентрации CO_2 в атмосфере

Состав газовой фазы, используемой при культивировании клеток ооцитов *in vitro*, определяется тремя факторами: типом среды, использованием открытых или закрытых емкостей, а также необходимой буферной емкостью. Некоторые параметры культивирования могут варьироваться, но должно соблюдаться одно неперемное условие – концентрация бикабоната и углекислого газа должны находиться в равновесии. Этот бкфер был выбран главным образом потому, что он соответствует физиологической буферной системе крови, а парционное давление CO_2 в легких составляет 40 мм рт.ст., что соответствует 5%.

Целью исследований являлось изучение влияния различных концентраций углекислого газа в атмосфере на процессы созревания и оплодотворения яйцеклеток крупного рогатого скота.

Известно, что концентрации углекислого газа в воздухе, окружающем созревающие ооциты и развивающиеся ранние зародыши, оказывает непосредственное влияние на кислотность среды, в которой находятся половые клетки, а значит жизненно важна для создания оптимальных условий культивирования.

Данные о влиянии концентрации углекислого газа в инкубаторе на эффективность созревания и оплодотворения яйцеклеток крупного рогатого скота, а также развитие ранних

зародышей до предимплантационной стадии (табл. 101) показали, что количество клеток, вступивших в дробление, во II и III группах находилось практически на одном уровне: 62,3% при 7%-ной концентрации CO_2 и 67,0% при 5,0%-ной концентрации CO_2 . Несколько ниже (54,7%) был получен результат при наличии в воздухе 3%-ной концентрацией CO_2 . Общее количество эмбрионов, достигших стадии развития морула - бластоциста (от количества дробящихся), колебалось от 22,2% при наличии в воздухе 7%-ной концентрации CO_2 до 35,3% при 3%-ной, что свидетельствует о менее благоприятном влиянии повышенных концентраций углекислого газа на благополучное развитие зародышей до более поздних стадий и тем самым способствует их дальнейшему культивированию. Так, из 82 дробящихся зародышей при условии 3%-ной концентрации CO_2 до стадии бластоциста развилось только 12 (14,6%), при 7%-ной концентрации CO_2 данный показатель находился на уровне 3,7%, в то время как при 5%-ной концентрации газа уровень трансплантации дробящихся клеток в бластоцисты составил 22,4% , из которых 86,7% зародыши отличного качества.

Таблица 99 - Влияние концентрации CO_2 в воздухе на эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro*

Концентрация CO_2 ,%	Количество		Количество зародышей, п- %		
	опытов	ооцитов	дробящихся	в том числе	
				Мо+Бл	из них
					Бл
3	5	150	82-54,7	29 -35,3	12-14,6
5	5	200	134 -67,0	42-31,3	30 -22,4
7	5	130	81 -62,3	18- 22,2	3-3,7

По мере своего развития клетки монослоя так же, как и сами эмбрионы, выделяют в окружающую среду в качестве продукта своей жизнедеятельности углекислый газ и тем самым повышают его концентрацию в воздухе. Влияние снижения

концентрации CO_2 в атмосфере по мере роста и развития эмбрионов и клеток кумулюса на уровень эффективности культивирования представлено в таблице 99.

Таблица 100 - Влияние снижения концентрации CO_2 в воздухе по мере роста и развития зародышей

Группы ооцитов	Количество		Количество зародышей, п -%		
	опытов	ооцитов	дробящихся	в том числе	
				Мо+Бл	Бл
Контрольная	5	150	95 -63,3	20-21,0	7 -7,4
опытная	5	170	98-57,6	29 -29,6	14 -14,3

Так, при культивировании ооцитов опытной группы концентрация CO_2 снижалась с момента оплодотворения до окончания опыта с 5,0 до 3,8%, в то время как в контрольной группе содержание углекислого газа в воздухе оставалось постоянным - 5,0%.

Как показывает анализ данных, представленных уровень дробящихся зародышей был несколько выше в контрольной группе на 5,7%. Выход бластоцист в опытной группе превышал контрольную на 6,9%, что свидетельствует о положительном эффекте снижения концентрации CO_2 в воздухе по мере роста и развития ранних зародышей.

Питательная среда представляет собой раствор определенного состава, к которому добавляются компоненты различного биологического происхождения (добавки плазмы, сыворотки крови, тканевые экстракты и т.д.). Минеральные компоненты в этих растворах подбираются так, чтобы они выполняли буферную функцию, поддерживая постоянный кислотно-щелочной баланс среды в процессе культивирования. Постоянство pH является одним из основных условий культивирования. В связи с чем вопрос взаимодействия углекислого газа с различными по составу средами вызывает

определенный интерес. В нашем случае это среда ТС-199 и среда Менезо (табл. 101).

Таблиц 101 - Влияние концентрации CO₂ на эффективность получения эмбрионов в культуре in vitro в зависимости от используемых сред

среда	Концен трация CO ₂ , %	Количество		количество зародышей, п -%		
		опытов	ооцитов	дробящихся я,	в том числе	
					Мо+Бл	из них Бл
ТС-199	3	5	150	48 -32,0	4 -8,3	-
	4	5	120	42 -35,0	6 -14,3	1-16,7
	5	5	95	56 -58,9	12-21,4	5 -41,7
Менез о	3	5	120	49-40,8	5 -10,2	1 -20,0
	4	5	120	45 -37,5	8-17,8	3 -37,5
	5	5	135	79 -58,5	17 -21,5	7 -41,2

Анализ данных показывает, что уровень дробления зародышей колебался от 32 до 58,9% при использовании ТС-199 и от 37,5 до 58,5% в присутствии среды Менезо при концентрации CO₂ от 3,0 до 5,0%. При этом наиболее высокие результаты, как и в предыдущих опытах, получены при 5,0%-ной концентрации CO₂ (58,9 и 58,5% соответственно). Что касается выхода бластоцист, то среда Менезо показала более высокую эффективность по сравнению с ТС-199 по мере снижения концентрации CO₂ в воздухе. Так, если при 5,0%-ной концентрации CO₂ выход бластоцист практически не различался (41,7 и 41,2%), то при концентрации углекислого газа 4% эта разница увеличилась до 20,8%. К сожалению небольшая выборка эмбрионов не позволяет судить о достоверности полученных результатов, однако тенденция увеличения выхода бластоцист очевидна, причем если при 3%-ной концентрации CO₂ с использованием ТС-199 не получено ни одной бластоцисты, то в случае со средой Менезо получена одна бластоциста из 5 морул (20%). Таким образом, оптимальной

концентрацией CO_2 в атмосфере культуральной системы является 5%, позволяющей получать до 22,4% бластоцист от числа дробящихся зародышей. Снижение концентрации углекислого газа по мере роста и развития клеток повышает выход бластоцист (эмбрионов) по сравнению с контролем на 6,9%. Использование среды Менезо показало более высокую эффективность по сравнению с ТС-199 по мере снижения концентрации CO_2 в окружающем воздухе. При 4%-ной концентрации CO_2 выход бластоцист увеличился на 20,8%, при 3%-ной концентрации в случае использования среды ТС-199 развитие морул до следующей стадии не произошло.

11.2.4. Влияние плотности ооцитов на единицу объема и площади при получении эмбрионов *in vitro*

Среди хорошо известных факторов, влияющих на созревание, оплодотворение и развитие ранних зародышей *in vitro* в первую очередь, после средовых, называется плотность или количество ооцитов на единицу объема. Установлено многими исследованиями, значительно более высокие результаты получаются в том случае, когда ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) культивируются в группах и объясняется это тем, что в процессе группового созревания в экстрацеллюлярной среде аккумулируются ростообразующие факторы, выделяемые ОКК и способствующие созреванию и развитию клеток. Так, Ward F. et. al. сообщает, что в том случае, когда ооциты созревали и оплодотворялись по одному, выход бластоцист значительно снижался по сравнению с культивированием ооцитов в группах по 5, 10, 15 или 25 шт. Аналогичные данные получены и по результатам исследований Nago Y., в которых был установлен не только более высокий выход бластоцист в том случае, когда ооциты культивировались в группах, но и отмечена более высокая внутриклеточная масса эмбрионов и их жизнеспособность. Polasz A. отмечает, что если по уровню созревания и оплодотворения между различными группами ооцитов существенной разницы не отмечено, то выход

бластоцист был достоверно выше при плотности ооцитов 2:1 по сравнению с группами с плотностью 0,5:1 и 1:1.

Особенно остро вопрос оптимизации питательных сред применительно к условиям культивирования ограниченного количества ооцитов встал с разработкой и широким внедрением в практику получения эмбрионов в системе *in vitro* путем трансцервикальной пункции фолликулов с использованием ультразвукового зонда, когда получают единичные клетки и их ограниченное количество.

Целью наших исследований являлось изучение влияния соотношения ооцит/объем, ооцит/площадь культивирования на эффективность получения эмбрионов в культуре *in vitro*.

Таблица 102 - Влияние соотношения ооцит/объем на эффективность получения эмбрионов в системе *in vitro* при площади культуральной поверхности 3.14 см²

Объем среда, мкл	Кол-во ооцитов, п	Соотношение ооцит/объем	Количество дробящихся зародышей	Количество Мо+ Бл. п-%	Количество Бл, п-%
100	10	1/10	5-50,0	2-20,0	1-10,0
	25	1/4	12-18,0	5-20,0	3-12,0
	50	1/2	18-36,0	5-10,0	2-4,0
	100	1/1	15,0-15,0	7-70,0	2-2,0
200	10	1/20	5-50,0	1-10,0	—
	25	1/8	14-56,0	5-20,0	3-12,0
	50	1/4	22-44,0	9-18,0	7-14,0
	100	1/2	31-31,0	6-6,0	4-4,0
300	10	1/30	3-30	1-10	
	25	1/12	13,0-52,0	5-20,0	3-12,0
	50	1/6	25-50,0	16,0-32,0	7-14,0
	100	1/3	35-35,0	4-4,0	2-2,0
400	10	1/40	3-30,0	1-10,0	
	25	1/16	12-48,0	4-16,0	2-8,0
	50	1/8	20-40,0	9-18,0	5-10,0
	100	1/4	47-47,0	19-19,0	15-15,0

Культивирование ооцитов проводилось в культуральной чашке площадью 3,14 см² в объеме среды 100, 200, 300 и 400 мкл (табл.104), а также в чашке Петри диаметром 40 мм и площадью культуральной поверхности 12,6 см² (табл.105) в объеме среды 1,5; 2,5; 3,0 и 3,5 мл. Как показывает анализ представленных данных, более высокие результаты были получены при соотношении ооцит/объем 1:15-1:35 (при площади культуральной поверхности 12,6 см² и 1:4-1:12 (при площади культуральной поверхности 3,14 см²). При этом выход бластоцист колебался на уровне 10-15%, а уровень дробления составлял 43,0-53,0% и 40-56%, соответственно. В среднем данный показатель составлял 12 и 12,4% и 48,5-48,4%. При всех других соотношениях уровень дробления снижался на 9,5-12,8%, а выход бластоцист на 8,5-9,9%.

Таблица 103 - Влияние соотношения ооцит/объем на эффективность получения эмбрионов в системе *in vitro* при площади культуральной поверхности 12,6 см²

Объем среды, мкл	Кол-во ооцитов, п	Соотношение	Кол-во дроб-ся, п-%	Кол-во Мо+ Бл, п-%	Количество Бл, п-%
1500	10	1/150	3-30,0	1-10,0	-
	50	1/30	23-46,0	7-14,0	6-12,0
	100	1/15	43-43,0	18-18,0	10-10,0
	150	1/10	68-45,3	22-14,7	13-8,7
2500	10	1/250	3-30,0	12-12,0	--
	50	1/50	21-42,0	6-12,0	3-6,0
	100	1/25	50-50,0	15-15,0	15-15,0
	150	1/17	71-47,4	26-17,4	17-11,4
3000	10	1/300	2-20,0	1-10,0	-
	50	1/60	20-40,0	6-12,0	4-8,0
	100	1/30	53-53,0	22-22,0	12-12,0
	150	1/20	77-51,4	29-19,4	19-12,7
3500	10	1/350	4-40,0	2-20,0	-
	50	1/70	19-38,0	7-14,0	5-10,0
	100	1/35	48-48,0	21-21,0	14-14,0
	150	1/23	74-49,4	28-18,7	21-14,0

11.3. Влияние условий оплодотворения на его эффективность

Известно, что для успешного оплодотворения ооцитов, сперматозоиды млекопитающих проходят процесс созревания или капацитации. В естественных условиях этот процесс происходит в половых путях самок и заключается в изменении характера плавательной активности и преобразовании строения клеточных мембран на головке спермиев, после чего сперматозоид становится способным к пенетрации ооцита. Кроме этого характерными особенностями прохождения процесса капацитации является переход спермиев от прямолинейно-поступательного к «гиперактивному» и снова к прямолинейно-поступательному движению. По завершении капацитации отдельные спермии начинают агрегировать между собой.

Для в оплодотворения ооцитов использовали замороженно-оттаянную сперму. Для капацитации использовали разработанные нами питательные среды на основе ТС-199 и Тироде. В качестве капацитирующего агента использовался гепарин в различных концентрациях (50, 100, 150, 200 и 250 ед/мл). Эффективность капацитации определяли по активности спермы, агрегации сперматозоидов, уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей.

Таблица 104 - Показатели капацитирующие способности гепарина в зависимости от концентрации

Концентрация гепарина, ед/мл	Продолжительность гиперактивного движения, мин	Доля спермиев с гиперактивным движением, %	Доля агрегированных спермиев, %
50	-	-	-
100	30	15	5,7
150	30	28	27,5
200	100	75	45,0
250	135	80	57,0

Как видно из анализа таблицы 104 по мере увеличения концентрации гепарина все показатели спермы возрастали. Так, если 50% концентрация гепарина не оказала заметного влияния на характеристику спермы то ее повышение увеличивало продолжительность гиперактивного движения с 30 (100ед/мл) до 135минут (250ед/мл), долю спермиев с гиперактивным движением с 15до 80%, а уровень агрегации спермиев с 5,7 до 57.0%.

Оплодотворяющую способность спермы определяли по уровню дробления и выходу полноценных зародышей на стадии морула-бластоциста (табл. 105)

Таблица 105 - Показатели оплодотворяющей способности спермы в зависимости от концентрации гепарина в качестве капацитирующего агента

Концентрация гепарина, ед/мл	Оплодотворено ооцитов, п	Уровень дробления		Выход Мо-Бл	
		п	%	п	%
50	70	8	11,4	-	-
100	150	74	49,3***	35	23,3
150	150	85	56,7***	29	19,3
200	100	34	34,0	12	12,0
250	90	16	17,8	9	10,0

Установлено, что более высокий уровень дробления и выход эмбрионов на стадии морула-бластоциста был получен при применении гепарина и концентрации 100 и 150 ед/мл - 49,3-56,7 и 23,3-19,3%, соответственно. При увеличении концентрации гепарина до 200-250 ед/мл эти показатели снижались и составили соответственно 34,0-17,8 и 12,0-10,0%.

Для изучения влияния различных сред на оплодотворяемость ооцитов за основу было взято 4 среды: ТС-199, Тироде, Тироде М (модифицированная) и среда Игла (табл. 106).

Как видно из таблицы наиболее эффективной оказалась среда Тироде с выходом эмбрионов на предимплантационных стадиях 19,2-25,8%. При уровне дробления 54,5-61,6%, соответственно.

Таблица 106 - Оплодотворяемость ооцитов в различных средах

Состав среды	Оплодотворено ооцитов, п	Дробящихся зародышей		Выход Мо-В1	
		п	%	п	%
ТС-199	143	23	16,1	3	2,1
Тироде	156	85	54,5	30	19,2
Тироде М	190	117	61,6	49	25,8*
Игла	170	24	14,1	4	2,4

В таблице 107 представлены результаты совместной инкубации спермы с ооцитами. Как видно из таблицы оплодотворяемость яйцеклеток находится в прямой зависимости от продолжительности совместного культивирования гамет. Так, при трехчасовом культивировании спермиев с ооцитами получено 14,9% дробящихся зародышей, из них 19,2% морул-бластоцист, что составило 2,8% от общего количества использованных в опыте ооцитов. Увеличение времени совместного инкубирования клеток до 6-ти и 9-ти часов повысило оплодотворяемость ооцитов на 2,2 и 12,9%; уровень морул-бластоцист, по отношению к количеству оплодотворенных остался на прежнем уровне - 18,7; 22,0%, и составил 3,2 и 6,1% от ооцитов данных опытных групп. Дальнейшее возрастание продолжительности пребывания спермиев и яйцеклеток в одной чашке до 12-ти и 15-позволило получить 32,5 и 40% ($P<0,01$) дробящихся зародышей, к 32,2 и 29,7% эмбрионов на предимплантационных стадиях, что соответствует 10,5 и 11,8% от общего количества поставленных на культивирование клеток. При 18-ти часовом инкубировании оплодотворилось ($P<0,001$) яйцеклеток, из них получено 32,1% Мо-В1, что составило от всех клеток в группе. Наиболее оптимальным является время 18,1-20,0 часов, где получено

57,4% ($P<0,001$) дробящихся зародышей, из 8% Мо-В1, что составило 21% от всех ооцитов в группе. Увеличение времени совместного культивирования до 24 часов снизило на 2,6% количество оплодотворенных ооцитов и на 8,5% Мо-В1. Выход ранних зародышей на предимплантационных стадиях, по отношению к общему количеству поставленных в первом опыте ооцит-кумулюсных комплексов, снизился на 5,1%.

Таким образом, оптимальная продолжительность совместного инкубирования сперматозоидов с яйцеклетками составляет 18-20 часов и которая позволяет получать 57,4% дробящихся и увеличить выход зародышей на стадии морула-бластоцистадо 36,8%.

Таблица 107 - Выход жизнеспособных эмбрионов в зависимости от продолжительности оплодотворения

Продолжительность совместной инкубации спермы с ооцитами, ч	Оплодотворено ооцитов, п	Дробящихся зародышей		Выход Мо-В1	
		п	%	п	%
3,0	174	26	14,9	5	19,2
3,1-6,0	187	32	17,1	6	18,7
6,1-9,0	180	50	27,8	11	22,0
9,1-12,0	191	62	32,5	20	32,2
12,1-15,0	160	64	40,0	19	29,7
15,1-18,0	171	81	47,4	26	32,1
18,1-20,0	204	117	57,4	43	36,8
20,1-24,0	157	86	54,8	25	29,1

11.4. Сравнительная эффективность получения эмбрионов путем трансцервикальной аспирации (ОРУ) и из яичников доноров убитых на мясокомбинате

Выделение ооцитов проводилось одним из двух методов: 1 - трансцервикальное отсасывание ооцитов из фолликулов доноров с использованием ультразвукового зонда или его еще

называют ультрасонографом; 2 - из яичников убитых на мясокомбинате коров.

Полученные эмбрионы пересаживались или подвергались криоконсервации. Результаты этой работы представлены в таблице 108, из которой видно, что за 418 операций по отсасыванию было получено всего 3429 ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) или по 8,2 ОКК на одну операцию. Пригодными для постановки на дальнейшее созревание оказалось 2092 ОКК или 61%. После оплодотворения и культивирования ранних зародышей в течение 7...9 дней было получено 717 жизнеспособных эмбрионов, что составило 1,72 зародыша на операцию.

Таблица 108 - Результаты работы по получению эмбрионов вне организма с использованием технологии ОРУ

Количество операций, п	Получено ОКК		Пригодных для созревания		Получено эмбрионов	
	всего	на одну операцию	N	%	всего	на одну операцию
ОРУ 418	3429	8,2	2092	61	717	1,72
м/к 77	6890	89,5	4898	71,1	1768	22,9

Анализ эффективности использования ооцитов, полученных из яичников коров, убитых на мясокомбинате, показывает, что всего за 77 циклов (одна поездка на м/к) получено 6890 ооцитов или 89,5 ооцита на один цикл. Из них пригодных для дальнейшего созревания оказалось 4898 или 71,1%, что на 10,1% выше по сравнению с трансцервикальным получением женских гамет.

Из поставленных на созревание ооцитов было получено 1768 жизнеспособных эмбрионов или 22,9 на один цикл. Выход

полноценных зародышей от числа пригодных ооцитов в первом случае составил 34,3%, во втором - 36,1%.

Для получения одного эмбриона при использовании трансцервикального метода затрачивается 4,8 ооцита, а мясокомбината - 3,9, что, по всей видимости, можно объяснить возможностью более тщательного отбора ооцитов в случае использования яичников с мясокомбината в связи с их большим количеством. Но достоверных различий в этом вопросе не установлено.

В таблице 109 показаны результаты пересадки свежих и замороженно-оттаянных эмбрионов, полученных *in vitro*. Из 209 пересадок свежих зародышей стельными оказались 99 реципиентов (47,4%). Из 89 пересадок замороженно-оттаянных эмбрионов стельными стали 37 реципиентов (41,6%).

При пересадке эмбрионов, полученных из яичников коров, убитых на мясокомбинате, из 78 свежих эмбрионов прижилось 35 (44,9%), из 47 пересадок замороженно-оттаянных эмбрионов стельными стали 20 реципиентов или 42,5%.

Таким образом, анализ результатов работы по получению эмбрионов вне организма показывает достаточно высокую эффективность как одного, так и второго способа получения ооцитов, их созревания и оплодотворения.

Таблица 109 - Результаты пересадок эмбрионов, полученных с использованием технологии OPU

Пересадка свежих эмбрионов		Пересадка з/о эмбрионов	
метод получения ооцитов	процент стельности, п-%	количество пересадок	процент стельности, п-%
OPU (209)	99-47,4	89	37-41,6
м/к (78)	35-44,9	47	20-42,5

Как при пересадке эмбрионов, полученных традиционным методом, так и при пересадке эмбрионов, полученных *in vitro*, важное значение имеет стадия их развития.

Анализ результатов, представленных в таблице 110, говорит о том, что при пересадке свежих эмбрионов, полученных путем оплодотворения вне организма, наиболее высокий уровень стельности отмечен при пересадке экспандированных бластоцист: 51% против 48,5% в случае пересадки поздних бластоцист и 42,6% ранних бластоцист. Самая низкая приживляемость наблюдалась при пересадке морул (34,4%). Что касается замороженно-оттаянных эмбрионов, то здесь прослеживается другая тенденция. Так, наиболее высокий уровень показали ранние и поздние бластоцисты, 45,2 и 45,1% соответственно. Экспондированные бластоцисты и морулы прижились в 38,5 и 33,3% соответственно.

Таблица 110 - Влияние стадии развития эмбрионов, полученных с использованием ОРУ, на уровень стельности

Стадия развития	Свежие			Замороженно-оттаянные		
	кол-во перес-к, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стель-ти, %	кол-во пересад ок, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Мо	32	11	34,4	15	5	33,3
В I	54	23	42,6	31	14	45,2
В II	103	50	48,5	51	23	45,1
В III	98	50	51,0	39	15	38,5
Итого	287	134	46,7	136	57	41,9

Сравнивая эффективность трансплантации эмбрионов в зависимости от стадии развития, мы отметили несколько лучшие результаты приживляемости эмбрионов, полученных путем оплодотворения ооцитов, выделенных методом трансцервикальной аспирации фолликулов по сравнению с яйцниками полученными на мясокомбинате, за исключением ранних бластоцист (табл. 111). Разница была незначительной и

составляла от 3% при пересадке морул до 4,2% при пересадке поздних бластоцист.

Таблица 111 - Влияние стадии развития эмбрионов, полученных in vitro, при различных методах получения ооцитов, на уровень стельности

Стадия развития	ОРУ			Мясокомбинат		
	кол-во пересадок, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %	кол-во пересадок, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Мо	31	12	38,7	14	5	35,7
ВП	60	27	45,0	19	9	47,3
В1П	67	35	52,2	25	12	48,0
В1П	51	25	49,0	20	9	45,0
Итого	209	99	47,4	78	35	44,9

Такая тенденция объясняется, на наш взгляд, индивидуальными качествами доноров ооцитов. При трансцервикальном извлечении ооцитов к донору предъявляются самые высокие требования по физиологическому состоянию и здоровью. В случае с мясокомбинатом проконтролировать состояние потенциальных доноров эмбрионов сложно, в связи с чем в качестве опытного материала попадают яичники от животных с сомнительным диагнозом по воспроизводительным качествам, гормональному фону, половому циклу и т.д., что в итоге и влияет на конечные результаты.

В таблице 112 представлены результаты пересадки эмбрионов различных по качеству.

Эмбрионы удовлетворительного качества, полученные путем трансцервикальной аспирации фолликулов показали более высокие результаты по сравнению с послеубойным извлечением ооцитов из яичников, полученных с мясокомбината. Следует отметить тот факт, что эмбрионы отличного и хорошего качества показали в данном случае

практически одинаковую приживляемость. В первом случае 55,5 и 53,0, а во втором - 48,6 и 48,5%.

Таблица 112 - Влияние качества эмбрионов при различных методиках получения ооцитов на их приживляемость

Качество эмбрионов	ОРУ			Мясокомбинат		
	кол-во пересадок	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %	кол-во пересадок, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Отлич.	90	50	55,5	37	18	48,6
Хорош.	83	44	53,0	33,0	16	48,5
Удовл.	36	15	41,2	8	1	12,5
Итого	209	99	47,4	78	35	44,9

Эффективность трансплантации эмбрионов коровам ниже по сравнению с эмбриопересадками телкам.

Таблица 113 - Влияние качества эмбрионов на их приживляемость

Качество эмбриона	Свежие			Замороженно-оттаянные		
	кол-во пересадок, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %	кол-во пересадок, п	стельных реципиентов, гол.	уровень стельности, %
Отличн.	134	72	53,7	70	33	47,1
Хорош.	122	58	47,5	57	23	40,3
Удов л.	31	4	12,9	9	1	11,1
Итого	287	134	46,7	136	57	41,9

То же самое можно сказать и об эмбрионах *in vitro*, полученных по разным методикам и пересаженных разным реципиентам (табл. 114).

Таблица 114 - Влияние реципиента на приживляемость эмбрионов

Реципиент	ОРУ			Мясокомбинат		
	пересажено эмбрионов	стельных реципиентов, п	уровень стельности, %	пересажено эмбрионов	стельных реципиентов, п	уровень стельности, %
Корова	25	10	40,0	21	8	38,1
Телка	184	89	48,4	57	27	47,4
Итого	209	99	47,4	78	35	44,9

Одним из критериев оценки готовности реципиентов к восприятию пересаженного эмбриона является наличие и качество желтого тела, отражающего в какой-то мере соответствие гормонального фона вероятностной приживляемости зародыша.

В таблицах 115 и 116 представлены результаты исследований по изучению влияния качества желтого тела на уровень приживляемости зародышей.

Таблица 115 - Влияние качества желтого тела на приживляемость эмбрионов

Качество желтого тела	Свежие			Замороженно-оттаянные		
	пересажено эмбрионов	стельных реципиентов, п	уровень стельности, %	пересажено эмбрионов	стельных реципиентов, п	уровень стельности, %
Отличн.	112	57	50,9	50	22	44
Хорош.	117	52	44,4	57	24	42,1
Удовл.	58	25	43,1	29	11	37,9
Итого	287	134	46,7	136	57	41,9

Следует отметить, что при пересадке свежих эмбрионов реципиентам с различным по качеству желтым телом отмечается высокая приживляемость - от 43,1% при наличии удовлетворительного желтого тела до 50,9% при отличном желтом теле. При пересадке замороженно-оттаянных эмбрионов

приживляемость снижается по всем уровням качества желтого тела, что особенно заметно при наличии желтого тела отличного качества с 50,9% до 44,0% при пересадке свежих и деконсервированных эмбрионов и с 43,1 до 37,9% соответственно при удовлетворительном желтом теле.

Таблица 116 - Влияние метода получения ооцитов и качества желтого тела на приживляемость эмбрионов

Качество желтого тела	ОРУ			Мясокомбинат		
	Пере-но эмбрио.	стельных рецип-ов, п	уровень стельности, %	Пере-но эмбрио.	стельных рецип-в, п	уров. стельности, %
Отличн.	87	43	49,4	27	13	48,1
Хорош.	78	37	47,4	35	16	45,7
Удовл.	44	19	43,2	16	6	37,5
Итого	209	99	47,4	78	35	44,9

Таким образом, приведенный выше анализ результатов исследований показывает, что технология получения эмбрионов вне организма животного отличается достаточно высокой эффективностью и может иметь существенное значение наряду с искусственным осеменением и трансплантацией эмбрионов в практической селекции крупного рогатого скота, позволит значительно повысить интенсивность использования высокоценных животных и, тем самым, сделать экономику воспроизводства стада более эффективной.

ГЛАВА 12. ПРОДУКТИВНЫЕ ПРИЗНАКИ И ФИЗИОЛОГО-ЭТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТЕЛЯТ-ТРАНСПЛАНТАНТОВ

12.1. Динамика живой массы и среднесуточные приросты

Рост и развитие животных на всех этапах онтогенеза программируется их генетической информацией, передающейся от родителей. Однако реализация генотипа, заключенного в оплодотворенной яйцеклетке, осуществляется под влиянием

факторов внешней среды. Для эмбриона этой средой является организм матери, поэтому рано формирующиеся в процессе эмбриогенеза признаки развиваются под преобладающим влиянием генотипа организма потомка и после его рождения почти не изменяются. Это видовые и многие породные признаки, группы крови, типы гемоглобина, трансферрина и др.

Однако многие качественные и все количественные признаки характеризуются возрастной изменчивостью и разнообразием формирования в процессе индивидуального развития животного, так как в самой генетической программе развития заложены не готовые решения, а определяемые генотипом лимиты реализации этих признаков.

В индивидуальном развитии происходит процесс воплощения генотипа в фенотипе, реализация которого идет от гена к признаку. Однако в фенотипе любой особи никогда не реализуются все генотипические возможности данного животного, так как фенотип представляет лишь частичное выражение генотипа в сложившихся конкретных условиях развития.

Таким образом, развитие животного зависит от двух основных факторов: генотипа данной особи и внешних условий, в которых происходит ее индивидуальное развитие.

В связи с тем, что сложный процесс индивидуального развития проявляется многогранно, трудно представить его изучение с помощью единого и универсального метода. Пока лучше разработаны методы изучения и учета роста животных. Рост и развитие молодняка мы изучали в сравнении с контролем: телятами-аналогами по возрасту, породе и полу, полученными методом искусственного осеменения.

По среднесуточным приростам живой массы (табл. 117) животные опытной группы за исключением периода с 6 до 9 и с 9 до 12 месяцев превосходили своих сверстников на 2,4-9 %. За весь период выращивания сравниваемые опытная и контрольная группы существенно не различались по среднесуточным приростам и они составляли в среднем 758-934 и 738-876 г.

Таблица 117 - Среднесуточные приросты живой массы телят-трансплантантов и их аналогов, г

Возраст, мес.	Группы					
	Опытная (n=27)			Контрольная (n=27)		
	Бычки n=14	Телки n=13	В среднем	Бычки n=14	Телки n=13	В среднем
0-3	771±40,4	745±32,6	758±50,3	770±50,3	707±83,1	738±41,7
3-6	802±31,3	763±45,3	782±33,3	724±43,1	728±36,2	726±59,7
6-9	824±38,6	779±58,7	801±48,6	866±48,0	818±50,0	842±49,0
9-12	953±9,7	844±69,5	898±9,6	855±62,4	792±45,2	823±58,8
12-15	990±58,6	899±42,5	944±50,6	884±54,9	834±41,2	859±43,1
15-17	963±62,4	902±51,3	934±41,8	891±48,0	861±52,5	876±56,9

12.2. Гематологические показатели и естественная резистентность

Для научно-обоснованной оценки эффективности ускоренного воспроизводства крупного рогатого скота с использованием метода трансплантации эмбрионов важно оценить состояние здоровья и устойчивость полученного молодняка к воздействию внешних факторов среды в различные эксплуатационные периоды в промышленных условиях ведения отрасли.

Поэтому в своих исследованиях в качестве критериев сравнительной оценки молодняка опытной и контрольной групп нами изучены следующие показатели крови: количество лейкоцитов, эритроцитов, содержание гемоглобина, глюкозы, резервной щелочности, общего белка и его фракций, активность АЛТ, АСТ; лизоцимная, бета-лизинная, бактерицидная активность сыворотки крови, интенсивность накопления в крови нормальных агглютининов. Такое комплексное изучение указанных гематологических показателей позволяет наиболее объективно определить жизнестойкость и провести оценку физиологического состояния и уровня естественных защитных сил организма телят-трансплантантов. Исследования

проводились на базе колхоза «Рассвет» им. Орловского Могилевской и племзавода «Кореличи» Гродненской областей.

Результаты исследований морфологических показателей крови подопытных телят приведены в таблице 120.

Как видно из приведенных данных, морфологический состав крови подопытных телят претерпевал некоторые изменения по возрастам. Так, в 3-х месячном возрасте содержание лейкоцитов было выше у бычков обеих групп и составляло 8,20 и 8,12 тыс./мм³ против 6,04 и 6,12 тыс./мм³ у телочек. Максимальное содержание их отмечено во всех группах к 9-ти месячному возрасту, а в 12 месяцев наблюдается уменьшение их количества в крови. У бычков опытной группы в 12 месяцев наблюдалось превосходство по данному показателю (7,78 против 6,36 тыс./мм³ в контроле).

Таблица 118 - Морфологические показатели крови подопытных телят

Показатели	Возраст, мес.	Контроль		Опыт	
		телочки	бычки	телочки	бычки
Лейкоциты тыс./мм ³	3	6,12±0,27	8,12±0,73	6,04±0,59	8,20±0,70
	9	8,26±0,44	8,88±0,35	8,86±0,30	8,55±0,59
	12	5,91±0,33	6,37±0,87	6,05±0,05	7,78±1,00
Среднее за опыт		6,77±0,32	7,89±0,44	6,98±0,04	8,20±0,41
Эритроциты млн./мм ³	3	5,87±0,19	6,36±0,16	5,73±0,19	6,54±0,10
	9	6,21±0,27	6,58±0,32	5,97±0,33	7,01±0,24
	12	6,52±0,21	6,14±0,42	6,50±0,14	6,69±0,21
Среднее за опыт		6,16±0,14	6,37±0,16	6,02±0,15	6,74±0,11
Гемоглобин г%	3	10,66±0,41	12,60±0,38	10,70±0,60	12,25±0,53
	9	11,94±0,15	12,27±0,50	12,76±0,30	12,33±0,46
	12	12,63±0,23	11,53±0,35	12,25±0,31	12,00±0,18
Среднее за опыт		11,63±0,31	12,19±0,25	11,82±0,34	12,21±0,25

Количество эритроцитов в крови обеих групп телочек с возрастом увеличилось незначительно и достигло максимальной величины 6,50 и 5,52 млн./мм³ в возрасте 12 месяцев. У бычков этот показатель отличался стабильностью. Следовательно, указанные изменения не носили закономерного характера в подгруппах бычков во все исследуемые возрастные периоды.

По содержанию гемоглобина в крови бычки 3-х месячного возраста превосходили телочек как в опытной, так и в контрольной группах (12,25 и 12,60г%; 10,70 и 10,66г% соответственно). К 9-ти месяцам наблюдается повышение содержания гемоглобина во всех группах кроме бычков в контроле, а к 12-ти – телочки опытной и контрольной групп по его количеству превосходили бычков. Самый высокий уровень гемоглобина у животных опытных групп отмечен в 9 месяцев и составил 12,76 и 12,33 г% соответственно.

Анализ полученных данных указывает на отсутствие достоверных различий по количеству лейкоцитов и эритроцитов, а также содержанию гемоглобина в крови телят-трансплантантов и их сверстников.

По результатам исследований биохимических показателей можно достаточно объективно и точно судить об обменных процессах, происходящих в организме молодняка в различные периоды роста и развития (табл. 119).

Содержание глюкозы в сыворотке крови и показатели резервной щелочности в опытной и контрольной группах телочек и бычков во все исследуемые периоды находились в пределах физиологической нормы и не имели достоверных различий.

Заметна тенденция значительного возрастания активности фермента АЛТ к 12-ти месяцам во всех группах (у телочек – 0,39; 0,40 мкмоль/л и у бычков – 0,41; 0,38 мкмоль/л). Указанные различия можно объяснить возрастными изменениями. Нами не установлено каких-либо существенных различий по этому показателю между опытными и контрольными группами телочек и бычков.

По активности АСТ телочки опытной и контрольной групп в возрасте 3-х месяцев не различались между собой. Однако по этому показателю они заметно превосходили бычков (соответственно 0,52 и 0,57 мкмоль/л против 0,42 и 0,48 мкмоль/л). В 9-ти месячном возрасте телочки обеих групп имели минимальные показатели активности АСТ (0,43 в обоих

случаях) за весь период исследований, в то время как у бычков наблюдалась тенденция к незначительному росту.

У животных всех групп активность АСТ достигла максимума в возрасте 12 месяцев, при этом бычки опытной группы имели показатели несколько выше, чем в контроле (0,61 против 0,57 мкмоль/л)

Таблица 119 - Биохимические показатели крови телят-трансплантантов и их аналогов

Показатели	Возраст, мес.	Контроль		Опыт	
		телочки	бычки	телочки	бычки
Глюкоза, мг%	3	68,93±4,60	75,00±4,24	61,54±4,10	74,57±3,26
	9	63,53±2,54	64,72±2,46	68,57±2,26	69,72±0,96
	12	68,11±2,06	66,67±1,99	63,00±2,86	60,35±4,04
Среднее за опыт		66,90±2,04	69,26±2,14	64,29±1,97	69,00±2,13
Резервная щелочность, мг%	3	512,0±2,43	478,3±3,08	509,7±3,36	471,67±6,01
	9	504,85±4,5	499,0±3,21	504,86±4,3	500,00±3,9
	12	522,50±3,2	527,3±8,97	523,00±4,3	499,00±3,2
Среднее за опыт		512,53±2,5	498,8±5,52	513,78±2,7	488,70±4,2
АЛТ, мкмоль/л	3	0,28±0,04	0,21±0,05	0,25±0,05	0,24±0,05
	9	0,36±0,04	0,35±0,03	0,31±0,04	0,32±0,04
	12	0,40±0,05	0,38±0,04	0,39±0,05	0,41±0,06
Среднее за опыт		0,34±0,03	0,30±0,03	0,31±0,03	0,31±0,03
АСТ, мкмоль/л	3	0,57±0,04	0,42±0,04	0,52±0,04	0,48±0,05
	9	0,43±0,05	0,51±0,06	0,43±0,06	0,50±0,04
	12	0,62±0,04	0,57±0,04	0,60±0,05	0,61±0,04
Среднее за опыт		0,54±0,03	0,49±0,03	0,51±0,03	0,52±0,03

О состоянии белкового обмена в организме животных в определенной мере можно судить по содержанию в сыворотке крови общего белка и его фракций.

Исследования показали, что по содержанию общего белка в сыворотке крови опытные и контрольные животные существенно не различались (табл. 120). Наблюдалось лишь снижение концентрации общего белка у опытных и контрольных телочек к 9-ти месячному возрасту (7,23; 7,07 г%) по сравнению с 3-х месячным (7,53; 7,32 г%). Это снижение произошло в основном за счет глобулиновых фракций.

Таблица 120 - Белковый состав сыворотки крови подопытных животных, г%

Показатель	Возраст, мес.	Контроль		Опыт	
		Телочки n=15	Бычки n=14	Телочки n=15	Бычки n=14
Общий белок, г%	3	7,32±0,23	6,97±0,22	7,53±0,29	6,89±0,34
	9	7,07±0,15	7,43±0,05	7,23±0,18	7,22±0,16
	12	7,56±0,12	7,28±0,11	7,61±0,08	7,26±0,18
Среднее за опыт		7,30±0,11	7,21±0,10	7,45±0,13	7,10±0,15
Альбумины	3	3,07±0,14	3,45±0,11	3,26±0,13	3,29±0,11
	9	3,16±0,07	3,30±0,06	3,24±0,10	3,13±0,06
	12	3,38±0,08	3,46±0,06	3,33±0,07	3,22±0,11
Среднее за опыт		3,20±0,09	3,40±0,05	3,28±0,03	3,21±0,05
Альфа-глобулины	3	0,86±0,02	0,96±0,01	0,84±0,03	0,93±0,02
	9	0,86±0,02	0,96±0,01	0,84±0,03	0,93±0,02
	12	0,93±0,03	0,85±0,04	0,95±0,05	0,92±0,05
Среднее за опыт		0,87±0,02	0,93±0,04	0,88±0,04	0,93±0,02
Бета-глобулины	3	1,07±0,03	0,84±0,04	1,11±0,05	0,83±0,04
	9	0,91±0,02	0,99±0,02	0,89±0,03	0,94±0,05
	12	0,96±0,04	0,88±0,06	0,99±0,06	0,95±0,05
Среднее за опыт		0,98±0,05	0,90±0,04	1,00±0,06	0,91±0,04
Гамма-глобулины	3	2,15±0,15	1,85±0,05	2,13±0,14	2,02±0,22
	9	2,14±0,08	2,18±0,03	2,25±0,08	2,21±0,09
	12	2,29±0,04	2,07±0,07	2,34±0,07	2,18±0,09
Среднее за опыт		2,19±0,05	2,03±0,09	2,24±0,06	2,14±0,06
Глобулины, всего	3	4,25±0,17	3,52±0,13	4,26±0,20	4,02±0,22
	9	3,91±0,11	4,14±0,04	3,98±0,10	4,09±0,12
	12	4,17±0,08	3,82±0,10	4,28±0,06	4,05±0,19
Среднее за опыт		4,11±0,10	3,83±0,18	4,17±0,09	4,05±0,02
А/Г	3	0,73±0,04	0,98±0,03	0,77±0,03	0,93±0,05
	9	0,81±0,02	0,79±0,02	0,83±0,02	0,77±0,02
	12	0,81±0,02	0,91±0,03	0,78±0,02	0,80±0,05
Среднее за опыт		0,78±0,03	0,89±0,05	0,79±0,02	0,83±0,05

При анализе динамики содержания альбуминов установлено, что опытные и контрольные животные во все возрастные периоды отличались наименьшей изменчивостью этого показателя.

Уровень содержания альфа – глобулиновой фракции в сыворотке крови телочек контрольной и опытной групп

характеризовался стабильностью в 3-х и 9-ти месячном возрасте (соответственно 0,86 и 0,86 г%, а также 0,84 и 0,84 г%). К 12-ти месяцам установлено существенное повышение его до 0,93 и 0,95 г%. У бычков группы контроля наоборот отмечено снижение концентрации альфа-глобулинов до 0,85 г%.

Максимальная концентрация бета-глобулинов наблюдалась в крови опытной и контрольной групп телочек в 3 месяца (1,11 и 1,07 г%). К 9-ти месячному возрасту содержание бета-глобулиновой фракции несколько снижалось до 0,89; 0,91 г%, а затем к 12-ти месяцам уже составило 0,99; 0,96 г%. Закономерных изменений по этому показателю в крови бычков обеих групп нами не установлено.

Отмечена тенденция возрастания уровня гамма-глобулинов в крови телочек до максимальных величин в 12 месяцев – 2,34 г% в опытной и 2,29 г% контрольной группах. У бычков наибольшая концентрация гамма-глобулинов была в 9-ти месячном возрасте (соответственно 2,21 и 2,18 г%).

По общему количеству глобулиновых фракций телята – трансплантанты незначительно превосходили контрольных животных во все возрастные периоды за исключением бычков в 9-ти месячном возрасте.

Не установлено статистически достоверной закономерности в изменении альбуминово-глобулинового коэффициента в крови животных опытной и контрольной групп.

Таким образом, проведенный анализ показателей крови телят-трансплантантов и их сверстников позволяет сделать вывод, что биотехнологический метод ускоренного воспроизводства животных путем трансплантации эмбрионов не оказывает отрицательного воздействия на физиологическое состояние и обменные процессы в организме.

С целью определения состояния естественной резистентности организма телят, полученных методом трансплантации эмбрионов, были изучены гуморальные факторы защиты. Данные о состоянии гуморальных факторов защиты приведены в таблице 121.

Динамика лизоцимной активности сыворотки крови во всех группах по возрастам была одинаковой. Она характеризовалась повышением этого показателя от 3-х к 9-ти месяцам и последующим уменьшением к 12-ти. В 9-месячном возрасте животные всех групп имели самую высокую активность сыворотки крови. Телочки и бычки в опыте превосходили своих сверстников как в 9, так и в 12 месяцев, однако различия носили статистически недостоверный характер.

Наименьшей β -лизинной активностью сыворотка крови животных всех групп обладала в 3 месяца. Наиболее выраженной она была у бычков в опыте и контроле. К 9-месячному возрасту наблюдалось увеличение этого показателя. β -лизинная активность в опыте у телочек и бычков была выше (20,27 и 17,52%) чем в контроле (18,24 и 16,47%). В 12 месяцев этот показатель выравнился во всех группах.

Таблица 121 - Гуморальные факторы защиты организма телят-трансплантантов и их аналогов

Показатель	Возраст, мес.	Контроль		Опыт	
		Телочки n=15	Бычки n=14	Телочки n=15	Бычки n=14
Лизоцимная активность, %	3	3,94 $\pm$ 0,23	3,12 $\pm$ 0,09	3,79 $\pm$ 0,27	3,25 $\pm$ 0,18
	9	4,99 $\pm$ 0,43	4,20 $\pm$ 0,36	5,23 $\pm$ 0,28	4,60 $\pm$ 0,40
	12	4,28 $\pm$ 0,30	4,07 $\pm$ 0,57	4,83 $\pm$ 0,15	4,58 $\pm$ 0,22
Среднее за опыт		4,38 $\pm$ 0,21	3,47 $\pm$ 0,22	4,56 $\pm$ 0,21	4,14 $\pm$ 0,24
Бета-лизинная активность, %	3	11,03 $\pm$ 0,6	15,60 $\pm$ 1,02	11,06 $\pm$ 0,40	16,00 $\pm$ 0,63
	9	18,24 $\pm$ 1,4	16,47 $\pm$ 1,28	20,27 $\pm$ 0,99	17,52 $\pm$ 1,36
	12	19,6 $\pm$ 0,88	28,87 $\pm$ 0,68	20,20 $\pm$ 1,91	21,40 $\pm$ 0,97
Среднее за опыт		15,91 $\pm$ 1,1	17,35 $\pm$ 0,79	16,67 $\pm$ 1,23	18,01 $\pm$ 0,76
БАСК, %	3	13,4 $\pm$ 1,34	19,60 $\pm$ 0,60	15,59 $\pm$ 1,15	19,90 $\pm$ 0,89
	9	22,6 $\pm$ 0,82	20,50 $\pm$ 0,46	23,81 $\pm$ 0,90	21,92 $\pm$ 0,87
	12	21,86 $\pm$ 0,5	24,36 $\pm$ 1,14	22,13 $\pm$ 1,88	21,48 $\pm$ 1,23
Среднее за опыт		18,84 $\pm$ 1,1	21,22 $\pm$ 0,62	20,15 $\pm$ 1,14	21,01 $\pm$ 0,57
Нормальные агглютинины, титр	3	1:10,0 $\pm$ 2	1:11,6 $\pm$ 1,6	1:11,4 $\pm$ 1,4	1:15,0 $\pm$ 2,2
	9	1:25,7 $\pm$ 2,5	1:21,67 $\pm$ 1,0	1:25,7 $\pm$ 2,5	1:24,1 $\pm$ 3,27
	12	1:45,0 $\pm$ 6,2	1:56,6 $\pm$ 12,0	1:35,0 $\pm$ 6,12	1:46,3 $\pm$ 11,7
Среднее за опыт		1:24,9 $\pm$ 3,9	1:27,5 $\pm$ 5,50	1:22,7 $\pm$ 2,9	1:26,7 $\pm$ 4,5

Бактерицидная активность сыворотки крови лучше проявлялась у телочек в 3, 9 и 12 месяцев, а у бычков в возрасте 9 месяцев по сравнению со сверстниками контрольной группы. В 12 месяцев бычки контрольной группы имели показатели бактерицидной активности выше (24,37 против 21,48 в опытной).

Титр нормальных антител в крови всех групп животных с возрастом увеличивается. Бычки опытной группы характеризовались более высоким средним титром антител (1:15) как в 3 месяца в сравнении с контрольной группой (1:11), так и в 9 месяцев (1:24 и 1:21 соответственно).

У телочек обеих групп не установлено разницы по данному показателю в 3 и 9 месяцев. В возрасте 12 месяцев животные опытных групп незначительно уступали контрольным по среднему титру нормальных антител (1:35 и 1:46 против 1:45 и 1:56), причем у бычков этот показатель был выше, чем у телочек.

Таким образом, показатели лизоцимной, β -лизинной, бактерицидной активности сыворотки крови, среднего титра антител телята-трансплантанты не имеют существенных различий от таковых у сверстников контрольной группы.

12.3. Физиолого-зоотехнические и этологические показатели

Нашими сравнительными исследованиями предусматривалось проследить, имеются ли какие-либо физиолого-этологические особенности у молодняка крупного рогатого скота, полученного методом трансплантации и путем искусственного осеменения.

Опыты проводились в колхозе «Рассвет» им К.П. Орловского. Для опытов сформировали две группы бычков 2-месячного возраста (по 6 голов в каждой). В 1 группу вошли бычки-аналоги, а во 2 – трансплантанты. Аналогично были сформированы две группы телок в возрасте 3 месяцев. Кормление подопытных бычков и телочек было индивидуальное в зимний и летний период исследований. Рацион телок-

трансплантантов и бычков - трансплантантов и их аналогов в зимне-стойловый период приводится в таблице 122.

По общему уровню питания в рационе содержалось достаточное количество энергии (к. ед. и обменной энергии – МДж), но отдельных элементов (сухого вещества, сырого протеина, крахмала) в нем было больше, чем требуется для телят 2 и 3-месячного возраста. Микроэлементы (медь, цинк, кобальт, марганец) в рационе содержались в достаточном количестве. Все подопытные телята как в колхозе «Рассвет», так и в физиологическом корпусе БелНИИЖ, содержались на привязи. Подстилка была соломенная или из опилок.

У бычков-аналогов 2-месячного возраста частота дыхания составляла 32 легочных движения, а пульс – 77 ударов в 1 мин, тогда как у трансплантантов эти показатели находились на уровне 25 и 87 соответственно, т.е. у последних дыхание было более замедленное, а сердечная деятельность протекала более активно. Количество перистальтических и аперистальтических сокращений рубца (у бычков и телок-аналогов 7 сокращений за 5 мин, у трансплантантов – 6) указывает на некоторые особенности в процессах рубцового пищеварения у животных сравниваемых групп.

Таблица 122 - Рацион для бычков и телочек в зимне-стойловый период

Корма	кг	В рационе содержится питательных веществ							
		ОЭ, МДж	СВ, г	СП, г	Клетчатка, г	Крахмал, г	Сахар, г	Жир, г	Са/Р
Сено тимopheecное	0,8	5,4	678	73,0	222	16	23	16	5,2/6,7
Свекла кормовая	2,0	3,3	240	26,0	18	6	80	2	0,8/1,0
Травяная мука	0,2	1,6	180	19,8	56	4,8	10	3,6	1,2/06
Зерносмесь измельченная	1,2	12,6	1020	136	59	582	2,4	26	2,4/4,7
Обрат	8,0	10,5	720	296	-	-	-	8	11,2/8,0
Всего	-	33,4	2838	550,8	355	609	115	56	20,7/16,0

Температура тела у бычков-трансплантантов и аналогов в 2-месячном возрасте находилась в пределах нормы без существенных различий (39,2 и 39,50С). У телок-аналогов частота дыхания была на 2 ед. выше (37 дыханий в 1 мин), чем у трансплантантов (35 дыханий в мин.), пульс – соответственно 83 раза в 1 мин.

Сравнительные исследования у бычков (7 мес.) и телок (10 мес.) более старшего возраста сглаживают указанные различия в клинико-физиологических показателях. Если, например, у бычков эти различия по частоте дыхания составляли 1-2 ед. в пользу аналогов, то по величине пульса трансплантанты превосходили аналогов на 1-6 ед. По количеству сокращений рубца и температуре тела у бычков 7-месячного возраста межгрупповых различий установить не удалось. Совершенно другая картина у телок 10-месячного возраста, дыхание у них в отличие от бычков было одинаковым, а частота пульса больше у трансплантантов и меньше у аналогов (102 против 98 ударов в мин).

Бычки и телки-аналоги и трансплантанты 2 и 3-месячного возраста на протяжении суток затрачивали на потребление кормов разное время. Так, на поедание сена бычки и телки-аналоги затрачивали 151-110, свеклы 8-12 мин, трансплантанты – соответственно 156-193 и 9-12 мин. Общее время, затраченное на потребление всех кормов бычками и телками-трансплантантами, составляло 188-237 мин, аналогами – 780-164 мин в сутки. Пили воду трансплантанты в течение суток чаще (7 и 9 раз, аналоги – 6 и 8). Жвачный периоду них был более продолжительный: трансплантаты (бычки и телочки) затрачивали на повторное пережевывание отрыгиваемой пищевой массы в течение суток 314–481 мин, их аналоги – 265–434 мин, или 21,81 и 33,4% времени суток, а аналоги соответственно 18,4 и 30,14%. Эти различия в потреблении кормов, воды и жвачных процессах указывают на индивидуальные особенности протекания пищеварения в желудочно-кишечном тракте у бычков и телок сравниваемых групп.

В течение суток бычки и телочки-трансплантанты проводили стоя 31,94 и 40,48% времени, а их аналоги – 30,9 и 38,4%. Акты дефекации и выделения мочи у бычков-трансплантантов были чаще, чем у аналогов, а у телок сравниваемых групп выделение мочи протекало одинаково, некоторые незначительные различия наблюдались в дефекации.

При летнем типе кормления 10-месячные телки-трансплантанты на протяжении суток затрачивали на поедание смеси травы злаков с клевером 302 мин, концентратов – 44, а их аналоги – 246 и 41 мин., т.е. общие затраты времени на поедание всех кормов рациона у первых составляла 346 мин, у вторых – 287 мин. В этом возрасте телки-трансплантанты пили воду 8 раз в сутки, а аналоги – 11. Как у бычков и телок-трансплантантов 2 и 3-месячного возраста, так и у телок-трансплантантов 10-месячного возраста на жвачку затрачивалось больше времени (301 мин вместо 257 у аналогов), они также большую часть времени проводили стоя (612 мин вместо 582 мин у аналогов). По другим этологическим показателям различия носили переменный характер и установить какую-либо зависимость у животных сравниваемых групп не удалось.

В физиологическом балансовом опыте установлено, что от заданного количества отавы многолетних трав (трава злаков с клевером) в сутки бычки-аналоги в возрасте 7 месяцев съедали – 13,5, а трансплантаты – 13,7 кг, поедаемость сена составляла соответственно 0,46 и 0,48 кг, комбикорм поедался полностью – соответственно 2,2 и 2,2 кг на одну голову в сутки. Величина переваримости питательных веществ скармливаемых кормов в рационе бычков-трансплантантов и их аналогов была характерна для бычков 7-месячного возраста (табл. 123).

Отсутствие межгрупповых различий в переваримости кормов сопровождалось положительным балансом азота, кальция и фосфора в организме бычков-аналогов и трансплантантов. Бычки-аналоги 1 и 2 групп потребляли с кормами в сутки 117,35 и 113,19 г азота и у них баланс азота равнялся +40,09 и +41,54 г, у трансплантантов – соответственно +117,8 и +39,28 г. В организме бычков сравниваемых групп

баланс кальция и фосфора составлял у аналогов 1 группы +8,63 и +10,64, 2 группы +9,51 и +14,38 г и у трансплантантов – +7,6 и +9,93 г. Указанные элементы питания трансплантанты усваивали так же хорошо, как и их аналоги.

Таблица 123 - Перевариваемость питательных веществ бычками-трансплантантами и их аналогами в возрасте 7 месяцев

Питательные вещества	1 группа	2 группа	Трансплантанты
	переварено, %	переварено, %	переварено, %
Сухое вещество	63,74	64,51	62,91
Органическое вещество	65,35	65,85	64,45
Протеин	56,94	58,43	58,48
Жир	55,19	55,44	54,02
Клетчатка	67,97	69,43	67,02
БЭВ	63,71	63,49	62,07
Зола	44,83	47,30	44,94

При сопоставлении данных этологических и физиологических исследований не прослеживается зависимости продолжительности кормов от их переваримости. Как активное поедание кормов бычками-аналогами, так и замедленное их потребление трансплантантами обеспечивало одинаковую общую переваримость питательных веществ.

Прирост живой массы молодняка крупного рогатого скота в колхозе «Рассвет» им. К.П. Орловского и физиологическом корпусе Белорусского НИИ животноводства приводится в таблицах 124 и 125.

Из данных таблиц видны определенные межгрупповые различия у телок и бычков разного возраста в зимний и летний периоды исследования. Например, у бычков и телок 2 и 3-месячного возраста прирост живой массы был достаточно высоким при содержании на зимних рационах. Такая же высокая энергия роста и межгрупповые различия наблюдались и в летнее время при скормливании травы и концентратов. На протяжении

обоих периодов года интенсивность роста животных сравниваемых групп была достаточно высокой, причем у трансплантантов отмечался больший прирост живой массы, чем у аналогов.

Таблица 124 - Изменение живой массы подопытного молодняка крупного рогатого скота в зимний период

Показатели	Бычки		Телочки	
	1 гр., n=6	Трансплантанты, n=6	1 гр., n=6	Трансплантанты, n=6
Живая масса в начале периода, кг	71,7	76,3	98,8	101,8
Живая масса в конце периода, кг	126,7	135,0	144,5	150,8
Общий прирост живой массы, кг	50,0	58,7	45,7	49,0
Среднесуточный прирост, г	902	962	749	803
Продолжительность, дней	61	61	61	61

Таблица 125 - Динамика живой массы бычков и телочек в летний период

Показатели	Бычки			Телочки	
	1 гр., n=6	2 гр., n=6	Трансплантанты, n=6	1 гр., n=6	Трансплантанты, n=6
Живая масса в начале периода, кг	126,7	186,7	135,0	144,5	150,8
Живая масса в конце периода, кг	230,0	216,2	242,8	255,8	265,8
Общий прирост живой массы, кг	103,3	29,5	107,8	111,3	115,0
Среднесуточный прирост, г	861	894	898	927	958
Продолжительность, дней	120	33	120	120	120

12.4 Показатели мясной продуктивности

Фрагментом нашей работы было изучение формирования мясной продуктивности у бычков-трансплантантов чернопестрой породы. Исследования проводились в двух опытах: колхозе «Рассвет» им. Орловского и НПО «Племэлита» БелНИИЖ. Учитывая, что в двух опытах получены сходные результаты, экспериментальные данные приведены по опыту, проводимому в колхозе «Рассвет» им. К.П. Орловского. Выращивание и откорм подопытного поголовья проходили в одинаковых условиях кормления и содержания. В конце периода откорма провели контрольный убой подопытных животных (по две головы из каждой группы) с последующей разрубкой и обвалкой пяти анатомических отрубов полутуши. По данным убоя, подопытный молодняк имел сравнительно одинаковые показатели мясной продуктивности (табл.126).

Наряду с изучением массы полутуш подопытных бычков была дана оценка их по промерам. Важными показателями, характеризующими мясность крупного рогатого скота, являются длина туши, длина и обхват бедра.

Таблица 126 - Качественная характеристика полутуш подопытных животных

Показатели		Группы	
		Опытная	Контрольная
Масса охлажденной полутуши, кг		117,7±5,3	111,0±5,5
Масса	костей, кг	23,1±2,2	21,8±0,8
	мякоти, кг	94,6±3,0	89,2±4,7
Выход	мякоти, %	80,4±1,0	80,4±1,0
	костей, %	19,6±0,9	19,6±0,8
Промеры полутуши:			
обхват бедра, см		108,0±3,5	108,0±3,5
длина бедра, см		75,4±4,0	72,5±0,5
длина туши, см		212,0±7,0	206,5±1,5

Наиболее длинные туши были у бычков-трансплантантов (212 см, или на 5,5 см длиннее, чем у их сверстников). Бычки обеих групп имели одинаковый обхват бедра (108 см), но по длине туловища бычки-трансплантанты превосходили сверстников соответственно на 2,5 и 3,0 см. Следует отметить, что, несмотря на различия в промерах туш, выход мякоти в туше у животных обеих групп был одинаковым – 80,4%. Индекс мясности (соотношение массы мякоти к массе костей) равен 4,1. Из приведенных данных можно сделать вывод, что подопытные животные обеих групп имели хорошо развитые мясные формы.

Химический состав мяса подопытных животных изучали в пробах длиннейшей мышцы спины. Результаты этих исследований представлены в таблице 127. Данные таблицы показывают, что по содержанию влаги и жира мясо подопытных животных было практически одинаковым.

Таблица 127 - Физико-химические и биологические свойства длиннейшей мышцы спины подопытных животных

Показатели	Группы	
	Опытная	Контрольная
Влага, %	77,1±0,3	76,9±0,3
Жир, %	0,85±0,3	0,8±0,2
Оксипролин, мг%	103,6±2,8	106,6±0,8
Триптофан, мг%	382±8,6	388,4±4,7
Белковый качественный показатель	3,7	3,6
Интенсивность окраски	250,0±2,0	213,5±18,5
pH	5,8±2,5	5,4±2,2
Влагоудержание, %	66,2±2,5	64,5±2,2

Наиболее важной частью мяса являются белковые вещества, биологическая ценность которых определяется аминокислотным составом.

Самое высокое содержание полноценных белков (по триптофану) отмечено у бычков контрольной группы (388,4 мг%) или на 1,7% больше чем у их сверстников. То же самое

можно сказать и о неполноценных белках (по оксипролину): бычки контрольной группы содержали неполноценных белков в длиннейшей мышце на 2,9% больше, чем бычки-трансплантаты.

Белковый качественный показатель (соотношение триптофана к оксипролину) равнялся 3,7 у бычков опытной группы, контрольной – 3,6.

Качество мяса определяется не только питательной ценностью, но и такими технологическими показателями как влагоемкость, интенсивность окраски (коэффициент экстинкции $\times 1000$) и величина pH. Полученные результаты свидетельствуют о том, что по влагоудерживающей способности и величине pH мясо бычков-трансплантатов не отличается от мяса своих сверстников (65,7 и 63,20; 5,8 и 5,4).

Показатель интенсивности окраски длиннейшей мышцы спины у бычков-трансплантатов был выше на 36,5 единиц плотности, чем у контрольных животных. Таким образом, результаты контрольных убоев свидетельствуют о хорошей мясной продуктивности и качестве мяса подопытных животных.

Таблица 128 - Абсолютная и относительная масса внутренних органов подопытного молодняка

Показатели			Группы	
			Опытная	Контрольная
Масса:	Сердца	кг	1,22±0,02	1,51±0,01
		%	0,28	0,35
	Легких	кг	4,54±0,2	4,92±0,22
		%	1,04	1,13
	Печени	кг	5,12±0,6	4,86±0,23
		%	1,17	1,11
	Почек	кг	0,88±0,2	0,96±0,01
		%	0,20	0,22
	Селезенки	кг	0,63±0,07	0,67±0,07
		%	0,14	0,15

Наряду с этими исследованиями мы изучали изменения абсолютной и относительной массы внутренних органов подопытных бычков (табл. 128). Приведенные данные свидетельствуют о том, что по абсолютной массе таких жизненно важных органов, как сердце, легкие и селезенка существенных различий между группами не установлено.

Следовательно, по мясным качествам бычки-трансплантанты не уступали своим сверстникам, полученным методом искусственного осеменения.

В марте 1999 года нами на Брестском ГПП получены первые в Республике Беларусь телята, родившиеся после трансплантации эмбрионов из оплодотворенных ооцитов крупного рогатого скота вне организма (табл. 129 и 130).

Таблица 129 - Возрастная динамика живой массы телят, полученных *in vitro*

Возраст, мес.	Группы животных		В среднем
	Бычки	Телочки	
При рождении	31±1,2	29±1,2	30±1,3
3	110±2,9	102±3,9	106±3,7
6	174±3,4	172±2,7	173±2,8
9	247±3,3	241±1,1	244±2,8
12	323±3,1	308±3,4	316±6,1

Таблица 130 - Среднесуточные привесы телят, полученных *in vitro*

Возраст, мес.	Группы животных		В среднем
	Бычки	Телочки	
0-3	881±36,3	804±62,4	843±42,6
3-6	799±37,3	787±37,9	793±48,2
6-9	814±40,2	761±31,1	788±36,5
9-12	851±21,3	743±32,6	800±53,8

Анализ возрастной динамики их живой массы и величины среднесуточных привесов, представленных в таблицах 129 и 130, показывает, что эти показатели практически не отличались от аналогичных показателей телят, полученных путем искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов. В среднем живой вес телят в 12-ти месячном возрасте составил $316 \pm 6,1$ кг, а среднесуточные привесы колебались от 788 до 843 грамм. Также как и у двух вышеназванных групп проявлялся половой деморфизм. Так живая масса бычков превышала живую массу телочек в зависимости от возраста на 2-15 кг, а среднесуточные привесы – на 12-102грамма.

Таким образом, нами впервые проведена комплексная оценка показателей роста и развития телят, полученных биотехнологическими методами, которая не выявила отклонений в гематологических и физиолого-этологических показателях молодняка, а также их мясной продуктивности.

ГЛАВА 13. ОЦЕНКА БЫКОВ-ТРАНСПЛАНТАТОВ ПО СПЕРМОПРОДУКЦИИ

Успех селекции крупного рогатого скота во многом определяется качеством используемых производителей. Генетическое улучшение популяции молочного скота за счет селекции отцов быков составляет 41...46%, матерей быков - 24...33%, отцов коров - 19...24%, матерей коров - только 6...7% [11]. От высокоценной коровы, устойчиво передающей свои хозяйственно-полезные признаки потомству, получают за жизнь в обычных условиях 8... 10 голов приплода, при искусственном осеменении с использованием одного быка эти возможности расширяются до 100 тыс. голов и более. Таким образом, быки по сравнению с коровами ускоряют темпы селекции более чем в 10 тыс. раз и, следовательно, являются основной категорией племенных животных в молочном скотоводстве.

Как сообщают некоторые ученые, наибольший эффект генетического эффекта породы дает использование быков-улучшателей.

В Республике Беларусь свыше 95%) молока и говядины хозяйства получают от использования черно-пестрого скота. Его совершенствование осуществляется на основе принципов крупномасштабной селекции при чистопородном разведении животных по линиям. Для этого используются быки отечественной и зарубежной селекции, полученные при различных методах подбора и оценки племенной ценности. На различных этапах работы использовались быки разных улучшающих пород: эстонской черно-пестрой (с середины 50-х годов), голландской фризской (со второй половины 60-х годов), голштинской (с конца 70-х годов). По данным Бекиш Р.В. большая часть быков современной популяции относится к генеалогическим линиям голландского происхождения (28%), заводским линиям и родственным группам белорусской селекции, выведенным на основе использования голландского скота (23%), генеалогическим линиям голштинской породы (17%>).

Основным селекционируемым признаком черно-пестрого скота является удой. Селекция быков по удоям матерей позволила за последние 20 лет повысить этот показатель в 2,1 раза и довести средний уровень до 7860 кг молока за 305 дней лактации. Благодаря этому селекционный дифференциал по удою возрос с 541 до 1123 кг. По жирномолочности он снизился с 0,307 до 0,226%, или в 1,4 раза. За счет использования быков госплемпредприятий хозяйства республики могут повышать удои коров в среднем на 270 кг молока за поколение или на 54 кг за год, жирность молока - на 0,108 и 0,02% соответственно 111. Быки заводских и генеалогических линий характеризуются хорошими показателями развития. По живой массе они отвечают требованиям стандарта черно-пестрой породы. По длине туловища, глубине и обхвату груди в возрасте 2...3 года превосходят своих сверстников, записанных в 115-й том ГПК. Они отличаются молочно-мясным типом телосложения, индекс

сбитости быков по линиям находится в пределах 128,2...130,9%, растянутости -120,4...121,6%, длинноногости - 45,3...45,5%.

Быки западноевропейской селекции, завезенные в республику, по развитию превосходят быков отечественной селекции. По данным Андалюкевича В.Б. /3/ производители британо-фризской породы имели превосходство по живой массе на 24...37 кг, высоте в холке - на 5,9...6 см, глубине груди - на 2,2...4,7 см, косой длине туловища -на 5...9 см.

При анализе результатов оценки 62-х быков-производителей /104/ установлено, что племенные качества быков-улучшателей различных генотипов неодинаковы. Наибольшую племенную ценность по удоям дочерей имеют быки с разовым и двукратным прилитием крови голштинской породы (+203...+296 кг). У производителей, полученных от возвратного скрещивания голштинизированных коров и чернопестрых быков, самая низкая племенная ценность (+71 кг). Среди быков одинаковых генотипов (3/4-кровные по голштинам) лучшие показатели племенной ценности у производителей зарубежной селекции (+203 кг против +144 кг у отечественных).

Для создания банка генетически высокоценного семени Брестским гос-племпредприятием в 1994 и 1995 годах по лизингу было завезено две партии быков-производителей немецкой селекции, положительно оцененных по качеству потомства в Германии. Индекс относительной племенной ценности находился в пределах 102... 113%. Семя данных быков используется в лучших хозяйствах области на высокопродуктивных коровах при индивидуальном закреплении, а также при осеменении коров-доноров для получения потомства методом трансплантации эмбрионов.

Потомство, полученное от заказных спариваний, используется исключительно в племенных целях: телочки выращиваются для ремонта стада с целью получения высокопродуктивных коров, бычки, при соблюдении технологических требований, - для продажи на элевёр.

Нами проводился сравнительный анализ быков-трансплантатов по собственной продуктивности в сравнении со сверстниками (таблица 131).

По результатам анализа существенных различий по указанным признакам между группами быков не установлено. Так, по объему эякулята быки-трансплантаты превосходили сверстников на 0,1 мл в 1-й, 3-й и 4-й годы пользования, и в 6-й год - на 0,4 мл, однако разница недостоверна ($P>0,05$). Во 2-й и 5-й годы использования они недостоверно уступали сверстникам по данному признаку на 0,1 мл

Таблица 131 - Сравнительный анализ быков-трансплантатов по собственной продуктивности в сравнении со сверстниками

Группа быков	Кол-во голов	Кол-во эякул., шт.	Объем эякул., мл	Общий эякул., мл	Концентрация млрд./мл	Кол-во доз, шт.	Кол-во доз на 1 эякул., шт.	Выживаемость, ч
1.Трансплантаты	15	61,5	3,7	218,9	1,0	8193,3	133,2	17,0
сверстники	15	30,5	3,6	112,8	1,0	3715,0	121,8	17,1
2.Трансплантаты	15	147,9	3,9	532,0	1,0	18587	125,7	17,1
сверстники	15	134,1	4,0	541,1	1,0	17404	129,8	17,1
3.Трансплантаты	15	149,3	4,6	691,9	1,0	22414	150,1	17,1
сверстники	15	171,1	4,5	796,7	1,0	25187	147,2	17,5*
4.Трансплантаты	14	73,3	4,7	330,1	1,0	10171	138,8	16,9
сверстники	15	109,3	4,6	491,0	1,0	15617	142,9	17,2
5.Трансплантаты	6	130,0	4,5	601,2	1,0	17261	132,8	16,8
сверстники	11	125,6	4,6	588,8	1,0	17301	137,8	16,8
6.Трансплантаты	5	72,5	5,0	353,3	1,0	10362	142,9	16,6
сверстники	7	79,3	4,6	383,3	1,1	12450	157,0	16,5

По концентрации спермиев в 1 мл лишь в 6-й год использования установлено достоверное превосходство сверстников над трансплантатами на 0,1 млрд. ($P<0,05$) при среднем объеме эякулята 4,6 мл против 5 мл у трансплантатов.

Экономически важным показателем является количество полученных доз семени на 1 эякулят. По результатам анализа существенных и достоверных различий между группами быков по данному признаку не установлено.

Оплодотворяющая способность семени быков-трансплантатов и их сверстников составила соответственно 57 и 60%. Достоверной разницы между группами по данному признаку не установлено.

Таким образом, по показателям собственной продуктивности и оплодотворяющей способности семени достоверной разницы между группами быков-трансплантатов и их сверстниками не установлено, это позволяет констатировать, что их воспроизводительный статус находится на одинаковом уровне. Однако, использование быков-трансплантатов позволяет иметь преимущества в скорейшем размножении и использовании наиболее ценных в племенном отношении генотипов животных.

ГЛАВА 14. РОСТ, РАЗВИТИЕ И ПРОДУКТИВНЫЕ КАЧЕСТВА ТЕЛОК И КОРОВ ТРАНСПЛАНТАНТОВ

С целью изучения роста и развития телят были сформированы 4 группы животных по 10 голов: I (контрольная) группа – тёлочки белорусской селекции, полученные от коров, искусственно осеменённых спермой быков-производителей белорусской чёрно-пёстрой породы (белорусская черно-пестрая порода) ; II группа – помесные тёлочки, полученные путём искусственного осеменения коров белорусской селекции спермой быков-производителей голштинской породы канадской селекции (помесный молодняк); III группа – тёлочки, полученные от пересадки реципиентам белорусской селекции замороженно-оттаянных эмбрионов голштинской породы, импортированных из Канады (трансплантанты голштинской породы); IV группа – тёлочки, рожденные от нетелей голштинской породы, завезённых из Венгрии (чистопородные голштины). Подопытные группы животных формировали по

принципу групп-аналогов с учетом живой массы, физиологического состояния, возраста. Таким образом были проведены сравнительные испытания роста и развития телочек трансплантанов их последующие воспроизводительные качества и продуктивност в сранении с животными белорусской чернопестрой породы помеси голштинскокой и белорусской черно пестрой и чистопородной голштинской полученными после искусственног осеменения

Изучение интенсивности и динамики роста молодняка в стадах с генетическим потенциалом продуктивности от 6 000 до 11 000 кг молока помогает совершенствованию существующих систем направленного выращивания ремонтных тёлоч для получения крепких высокопродуктивных животных, приспособленных к длительной эксплуатации [55; 82]. В связи с этим исследование особенностей роста крупного рогатого скота разных генотипов в условиях Республики Беларусь имеет большое практическое значение в развитии молочного скотоводства страны.

Таблица 132 – Возрастная динамика живой массы подопытных тёлоч от рождения до 18 месяцев, кг

Возраст, месяцев	Группы			
	I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
При рождении	26,1±1,32	26,8±0,87	29,6±1,12	31,6±0,95**
3	91,2±4,02	92,40±2,75	96,9±2,99	104,5±3,45*
6	171,1±4,84	175,5±3,04	178,9±2,95	185,6±4,87
9	242,3±70	249,1±3,52	253,5±4,22	259,6±5,59
12	306,9±9,31	316±4,18	332±4,22*	341,4±4,73**
15	354,0±9,74	368,4±6,52	386,1±5,46*	396,2±4,36**
18	392,2±7,19	422,5±4,28**	436,2±5,02***	448,8±4,9***

Как свидетельствуют результаты наших исследований, приведённые в таблице 132, подопытный молодняк различался по живой массе уже при рождении. Явным преимуществом характеризовались импортные генотипы. Причем наиболее крупноплодными оказались телки венгерской селекции. По этому признаку они превосходили сверстниц всех других групп на 2,0–5,5 кг или на 6,8–21,1 % ($P \leq 0,01$).

Обращает на себя внимание преимущественное влияние породы матерей на живую массу новорожденных телят. В частности, телята I (контрольной) и II (опытной) групп, полученные от коров одной и той же породы, при рождении незначительно различались по живой массе. И это несмотря на то, что их отцами являлись быки разных пород. Если контрольные телки родились от коров, осемененных спермой быков белорусской чёрно-пёстрой породы, то телята второй опытной – от коров той же белорусской чёрно-пёстрой породы, но осемененных спермой канадских быков голштинской породы.

В то же время телята-трансплантаты оказались более крупноплодными, чем молодняк контрольной и второй опытной групп. Произошло это, вероятно, потому, что и отцовская, и материнская часть наследственности этими телятами получена от канадских голштинов. Генетически обусловленная способность к быстрому росту этих животных обеспечила достижение телятами-трансплантатами более высокой живой массы в пренатальный период онтогенеза, несмотря на то, что внутриутробное развитие этих телят проходило в теле коров белорусской чёрно-пёстрой породы. Считается, что живая масса при рождении положительно сказывается на ее приросте в процессе последующего выращивания животных. Так, крупноплодные при рождении телки венгерской селекции сохранили свое преимущество по живой массе над животными других групп во все периоды выращивания. В результате, к 18-месячному возрасту этот молодняк достиг живой массы 448,8 кг, что было больше, чем у чистопородных сверстниц белорусской чёрно-пёстрой породы (I контрольная) и помесных животных (II

опытная группа), соответственно, на 56,6 и 26,3 кг или на 14,4 % ($P \leq 0,001$) и 6,2 % ($P \leq 0,01$).

Межгрупповая разница по живой массе между тёлками венгерской селекции и телятами, полученными от пересадки эмбрионов крупного рогатого скота канадской селекции, оказалась менее существенной и составила в конце выращивания 12,6 кг или 2,9 % ($P \geq 0,05$).

Наряду с этим чистопородные тёлки белорусской чёрно-пёстрой породы уступали по живой массе не только сверстницам венгерской селекции и телятам-трансплантантам, но и помесному молодняку, полученному от скрещивания коров чёрно-пёстрой породы с канадскими быками на 30,3 кг или 7,7 %, причём разница была статистически достоверной ($P \leq 0,01$). Вместе с тем, при рождении телята этих двух групп по крупноплодности практически не различались.

Следовательно, на динамике живой массы телят в послеутробный период онтогенеза сказались, наряду с крупноплодностью, их генотипические особенности.

Указанные возрастные изменения живой массы подопытных тёлочек явились следствием неодинаковых ее приростов, о чём свидетельствуют данные таблицы 133.

Таблица 133 – Абсолютный прирост живой массы подопытных тёлочек, по возрастным периодам, кг

Возраст, месяцев	Группы			
	I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
0–3	65,1±2,85	65,6±2,2	67,3±2,19	72,9±3,24
3–6	80,9±2,15	83,1±3,24	82,0±3,71	81,1±4,0
6–9	71,2±6,78	73,6±3,58	74,6±2,5	74,0±7,3
9–12	64,6±6,29	66,9±3,49	78,5±1,96*	81,8±2,02**
12–15	47,1±2,69	52,4±5,04	54,1±2,69	54,8±4,65
15–18	38,2±4,03	54,1±3,86*	50,1±0,87*	52,6±1,71**

Наши исследования показали, что в период интенсивного роста, до достижения возраста 12 месяцев, наиболее высокий прирост живой массы получен от молодняка зарубежной селекции. В частности, абсолютный прирост венгерских тёлочек в этом периоде составил 309,8 кг, а трансплантантов – 302,4 кг. Это было больше, чем в контроле на 28 и 20,6 кг или на 9,9 и 7,3 % соответственно.

Помесный молодняк, полученный от коров белорусской чёрно-пёстрой породы, осеменённых спермой канадских быков, также рос быстрее чистопородных контрольных сверстников. Однако межгрупповая разница по величине прироста оказалась менее высокой и составила всего лишь 7,4 кг или 2,6 %. В возрасте с 12 до 18 месяцев приросты живой массы подопытных животных несколько выровнялись. Тем не менее, и в этом возрастном периоде от чистопородных тёлочек белорусской чёрно-пёстрой породы получено всего 85,3 кг прироста живой массы, что было меньше, чем от тёлочек венгерской селекции на 25,9 %, тёлочек-трансплантантов – на 22,2 и помесных тёлочек – на 24,9 %. Причём разница абсолютного прироста у тёлочек в возрасте 15 – 18 месяцев между тёлочками контрольной и II группы составляла 15,9 кг или 41,6 % ($P \leq 0,05$), между особями I и III группы – 11,9 кг или 31,2 % ($P \leq 0,05$), между тёлочками I и IV групп – 14,4 кг или 37,7 % ($P \leq 0,01$).

Как свидетельствуют данные таблицы 134, наиболее высокой скоростью роста характеризовались тёлочки венгерской селекции. По величине среднесуточного прироста живой массы они превосходили сверстниц других групп, причем более существенно тёлочек белорусской чёрно-пёстрой породы. Межгрупповая разница по этому признаку за весь период выращивания составила 94 г или 13,8 %. Телята, полученные в результате осеменения коров белорусской чёрно-пёстрой породы спермой канадских быков, росли быстрее чистопородного чёрно-пёстрого молодняка на 54 г в сутки или 8 %. Однако, и они уступали венгерским тёлочкам по величине среднесуточного прироста живой массы на 39 г или 5 %.

Быстрым ростом характеризовались чистопородные телята-трансплантанты. Среднесуточный прирост живой массы этих телят за весь период в среднем составил 753 г. Тем не менее, это было меньше, чем у венгерских тёлочек. Разница составила 19 г или 2,5 %.

Таблица 134 – Динамика среднесуточных приростов живой массы подопытных тёлочек по возрастным периодам, г

Возраст, мес.	Группы			
	I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
0–3	723,4±31,75	728,8±24,44	747,8±24,25	810,1±36,09
3–6	898,8±23,93	923,0±35,9	911,5±41,57	902,5±44,14
6–9	776,5±73,1	817,5±40,26	832,0±27,6	803,5±75,42
9–12	718,3±69,66	743,4±38,71	872,3±21,75*	909,3±22,54*
12–15	524,0±30	580,0±56,31	601,0±30,49	608,0±51,18
15–18	434,0±48,49	602,0±43,33*	558,0±10,09*	587,0±18,74*

Следует отметить, что указанные различия в скорости роста подопытных животных отчетливо проявились уже в самом начале постэмбрионального развития, а именно, в первые три месяца жизни. С возрастом межгрупповая разница по величине среднесуточного прироста живой массы у животных становилась все более отчетливой. Так, если в первые три месяца жизни венгерские тёлочки по среднесуточному приросту живой массы превосходили молодняк белорусской чёрно-пёстрой породы на 86,7 г или 12 %, то к концу выращивания эта разница увеличилась до 94 г или 13,8 %. Межгрупповая разница по величине среднесуточного прироста живой массы между помесным молодняком и телятами белорусской чёрно-пёстрой породы до 3-месячного возраста составляла 5,4 г или 0,8 %, а в конце опыта увеличилась до 54 г, или 8 %. Превосходство телят-

трансплантантов над молодняком контрольной группы по величине среднесуточного прироста возросло с 24,4 г или 3,4 % в первые три месяца постэмбрионального онтогенеза до 75 г или 11,1 % к концу выращивания. Причём разница среднесуточного прироста в возрасте 15–18 мес. между тёлками I и II групп была равна 68 г или 15,7 % ($P \leq 0,05$); между животными I и III групп – 75 г или 17,3 % ($P \leq 0,05$); между тёлочками I и IV групп – 91 г или 21 % ($P \leq 0,05$).

Сходные данные по среднесуточным приростам тёлочек разного генотипа были получены также другими исследователями. Так, по результатам исследований Л. Чохатариди [231], ремонтные тёлки кровностью 3/4 и 5/8 по голштинам отличались лучшими показателями среднесуточного прироста, как в отдельные возрастные периоды, так и за весь период выращивания. Они превосходили чистопородных чёрнопёстрых сверстниц до 6 месяцев выращивания на 116–75 г, с 6 до 12 месяцев – на 67–33 г, с 12 до 18 мес. – на 28–22 г, и в целом за период от рождения до 18-месячного возраста – на 72–43 г.

О характере роста животных судят не только по скорости этого процесса, характеризуемой абсолютным приростом, но и по его напряженности, отражением чего является кратность увеличения первоначальной живой массы животных. Такой рост рассчитывают по процентному отношению абсолютного прироста к усредненной живой массе животных, применяя формулу С. Броуди, и называют относительным ростом. Следовательно, на величине относительного роста сказывается не только его скорость, но и начальная живая масса животного. Нередко молодняк с низкой живой массой характеризуется более высоким относительным ростом по сравнению с более тяжеловесными особями. И это при том, что по скорости роста маловесные особи могут уступать более крупноплодному молодняку.

Аналогичная тенденция проявилась и в условиях нашего опыта.

Как свидетельствуют данные таблицы 135, по относительному росту выгодно отличался молодняк белорусской

чёрно-пёстрой породы. Напряженность роста этих животных оказалась наиболее высокой. Незначительно уступали им помесные тёлки, полученные с участием генетического материала канадских быков. Но это превосходство отчётливо проявилось на начальных этапах онтогенеза.

Таблица 135 – Относительная скорость роста подопытных тёлок по возрастным периодам, %

Возраст, месяцев	Группы			
	I – контроль	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
0–3	111,2±1,41	110,3±1,6	106,5±1,54*	107,0±2,53
3–6	62,2±2,37	61,7±2,29	59,5±2,88	55,8±2,56
6–9	33,3±3,81	34,5±1,64	34,5±0,91	33,4±3,21
9–12	23,5±2,15	23,8±1,14	26,9±0,77*	28,3±0,88
12–15	14,2±0,81	15,2±1,32	15,1±0,66	14,8±1,27
15–18	10,4±1,26	13,7±1,14	12,1±0,35	12,7±0,42

С возрастом относительный рост подопытного молодняка снижался, причем более резко у телят контрольной группы и помесного молодняка. В результате, в возрасте 9–12 месяцев этот показатель наоборот, по сравнению с контрольной группой стал выше у тёлочек-трансплантантов на 14,5 % ($P \leq 0,05$), и у тёлок венгерской селекции на 20,4 % ($P \leq 0,05$). В итоге за весь период выращивания, с момента рождения до достижения 18-месячного возраста, межгрупповая разница по этому показателю практически исчезла.

Полученные нами данные по изучению динамики живой массы тёлок разного генотипа согласуются со сведениями других исследователей. Так, согласно исследованиям, проведённым Н. Самбуриным [84], помесные тёлки первого поколения, полученные от скрещивания чёрно-пёстрых коров с голштинскими быками, росли лучше, чем чистопородные сверстницы материнской породы и 3/4-кровные. Скорость роста полукровных тёлок в период от рождения до 18 месяцев была

выше. Средняя живая масса их в возрасте 18 месяцев была на 8,4 % больше, чем масса чёрно-пёстрых тёлочек. Эти сведения подтверждаются также данными других авторов, которые утверждают, что показатели развития молодняка крупного рогатого скота в большей степени находится под влиянием кровности по голштинской породе [22; 111]. С другой стороны, согласно данным С. Батанова, Г. Берёзкиной [4], увеличение доли кровности по голштинской породе не оказало существенного влияния на уровень живой массы и интенсивность роста молодняка.

Таким образом, анализ динамики живой массы тёлочек от рождения до 18 месяцев позволил определить влияние генотипа на наращивание живой массы. Наиболее высокая живая масса при рождении наблюдалась у тёлочек венгерской селекции, что на 2–5,5 кг (6,8–21,1 %) выше сверстниц всех других групп ($P \leq 0,01$). В результате, к 18-месячному возрасту молодняк венгерской селекции достиг живой массы 448,8 кг, что было больше, чем у чистопородных сверстниц белорусской чёрно-пёстрой породы (I контрольная) и помесных животных (II опытная группа), соответственно, на 57 и 26 кг или на 14,5 % ($P \leq 0,001$) и 6,2 % ($P \leq 0,01$). Межгрупповая разница по живой массе между тёлками венгерской селекции и животными, полученными от пересадки эмбрионов крупного рогатого скота канадской селекции, оказалась менее существенной и составила в конце выращивания 12,6 кг или 2,9 % ($P \geq 0,05$).

При создании новых и совершенствовании существующих структурных единиц породы большое значение имеет выявление особей желательного типа телосложения как основного селекционного материала. Оценка экстерьера коровы является важной составляющей частью её племенной ценности, поскольку его развитие имеет связь с уровнем продуктивности, состоянием здоровья, воспроизводительными качествами и продолжительностью продуктивной жизни животного. Оценка и отбор животных по экстерьеру способствует повышению эффективности племенной работы в молочном скотоводстве. Это связано с тем, что гармонично развитые особи более

адаптированы к прогрессивным технологиям производства продукции животноводства и такие животные пользуются более высоким спросом на мировом рынке племенной продукции. В современных условиях ведения селекционно-племенной работы очень высокие требования предъявляются к матерям быков новых генераций. Эта категория племенных животных должна характеризоваться не только высокой молочной продуктивностью, но и оптимальным развитием признаков экстерьера и крепостью конституции [107]. Экстерьер и тип телосложения животных играют важную роль при производстве молока. Эти показатели отражают интенсивность и направление обмена веществ, молочную продуктивность, продолжительность использования коров и воспроизводительную способность [110].

С целью создания и совершенствования высокопродуктивных конкурентоспособных стад крупного рогатого скота молочного направления продуктивности необходимо изучать основные закономерности индивидуального роста и развития молодняка в раннем онтогенезе. Получить полное представление о характере роста и развития на основании только весовых данных не всегда возможно, так как при одной и той же живой массе часто встречаются животные различного размера. Рост и масса тела взаимосвязаны и влияют друг на друга: всякое изменение в живой массе отражается на росте животного, а изменение роста отражается на живой массе.

В США, Канаде, Англии, ФРГ и многих других странах широко и весьма успешно применяется линейная оценка телосложения животных, основанная на сравнительном изучении особенностей экстерьера с учётом отклонений от модельного животного или разработанного стандарта [26; 87].

Измерение животных и оценка экстерьера позволяют более объективно судить об их телосложении, изменяющемся с возрастом, и дают более полную характеристику роста и развития. Принимая во внимание важность вышеизложенного, нами были проведены исследования по изучению экстерьерных особенностей тёлочек, полученных разными биотехнологическими методами.

С целью выявления возрастных особенностей телосложения проводили взятие промеров и расчет основных индексов телосложения в возрасте 3, 6, 9, 12, 15 и 18 месяцев. При этом учитывали, что оценка экстерьера животных по промерам и индексам даст наиболее объективную возможность сравнивать их между собой.

В таблице 146 представлены промеры телосложения тёлоч, полученных разными биотехнологическими методами. Биометрически обработанные показатели промеров свидетельствуют о том, что тёлочки всех групп отличаются пропорциональностью телосложения. Однако установлено, что с возрастом интенсивность роста отдельных статей тела в группах была неодинакова. Лучше развивались тёлки III и IV опытных групп (чистопородные голштинские животные – трансплантаты канадской и тёлочки венгерской селекции), которые во все возрастные периоды превосходили животных белорусской чёрно-пёстрой породы и помесных тёлочек по всем линейным промерам.

Анализ данных, представленных в таблице 136 свидетельствует о том, что в трёхмесячном возрасте существенных различий по таким промерам, как высота в холке, обхват груди, ширина и глубина груди и обхват пясти у телят подопытных групп не выявлено ($P \geq 0,05$). Однако по промерам косой длины туловища трёхмесячные тёлочки третьей группы достоверно превосходили сверстниц белорусской чёрно-пёстрой породы ($P \leq 0,05$). Животные имели косую длину туловища на 5,5 см больше, чем у животных контрольной группы.

Необходимо отметить, что наиболее высокими были тёлочки, полученные методом трансплантации канадских эмбрионов: высота в холке у них была на 2,1–0,9 см больше, чем у сверстниц.

Таблица 136 – Промеры тёлоч подопытных групп, см

Группы тёлоч	Высота в холке	Глубина груди	Косая длина туловища	Обхват пясти	Обхват груди	Ширина груди
3 мес						
I	83,0±1,45	32,1±1,18	87,2±1,58	11,4±0,21	95,1±1,71	21,5±0,73
II	83,3±1,28	31,7±1,37	89,1±1,47	11,5±0,19	96,9±1,46	21,4±0,87
III	85,1±1,31	31,2±1,13	92,7±1,42*	11,1±0,16	98,1±1,12	20,4±0,67
IV	84,2±1,5	31,3±0,54	91,4±1,39	11,2±0,15	97,1±1,25	20,7±0,4
6 мес						
I	95,3±1,36	42,7±1,21	102,9±1,57	13,3±0,15	120,2±1,23	27,0±1,03
II	95,8±1,14	42,3±1,22	104,0±1,55	13,4±0,19	121,9±1,22	26,7±1,1
III	97,9±1,22	40,2±1,01	108,5±0,96	12,9±0,16	124,6±1,15	25,1±0,99
IV	97,0±1,42	41,0±1,21	106,2±1,28	13,0±0,17	123,1±1,46	25,5±0,65
9 мес						
I	111,3±0,9	52,9±0,75*	121,1±1,12	14,6±0,16	144,4±1,15	32,4±0,83
II	112,0±1,1	52,1±0,92	121,7±1,17	14,8±0,17*	146,8±1,27	32,2±0,81
III	115,3±0,97*	50,0±1,06	128,0±0,88***	14,2±0,17	149,3±1,21*	29,8±1,02
IV	114,4±1,0*	50,9±0,92	126,2±0,76**	14,4±0,18	148,9±0,8**	30,6±0,9
12 мес						
I	116,1±0,9	57,7±0,7	126,6±0,9	16,2±0,17	155,1±1,4	35,8±0,7
II	117,0±0,8	57,2±0,9	127,8±0,5	16,3±0,15	156,0±1,0	36,2±0,7*
III	122,5±1,03***	55,8±1,2	137,3±0,96***	16,0±0,11	161,1±1,12**	33,7±0,8
IV	121,8±0,9**	56,9±0,7	135,8±0,9***	16,1±0,12	161,7±1,05**	35,1±0,7
15 мес						
I	119,5±0,8	62,8±0,6**	138,2±1,2	16,7±0,17	167,3±0,9	39,4±0,7*
II	120,9±0,8	60,8±0,7	140,7±1,2	16,9±0,17	168,6±1,0	38,6±0,6*
III	125,5±1,03***	59,5±0,7	147,8±1,1***	16,5±0,13	171,9±0,8***	36,6±0,6
IV	124,1±1**	60,9±0,8	145,2±1,1**	16,6±0,12	170,0±1,2	37,9±0,5
18 мес						
I	125,5±0,96	67,4±0,8*	148,1±0,9	17,8±0,13	172,0±1,1	42,4±0,9
II	126,1±1,0	66,0±0,9	150,7±1	17,9±0,18	175,8±1,1*	42,2±0,9
III	132,1±0,9***	64,9±0,8	159,4±0,9***	17,5±0,17	182,4±0,7***	40,2±0,6
IV	131,0±1,04**	65,7±0,8	157,3±0,9***	17,7±0,13	181,8±1,1***	41,1±0,8

В возрасте 6 месяцев выявленные различия по исследуемым промерам являются незначительными и статистически недостоверными.

С возрастом преимущество тёлочек голштинской породы по линейным промерам сохранилось, что объясняется более высокой интенсивностью их роста. В девятимесячном возрасте тёлочки голштинской породы канадской и венгерской селекции характеризовались достоверным преимуществом в сравнении со средними данными по белорусской чёрно-пёстрой породе по таким промерам, как высота в холке, косая длина туловища, обхват пясти и обхват груди за лопатками. Тёлочки-трансплантаты и животные венгерской селекции в этом возрасте превосходили сверстниц контрольной группы по высоте в холке – на 4,0–3,1 см ($P \leq 0,01$), косой длине туловища – на 6,9–5,1 см ($P \leq 0,01$), обхвату груди – на 4,9–4,5 см ($P \leq 0,05$).

Оценивая величины промеров, полученные в результате измерения тёлочек в возрасте 12 месяцев, необходимо отметить, что животные контрольной группы уступают по некоторым промерам чистопородным голштинам. Так, тёлочки III и IV групп имеют заметное преимущество по высоте в холке – на 6,4 ($P \leq 0,001$) и 5,7 см ($P \leq 0,01$), косой длине туловища – на 10,7 и 9,2 см ($P \leq 0,001$), обхвату груди – на 6 и 6,6 см ($P \leq 0,01$) в сравнении со средними данными по группе особей белорусской чёрно-пёстрой породы. В этот период животные II группы характеризовались средним по сравнению с животными других групп ростом, уступая тёлочкам зарубежной селекции по высоте в холке и превосходя тёлочек контрольной группы на 0,8 %.

В 15-месячном возрасте установлена достоверная разница по высоте в холке между чистопородными чёрно-пёстрыми и голштинскими тёлками III и IV групп – на 6 см ($P \leq 0,001$) и 4,6 см ($P \leq 0,01$), косой длине туловища – на 9,6 см ($P \leq 0,001$) и 7 см ($P \leq 0,01$), соответственно. Наибольшими показателями по глубине груди характеризовались животные первой группы. Они и помесные тёлки второй группы достоверно ($P \leq 0,05$) превосходили своих сверстниц из третьей группы по ширине груди на 7,6 и 5,5 %, соответственно.

В конце периода выращивания тёлочки III и IV групп достоверно превосходили чистопородных чёрно-пёстрых по следующим промерам: высота в холке была больше на 6,6 см ($P \leq 0,001$) и 5,5 см ($P \leq 0,01$), косая длина туловища на 11,3 и 9,2 см ($P \leq 0,001$), обхват груди – на 10,4 и 9,8 см ($P \leq 0,001$) соответственно. Животные данных групп несколько уступали тёлкам из контрольной группы по таким промерам, как глубина груди (на 2,5–1,7 см), обхват пясти (на 0,25–0,1 см) и ширина груди (на 2,2–1,3 см).

За период выращивания от 3 до 18 месяцев у тёлочек всех групп наибольшее увеличение наблюдалось по показателям глубины груди (на 108–110 %), обхвата груди (на 80,9–87,2 %), ширины груди (на 97,1–98,6 %), наименьшее – по показателям высоты в холке (на 51,2–55,6 %), и обхвату пясти (на 56,3–58,3 %). Необходимо отметить, что молодняк III и IV опытных групп за исследуемый период времени имел большее по сравнению с помесным и отечественным скотом увеличение по таким показателям, как высота в холке (на 4,4–8 %), и косая длина туловища (на 3–2,2 %).

Изменение промеров и экстерьерных особенностей дает определенное представление о развитии животного и крепости его конституции. Однако значения линейных промеров позволяют судить лишь о развитии отдельных статей животных и ничего не говорят об особенностях телосложения. Поэтому для более полной характеристики экстерьера животных применяется метод индексов, рассчитанный на основе промеров животных, который позволяет более полно и обстоятельно характеризовать пропорции тела животного.

Как свидетельствуют результаты наших исследований, приведенные в таблице 137, подопытный молодняк различался по индексам телосложения уже в трёхмесячном возрасте. Так, по отношению к тёлочкам-трансплантатам достоверно большие значения индекса сбитости (на 3 и 2,7 %) и индекса костистости (на 4,8–5,4 %) имел молодняк, полученный методом осеменения коров спермой отечественных и канадских быков.

Таблица 137 – Индексы телосложения подопытных тёлочек, %

Группы тёлочек	Длинноногости	Сбитости	Костистости	Растянутости	Грудной
	3 мес				
I	61,4±0,94	109,1±1,09*	13,7±0,12*	105,2±1,66	67,1±1,16
II	62,0±1,31	108,8±0,87*	13,8±0,13**	107,1±1,60	67,7±1,04
III	63,4±0,86	105,9±1,0	13,1±0,17	109,0±0,73	65,5±0,73
IV	62,8 ±0,70	106,3±1,01	13,3±0,13	108,6±0,83	66,1±0,59
6 мес					
I	55,3±0,81	116,9±0,90	14,0±0,16	108,0±1,34	63,2±1,27
II	55,8±1,39	117,3±1,02	14,0±0,17	108,6±1,36	63,0±1,39
III	58,9±0,93*	114,9±0,93	14,2±0,20	110,9±0,63	62,3±1,28
IV	57,8±0,94	115,9±0,35	14,4±0,11*	109,6±1,50	62,4±1,48
9 мес					
I	52,5±0,53	119,3±0,41**	13,1±0,15**	108,8±0,47	61,2±1,16
II	53,5±0,50	120,6±0,50***	13,2±0,14**	108,7±0,40	61,8±1,13
III	56,7±0,66***	116,7±0,72	12,3±0,15	111,0±0,66*	59,5±1,22
IV	55,5±0,54**	118,0±0,42	12,6±0,10	110,4±0,64*	60,1±1,07
12 мес					
I	50,3±0,43	122,5±0,74***	14,0±0,13***	109,1±0,67	62,0±0,83
II	51,1±0,48	122,1±0,66***	13,9±0,11***	109,3±0,82	63,3±0,62*
III	54,5±0,70***	117,3±0,50	13,1±0,07	112,1±0,45**	60,4±0,70
IV	53,3±0,42***	119,1±0,44*	13,2±0,10	111,5±0,48*	61,7±0,71
15 мес					
I	47,5±0,30	121,1±0,38***	14,0±0,10***	115,6±0,43	62,7±0,66
II	49,7±0,36***	119,9±0,43***	13,9±0,10***	116,4±0,31	63,5±0,93
III	52,6±0,22***	116,3±0,45	13,2±0,10	117,8±0,25**	61,5±0,67
IV	50,9±0,34***	117,1±0,45	13,4±0,11	117,0±0,29*	62,2±0,54
18 мес					
I	46,3±0,35	116,2±0,52*	14,2±0,12***	118,0±0,33	62,9±0,71
II	47,7±0,37*	116,7±0,46**	14,2±0,19**	119,5±0,54	63,9±0,75
III	50,9±0,35***	114,5±0,45	13,3±0,10	120,7±0,44***	62,0±0,56
IV	49,9±0,25***	115,6±0,36	13,5±0,15	120,1±0,74*	62,5±0,72

Большей высокорослостью характеризовались тёлочки III опытной группы – индекс длинноногости у них был на 3,3; 2,3 и

1,0 % выше, чем у сверстниц контрольной, второй и четвёртой опытных групп, соответственно.

Наши исследования показали, что в период интенсивного роста, по достижении возраста 9 месяцев, тёлки зарубежной селекции (III и IV групп), по сравнению со сверстницами белорусской черно-пестрой породы достоверно отличались более высокими индексами длинноногости – на 8 ($P \leq 0,001$) и 5,8 % ($P \leq 0,01$) и растянутости – 2,1 и 1,4 % ($P \leq 0,05$), при меньшем значении индексов сбитости – на 2,2 и 1,1 % ($P \leq 0,01$), костистости – на 6,5 и 4,2 % ($P \leq 0,001$) и грудного – на 2,9 и 1,9 % ($P \geq 0,05$). В то же время помесный молодняк имел несущественное превосходство по этим промерам над животными первой группы.

Та же тенденция наблюдается в 12-ти и 15-ти месячном возрасте. Так, в возрасте 12 месяцев достоверными в пользу голштинских тёлочек оказались различия в следующих индексах: длинноногости (на 8,3 и 5,9 %) и растянутости (на 2,8 и 2,4 %).

В 15-месячном возрасте то же преимущество остаётся за тёлками импортных генотипов: по индексу длинноногости – на 10,9 и 7,4 % ($P \leq 0,001$), индексу растянутости – на 1,9 % ($P \leq 0,01$) и 1,2 % ($P \leq 0,05$). Тёлки, полученные от сочетания коров чёрно-пестрой породы с белорусскими и канадскими быками характеризовались высоко достоверным превосходством по индексам сбитости – на 4,1 и 3 % ($P \leq 0,001$) и костистости – на 6,3 и 6 % ($P \leq 0,001$) по сравнению с тёлками-трансплантатами.

В 18-месячном возрасте тёлки голштинской породы канадской и венгерской селекции по сравнению с чистопородными чёрно-пестрыми имели большие индексы: длинноногости – на 9,9 и 7,7 % ($P \leq 0,001$), растянутости – на 2,3 % ($P \leq 0,001$) и 1,8 % ($P \leq 0,01$), а также достоверно более низкие индексы сбитости ($P \leq 0,05$) и костистости ($P \leq 0,01$), что указывает на более выраженный молочный тип телосложения.

Не установлено достоверных различий между тёлочками I и II групп по индексам телосложения во все возрастные периоды. К возрасту достижения хозяйственной зрелости (18 месяцев) выявлены несколько большие – на 2,9 % ($P \leq 0,05$)

показатели индекса длинноногости у помесных тёлочек. Характерное уменьшение с возрастом индексов длинноногости, грудного, и увеличение индексов растянутости, костистости, сбитости согласуется с биологическими закономерностями роста молодняка.

Тенденция повышения качества экстерьера коров с повышением условной доли наследственности по голштинской породе выявлена также и другими исследователями [68]. Согласно их данным, все помесные по голштинской породе животные превосходили чистопородных чёрно-пёстрых сверстниц во все возрастные периоды по высотным промерам, а также кривой длине туловища. Они отличаются более высокими индексами длинноногости и растянутости при меньшем значении индексов сбитости, грудного и костистости.

Таким образом, увеличение кровности по голштинской породе существенно отразилось на показателях линейного роста тёлочек в период выращивания от 3 до 18 месяцев. Возрастная изменчивость промеров подтверждает более высокую энергию роста у животных голштинской породы. Во все возрастные периоды телки голштинской породы канадской и венгерской селекции были более высокорослы, растянуты и узкотелы, с менее развитой мускулатурой, более тонким костяком, имеют более выраженный молочный тип телосложения по сравнению со сверстницами, полученными при использовании спермы быков белорусской селекции.

Биохимические показатели крови. Совершенствование продуктивных и племенных качеств животных достигается как внутривидовой селекцией, так и использованием в системах разведения завезённого поголовья высокопродуктивных пород мирового класса. Однако у импортированных из различных природно-климатических зон животных в процессе их адаптации происходят определённые изменения как во внешних формах, так и в сложном комплексе интерьерных признаков. В свою очередь данные изменения сказываются на течении обменных процессов в организме животных, их резистентности, а в конечном итоге – на характере и уровне продуктивности [13;

101]. В этой связи изучение интерьера животных, особенностей метаболизма позволяет контролировать состояние их здоровья, жизнеспособность, резистентность, стрессоустойчивость, что особенно важно при ведении углубленной племенной работы [62].

Применение различных биотехнологических методов с целью ускоренного размножения животных позволяет значительно упростить процедуру использования ценного генетического материала зарубежной селекции посредством завоза эмбрионов, замороженных в жидком азоте. Исследования показывают, что на животных, полученных методом трансплантации эмбрионов, ослабляется действие негативных последствий адаптации к новым условиям кормления и содержания, которые имеют место при завозе и перемещении непосредственно самих животных. Вероятно, это связано с тем, что эмбрионы, пересаженные местным реципиентам, в процессе своего развития получают от «приёмной» матери комплекс механизмов, способствующих формированию резистентности организма в период постнатального развития. Однако неясно, в какой степени животное-реципиент обеспечивает вынашиваемый приплод защитными факторами.

В этой связи одной из задач нашей работы явилось исследование физиологических особенностей телят, полученных с использованием разных биотехнологических методов, путём выявления некоторых биохимических процессов, происходящих в их организме в постнатальный период развития.

В результате проведённых исследований установлено, что белковый состав крови менялся незначительно в зависимости от происхождения телят и их возраста. В трехмесячном возрасте более высоким содержанием белка характеризовались телята, полученные от коров, осеменённых спермой быков голштинской породы канадского происхождения (II группа) и животных венгерской селекции (IV группа). Молодняк, полученный от отечественных быков, уступал им на 5,62–5,85 %. Телята-трансплантанты (III группа) по этому показателю занимали промежуточное положение (табл. 138).

С возрастом концентрация общего белка в крови телят менялась по-разному. У животных всех подопытных групп его уровень повысился, притом более существенно у телят-трансплантантов и молодняка, полученного от быков белорусской чёрно-пёстрой породы, чем у их сверстников II и IV групп. Если 18-месячные телята этих групп превосходили трёхмесячных по уровню белка на 11,76 и 7,86 %, то их сверстники второй и четвёртой групп – только на 3,61 и 5,37 %. В результате к концу опыта молодняк, полученный от коров, осеменённых спермой канадских голштинцев и белорусских чёрно-пёстрых быков, по содержанию белка в крови практически сравнялись. Телята-трансплантаты и их сверстники венгерской селекции также имели близкие значения по этому показателю.

Максимальной величиной содержания общего белка в крови в возрасте 18 месяцев характеризовались животные четвёртой группы, где разница с животными первой, второй, и третьей групп составила, соответственно, 6,45 %, 4,58 и 0,33 %.

Иные тенденции выявлены при изучении альбуминовой и глобулиновой фракций белка. Так, в начале опыта тёлки, полученные от нетелей венгерской селекции, по содержанию альбумина уступали сверстницам первой, второй и третьей групп на 9,99 %, 11,26 и 6,34 %. Содержание этих белков в крови молодняка трёх других групп было практически одинаковым и составляло, соответственно, 31,35 г/л, 31,8 и 30,13 г/л.

По мере роста животных уровень альбуминов у подопытных животных снижался. Однако интенсивность этих изменений оказалась неодинаковой. Более существенно (на 22,84 %) понизилось содержание этих белков в крови телят первой группы. В меньшей мере (на 18,49 %) уменьшилось количество альбуминов у молодняка, полученного от коров, осеменённых спермой канадских быков. В результате у телят этих групп (первой и второй) концентрация альбумина почти сравнялась. Несколько иной была степень возрастного снижения уровня альбуминов в крови телят-трансплантантов и телят,

полученных от венгерских нетелей (третья и четвёртая группы). Содержание данных белков у этих животных к концу исследования понизилось, соответственно, на 13,58 и 7,34 %, что сгладило межгрупповую разницу по уровню данного белка, сложившуюся в начале опыта. По количеству альбумина 18-месячные тёлки первой и второй групп также заметно не различались, однако уступали молодняку III и IV групп.

Таблица 138 – Биохимический статус крови подопытных тёлок

Возраст, месяцев	Показатели	Группы тёлки			
		I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
3	Общий белок, г/л	62,47±4,83	66,19±4,63	63,97±3,25	66,35±5,18
	Альбумины, г/л	31,35±2,85	31,8±2,33	30,13±2,18	28,22±2,80
	Глобулины, г/л	31,12±2,72	34,4±3,54	33,99±2,79	38,24±5,12
	Альбумин/Глобулин	1,09±0,09	1,01±0,11	0,92±0,12	0,9±0,15
6	Общий белок, г/л	66,59±3,15	64,66±3,63	65,54±3,18	62,64±3,83
	Альбумины, г/л	31,27±2,56	30,66±1,80	28,25±2,73	27,69±2,18
	Глобулины, г/л	35,3±1,46	34,01±2,70	37,22±3,2	35,03±4,34
	Альбумин/Глобулин	0,79±0,10	0,94±0,08	0,83±0,11	0,97±0,17
9	Общий белок, г/л	68,89±4,09	67,55±3,46	70,50±3,01	61,36±2,61
	Альбумины, г/л	29,02±2,88	27,06±2,20	27,64±1,90	25,38±2,56
	Глобулины, г/л	40,87±2,64	40,51±3,79	42,88±3,80	35,97±3,09
	Альбумин/Глобулин	0,77±0,09	0,85±0,13	0,74±0,12	0,79±0,12
12	Общий белок, г/л	65,03±3,61	67,10±3,35	66,94±3,30	64,35±4,17
	Альбумины, г/л	25,42±2,09	27,1±2,57	26,72±3,19	25,00±2,40
	Глобулины, г/л	39,61±2,63	40,06±2,50	40,23±1,08	39,46±3,39
	Альбумин/Глобулин	0,67±0,06	0,72±0,09	0,66±0,09	0,68±0,08
18	Общий белок, г/л	67,38±3,16	68,58±2,39	71,49±2,65	71,72±2,85
	Альбумины, г/л	24,19±1,21	25,92±1,57	26,04±2,47	26,15±1,60
	Глобулины, г/л	43,18±1,85	42,66±1,51	45,45±1,02	45,58±2,44
	Альбумин/Глобулин	0,57±0,06	0,63±0,04	0,58±0,06	0,59±0,05

Заметно различался подопытный молодняк в начале опыта и по содержанию глобулинов. Максимальным его уровнем

характеризовались тёлки четвёртой группы. По концентрации этих белков они превосходили сверстниц первой, второй и третьей групп, соответственно, на 22,88 %, 11,17 и 12,5 %.

Обращает на себя внимание различная интенсивность возрастной динамики глобулинов. Если у телят четвёртой группы к концу исследований их количество увеличилось на 7,34 г/л или на 19,2 %, то у животных первой группы – на 38,76 %. Концентрация глобулинов в крови телок второй и третьей групп повысилась, соответственно, на 24,02 и 33,72 %. В результате таких различий в возрастной динамике этих белков межгрупповая разница по их содержанию у подопытного молодняка к концу опыта нивелировалась.

Указанные различия в уровне и возрастной динамике альбуминов и глобулинов отразились также и на соотношении этих фракций. Как показали наши исследования, менее высоким это отношение было у трехмесячных телят, полученных от венгерского скота (IV группа), а максимальным у телят первой группы, полученных от отечественных быков. Оно составляло соответственно 0,9 и 1,09 ед. С возрастом тёлочек отношение альбуминов к глобулинам понизилось. Одновременно уменьшилась и межгрупповая разница по этому показателю.

Известно, что в организме животных глобулины представлены тремя фракциями (α -, β -, и γ), выполняющими различные функции. Практический интерес представляют γ -глобулины, поскольку они отражают уровень защитной функции молодняка. Наши исследования показали, что подопытные тёлки различались несущественно как по соотношению указанных фракций, так и по их возрастной динамике. Так, в начале опыта содержание γ -глобулинов было более высоким в крови телят четвёртой группы. Разница с молодняком второй, третьей и первой групп по этому показателю составила 37,27%, 24,50 и 29,47% (таблица 139).

В конце опыта по количеству γ -глобулинов также заметно выделялись телята, полученные от нетелей голштинской породы, импортированных из Венгрии (IV группа). По их содержанию телки этой группы стали превосходить сверстниц

из других групп. Разница с молодняком, полученным при осеменении коров спермой быков чёрно-пёстрой породы, составила 10,52 %, с тёлками, полученными от канадских быков – 18,3 % и телятами-трансплантатами – 2,44 %.

Таблица 139 – Содержание фракций глобулинов в крови подопытных тёлочек

Возраст, месяцев	Фракции глобулинов, г/л	Группы тёлочек			
		I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
3	Альфа	11,51±1,10	12,59±1,34	12,91±1,61	13,28±1,74
	Бета	7,32±1,12	8,26±1,18	8,05±1,40	8,09±0,95
	Гамма	12,29±1,73	13,55±2,93	13,03±2,67	16,87±3,43
6	Альфа	13,56±1,45	13,8±1,44	13,35±1,85	11,92±1,63
	Бета	7,14±1,22	8,12±1,32	7,20±1,02	6,96±1,04
	Гамма	14,6±1,86	12,09±2,61	16,67±2,53	16,16±4,15
9	Альфа	13,12±1,52	16,11±1,89	18,78±2,82	12,47±1,58
	Бета	8,12±1,28	9,81±1,96	9,01±1,65	6,58±1,80
	Гамма	18,63±2,31	14,59±3,05	15,10±2,59	16,93±3,64
12	Альфа	12,07±0,94	15,06±1,96	16,35±1,73	13,04±1,45
	Бета	7,72±0,95	8,97±1,33	7,58±0,97	8,41±1,30
	Гамма	19,82±2,70	16,04±2,27	16,30±2,02	18,02±3,47
18	Альфа	16,04±0,69	16,49±1,27	17,12±1,40	17,03±1,22
	Бета	8,00±0,72	9,12±0,93	8,64±0,81	8,37±0,93
	Гамма	18,25±1,80	17,05±1,83	19,69±1,49	20,17±1,83

Как видно из приведенных данных, тёлки сравниваемых групп различались несущественно и по возрастной динамике γ -глобулинов. Если у молодняка четвёртой группы содержание их возросло только на 19,57%, первой и второй группы – соответственно на 48,5 и 25,83%, то у телят, полученных от трансплантации заморожено-оттаянных эмбрионов – на 51,12%.

Наши исследования показали, что в начале опыта тёлочки, полученные от канадских быков и телята-трансплантаты (II и III группы) уступали возрастным аналогам двух других групп по активности ферментов переаминирования (таблица 140). Причем, более активными эти ферменты оказались у телок, полученных от завезенных нетелей.

Таблица 140 – Биохимические показатели крови, отражающие функцию печени подопытных тёлочек

Показатели	Возраст тёлок, мес.	I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
АЛТ, Е/л	3	10,78±1,69	9,50±1,62	7,29±1,89	13,38±1,72
	6	9,44±1,31	9,49±1,64	12,64±1,37	9,47±1,25
	9	13,99±2,97	12,65±2,11	13,86±1,63	11,03±2,21
	12	14,51±1,87	14,29±2,34	15,09±2,16	13,74±1,97
	18	15,01±1,37	15,65±1,76	16,54±1,53	15,42±1,30
АСТ, Е/л	3	25,03±2,2	24,4±3,29	26,51±2,72	29,29±2,20
	6	28,35±3,5	29,48±4,13	33,22±1,90	23,85±2,26
	9	46,81±4,5	44,93±4,68	47,11±4,15	47,84±5,35
	12	47,03±3,89	45,03±4,12	48,02±4,15	47,49±4,66
	18	54,50±3,01	56,16±3,07	57,88±3,12	55,04±3,25
Холестерин, ммоль/л	3	2,18±0,21	1,43±0,22	1,32±0,19	2,39±0,16
	6	1,30±0,12	1,31±0,15	1,24±0,12	1,12±0,09
	9	2,18±0,48	2,27±0,48	2,79±0,28	2,07±0,57
	12	1,90±0,36	2,15±0,38	2,44±0,39	1,73±0,20
	18	2,47±0,29	2,71±0,30	2,95±0,27	2,50±0,21
Билирубин, мкмоль/л	3	2,74±0,29	2,00±0,22	2,81±0,40	2,60±0,29
	6	2,99±0,58	2,28±0,35	2,57±0,33	2,43±0,21
	9	4,35±0,87	4,67±0,90	4,06±0,75	2,48±0,42
	12	3,19±0,66	3,82±0,91	4,03±0,90	2,93±0,39
	18	4,39±0,42	5,60±0,60	6,02±0,67	4,85±0,38

Активность указанных ферментов с возрастом усилилась, однако интенсивность увеличения была неодинаковой. Наиболее высокое изменение активности оказалось у телят-трансплантантов и молодняка второй группы, полученного от коров, осемененных спермой канадских голштинов. В крови телят четвёртой группы активность АЛТ к концу опыта практически не изменилась, а активность АСТ увеличилась, но в меньшей мере (на 87,9 %), чем у животных других групп. В частности, активность АСТ в крови молодняка первой группы повысилась на 117,73 %, второй – на 130,16 и третьей – на 118,3 %. Это было больше, чем у телят четвёртой группы соответственно на 29,8; 42,3 и 30,4 абсолютных процентов. В

результате таких возрастных изменений к концу опыта молодняк всех групп по активности ферментов переаминирования сравнялся.

С возрастом содержание холестерина менялось. Причем у животных с максимальным его первоначальным уровнем оно понизилось, а с минимальным, наоборот, повысилось. В результате к концу опыта ситуация поменялась. Более высокий уровень холестерина оказался у телят-трансплантантов (2,95 ммоль/л) и телят, полученных от канадских быков (2,71 ммоль/л). Более того, существенно уменьшилась межгрупповая разница по количеству холестерина в крови подопытных животных до статистически недостоверных величин.

В начале опыта тёлки-трансплантанты отличались от сверстниц других групп повышенным содержанием билирубина. Их превосходство над молодняком первой, второй и четвертой групп составляло 2,55 %, 40,5, и 8,08 %, соответственно. С возрастом уровень билирубина в крови телят всех групп повысился, причем более существенно (в 2,8 раза) у молодняка второй группы. Заметно, на 114,2 % к концу опыта увеличилось содержание билирубина и у телят-трансплантантов. У молодняка первой и четвертой групп этого пигмента стало больше только на 60,22 и 86,54 %. В результате такой возрастной динамики разница по концентрации билирубина в крови молодняка, полученного от быков канадской селекции и телят-трансплантантов (вторая и третья группа) уменьшилась с 40,5 % до 7,5 %, а между животными третьей и четвёртой, а также третьей и первой групп, наоборот, увеличилась, соответственно, с 8,08 и 2,55 % до 24,12 и 37,13 %. Тем не менее, эти различия оказались статистически недостоверными и носили характер тенденции.

Нарушения минерального обмена веществ являются одним из основных факторов, препятствующих реализации генетического потенциала молочной продуктивности коров. Наиболее важную роль в метаболических процессах минерального обмена выполняют кальций, фосфор, железо и магний. В наших исследованиях изучались особенности обмена

этих элементов у телят разных генотипов, полученных различными биотехнологическими методами.

Таблица 141 – Минеральный состав крови подопытных тёлочек

Показатели	Возраст тёлок, мес.	I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
Кальций, ммоль/л	3	2,14±0,18	1,92±0,21	2,11±0,17	2,31±0,17
	6	2,47±0,16	2,34±0,18	2,63±0,23	1,91±0,20
	9	2,33±0,25	2,28±0,15	2,26±0,23	2,36±0,29
	12	3,20±0,34	2,80±0,29	3,03±0,43	3,66±0,31
	18	3,52±0,20	3,16±0,27	3,60±0,31	3,88±0,25
Фосфор, ммоль/л	3	2,02±0,14	1,71±0,17	2,03±0,34	2,06±0,15
	6	2,03±0,15	1,87±0,19	1,74±0,10	1,90±0,13
	9	1,63±0,19	1,55±0,09	1,67±0,07	1,41±0,08
	12	1,60±0,17	1,51±0,14	1,65±0,19	1,42±0,15
	18	1,56±0,15	1,48±0,16	1,52±0,16	1,46±0,16
Железо, мкмоль/л	3	15,16±1,69	13,7±1,82	10,58±1,61	14,30±2,02
	6	16,41±1,37	13,91±1,85	14,21±1,27	12,88±1,53
	9	18,95±1,40	17,90±1,73	19,57±1,64	18,81±1,21
	12	18,78±2,08	18,34±1,61	19,20±1,57	19,16±2,05
	18	22,21±1,48	21,62±1,2	21,51±1,30	20,78±1,5
Магний, ммоль/л	3	1,19±0,12*	1,17±0,10*	0,69±0,12	1,16±0,17
	6	1,00±0,10	1,12±0,12	0,81±0,14	1,06±0,08
	9	0,79±0,10	0,76±0,05	0,82±0,09	0,71±0,11
	12	0,70±0,12	0,71±0,10	0,75±0,12	0,78±0,11
	18	0,71±0,11	0,73±0,10	0,72±0,07	0,75±0,08

Как показали наши исследования, содержание кальция и фосфора, а также магния и железа у подопытного молодняка всех групп находилось в пределах физиологической нормы (таблица 141). Однако уже в начале опыта молодняк, полученный от голштинских быков канадской селекции (вторая группа), уступал сверстникам других групп по содержанию кальция и фосфора в крови, а тёлки-трансплантанты (третья группа) – по количеству железа и магния, причём, межгрупповая разница по концентрации указанных элементов колебалась в

довольно широких пределах – от менее значимой по кальцию и фосфору, до статистически достоверной по магнию ($P \leq 0,05$).

Различной оказалась и возрастная динамика изучаемых минеральных веществ. В частности, количество кальция с возрастом телят третьей и четвёртой групп повысилось на 70,62 и 67,97 %, а первой и второй – соответственно на 64,49 и 64,59 %. Однако ранговое распределение животных по содержанию этого минерала в их крови в конце опыта не изменилось. Как и в начале опыта больше кальция оказалось в крови молодняка четвёртой группы, а минимальное количество – у телят второй группы.

Аналогичным образом, но с разной интенсивностью менялось и содержание железа. В результате по его количеству 18-месячные телята первой, второй, третьей и четвертой групп стали превосходить трёхмесячных, соответственно, на 46,51 %, 57,81, 103,31 и 45,32 %. Следствием такой возрастной динамики существенно уменьшилась межгрупповая разница по концентрации этого элемента в крови молодняка. Если в начале опыта она колебалась в широких пределах – от 0,86 до 4,58 ммоль/л, то к его окончанию уменьшилась до 0,11–1,43 ммоль/л, то есть по содержанию железа в крови 18-месячные телята подопытных групп практически сравнялись.

Несколько иначе менялось содержание фосфора и магния. В частности, концентрация фосфора с возрастом телят всех групп последовательно снижалась. В конце исследования его уровень стал ниже, чем в трёхмесячном возрасте на 13,45–29,13 %. Аналогично изменялось и содержание магния, но только у телят первой, второй и четвёртой групп, к 18-месячному возрасту уровень его у этих животных понизился до 0,71, 0,73 и 0,75 ммоль/л или на 40,34 %, 37,61 и 35,35 %, соответственно. В то же время у телят-трансплантантов (третья группа) с возрастом концентрация этого элемента не только не понизилась, а наоборот, стала выше на 4,35 % в сравнении с начальным его уровнем. В результате таких возрастных изменений нивелировалась существенная начальная межгрупповая разница по содержанию магния, и в конце опыта

молодняк всех групп по уровню этого элемента в крови не различался.

Таким образом, установлено, что влияние происхождения в большей мере сказалось на биохимических показателях крови телят трёхмесячного возраста. Тёлки, полученные от импортированных нетелей венгерской селекции превосходили сверстниц других групп по содержанию общего белка, γ -глобулинов, кальция, фосфора, холестерина, активности ферментов переаминирования, но уступали им по концентрации альбумина. В крови телят-трансплантатов выявлен повышенный уровень билирубина, но пониженный – холестерина, железа, магния и глобулинов, а также пониженная активность аланинаминотрансферазы.

По мере роста подопытных животных биохимический состав их крови нивелировался. В возрасте 12 месяцев телята по изучаемым показателям крови достоверно не различались.

Биохимический состав крови у телят на всем протяжении исследований находился в пределах физиологической нормы. Способ получения телят не сказался на их способности к адаптации.

Морфологические показатели крови. Кровь выполняет многообразные функции и обеспечивает необходимые условия для жизнедеятельности всех органов и тканей организма животного. В свою очередь состав крови во многом зависит как от состояния организма в целом, так и от отдельных его органов и тканей. При нарушении их функций, развитии местных или общих патологических процессов меняется не только биохимический, но и морфологический состав крови. Следовательно, для объективной оценки состояния организма, наряду с биохимическими и физико-химическими исследованиями, необходимо иметь данные по клеточному составу крови [51].

Для научно обоснованной оценки эффективности ускоренного воспроизводства крупного рогатого скота с использованием различных биотехнологических методов важно оценить состояние здоровья и устойчивость полученного

молодняка к воздействию внешних факторов среды в различные эксплуатационные периоды в промышленных условиях ведения отрасли. Любой организм в соответствии с генотипом даже при наличии экстремальных условий обладает способностью сохранять гомеостаз, при этом картина крови сохраняет свои индивидуальные и видовые особенности. Кровь, являясь внутренней средой для всех органов и тканей, наиболее полно отражает в себе разнообразные биохимические и физические процессы, происходящие в организме.

Известно, что морфологические и биохимические свойства отдельных компонентов крови отражают интерьерные особенности животных и характеризуют их адаптивные возможности. Поэтому в своих исследованиях в качестве критериев сравнительной оценки молодняка опытных и контрольной групп нами изучены следующие показатели крови: количество лейкоцитов, эритроцитов, содержание гемоглобина. Результаты проведенных исследований показаны в таблице 142.

Таблица 142 – Морфологические показатели крови подопытных тёлочек в разном возрасте

Показатели	Возраст тёлочек, мес.	Группы тёлочек			
		I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
Эритроциты, млн/мм ³	3	7,50±0,67	7,30±0,68	7,00±0,50	7,10±0,61
	6	7,60±0,50	7,40±0,53	6,60±0,44	7,00±0,40
	9	8,40±0,55	8,30±0,58	7,50±0,54	7,80±0,51
	12	6,20±0,36	7,00±0,33	7,00±0,29	6,50±0,32
	18	6,40±0,62	5,90±0,31	5,90±0,59	6,00±0,67
Гемоглобин, г/л	3	117,30±6,52	117,10±5,47	111,20±4,42	115,00±12,29
	6	117,70±5,50	114,00±7,82	109,90±5,93	110,60±7,99
	9	106,10±4,87	105,70±5,21	101,90±4,88	97,10±4,05
	12	91,90±4,66	94,50±4,71	92,70±4,33	88,00±5,39
	18	103,00±4,87	98,70±3,71	97,50±3,62	95,80±2,25
Лейкоциты, тыс./мм ³	3	9,50±1,32	9,60±1,41	12,50±1,85	11,90±1,56
	6	12,50±2,01	11,10±1,59	13,56±1,90	14,10±2,59
	9	8,90±1,19	9,40±1,30	14,10±1,40*	11,60±1,18
	12	10,50±1,74	9,70±1,38	12,50±1,57	12,30±1,72
	18	9,90±1,07	8,90±1,22	10,50±1,44	11,80±1,12

Как видно из приведенных данных, морфологический состав крови подопытных телят претерпевал некоторые изменения по возрастам. Так, количество эритроцитов в крови тёлочек всех групп с возрастом увеличилось незначительно и достигло максимальной величины 7,5–8,4 млн/мм³ в возрасте 9 месяцев. Во все возрастные периоды существенных различий по количеству эритроцитов в крови между животными разных групп не выявлено.

Самый высокий уровень гемоглобина во все возрастные периоды отмечен у тёлочек белорусской селекции и помесных животных. Так, в 3-месячном возрасте тёлочки контрольной группы превосходили животных III и IV опытных групп на 5,5 и 2,0 % соответственно. В возрасте 6 месяцев это превосходство составило 7,1 и 6,4 %, а в 9 месяцев – 4,1 и 9,3 %, соответственно.

Анализ динамики изменения уровня гемоглобина показал, что наблюдается его закономерное снижение в крови животных всех групп до 12-месячного возраста. В возрасте 18 месяцев во всех группах отмечено некоторое увеличение содержания гемоглобина в крови. В указанный возрастной период тёлочки белорусской чёрно-пёстрой породы по уровню гемоглобина превышали своих сверстниц голштинской породы: тёлочек-трансплантатов на 5,6 %, тёлочек венгерской селекции на 7,5 %. Эту закономерность можно объяснить тем, что в организме интенсивно растущих животных голштинской породы импортной селекции на более высоком уровне протекают окислительно-восстановительные процессы, что сопровождается снижением содержания гемоглобина в крови. Полученные результаты сходны с данными других авторов [4].

По содержанию лейкоцитов в крови подопытных тёлочек отмечаются некоторые различия. Так, содержание лейкоцитов в трёхмесячном возрасте было выше у тёлочек III и IV опытных групп и составляло 12,5 и 11,9 тыс./мм³ против 9,5 и 9,6 тыс./мм³ у тёлочек контрольной и второй опытной групп. В возрасте 6 месяцев наблюдается некоторое превышение нормы содержания лейкоцитов у животных-трансплантатов (13,56 тыс./мм³) и

тёлочек венгерской селекции (14,1 тыс./мм³). Максимальное содержание лейкоцитов отмечено в возрасте 9 месяцев у тёлочек третьей (14,1 тыс./мм³), и четвёртой групп (11,6 тыс./мм³), что больше, чем в крови животных белорусской чёрно-пёстрой породы на 58,4% ($P \leq 0,005$) и 30,3%, соответственно.

В 12 месяцев наблюдается уменьшение количества лейкоцитов в крови животных III и IV опытных групп, и превосходство этого показателя над контрольной группой составило 17,2 % и 19 %. В возрасте 18 месяцев разница с контролем по данному показателю составила 19,2 и 6,1 %, соответственно. Однако эти различия не достоверны.

Таким образом, в целом содержание форменных элементов в крови тёлочек всех подопытных групп находилось в пределах физиологической нормы. Количество эритроцитов с возрастом увеличилось незначительно и достигло максимальной величины (7,5–8,4 млн/мм³) в возрасте 9 месяцев.

Самый высокий уровень гемоглобина во все возрастные периоды отмечен у тёлочек белорусской чёрно-пёстрой породы и у помесных животных. В 3-месячном возрасте по этому показателю тёлочки контрольной группы превосходили животных III и IV опытных групп на 5,5 и 2,0 %, соответственно, в 6 месяцев это превосходство составило 7,1 и 6,4 %, а в 9 месяцев – 4,1 и 9,3 %, соответственно.

Содержание лейкоцитов в трёхмесячном возрасте было выше у тёлочек III и IV опытных групп и составляло 12,5 и 11,9 тыс./мм³ против 9,5 и 9,6 тыс./мм³ у тёлочек контрольной и второй опытной групп. В возрасте 6 месяцев наблюдается некоторое превышение нормы (4–12 тыс./мм³) содержания лейкоцитов у животных-трансплантатов (13,56 тыс./мм³) и тёлочек венгерской селекции (14,1 тыс./мм³).

К числу благоприятных факторов, способствующих формированию коров молочного типа, в мировой практике относят раннее наступление стельности у ремонтных тёлок. В зоотехнической литературе это явление получило широкое научное подтверждение. Многими учёными установлено главное преимущество ранних отёлов – повышение

пожизненной продуктивности коров.

Известно, что оптимальный возраст первого осеменения тёлочек зависит как от срока полового созревания, так и от общего развития организма, что обусловлено не только наследственными качествами (скороспелостью), но и внешними факторами. Возраст достижения хозяйственной зрелости играет большую роль в повышении генетического прогресса [41].

Раннее осеменение тёлочек молочных пород вошло в практику молочного скотоводства многих западных стран. При этом считается, что главную роль в выборе срока осеменения играет не возраст, а живая масса тёлочек, в оптимуме достигающая 75 % массы взрослых коров используемой породы.

Установлено, что интенсивно растущие ремонтные тёлочки, благодаря высокому уровню обмена веществ, обеспечивающему большие среднесуточные приросты, раньше достигают живой массы, требуемой для осеменения, и раньше оплодотворяются. Ранняя стельность вызывает физиологическое напряжение организма, повышает обмен веществ и эффективность процессов ассимиляции, совершенствует механизмы адаптации, стимулирует развитие органов размножения и молочности. Именно этим объясняется тот факт, что при одинаковых условиях нетели растут быстрее одновозрастных тёлочек [91].

Согласно многочисленным литературным данным голштинская порода считается одной из самых скороспелых молочных пород мира, стойко передающей это ценное качество при скрещивании с другими породами [244]. Известно, что оптимальный возраст первого осеменения для функции размножения коров с экономической и биологической точек зрения составляет 15–16 месяцев.

В таблице 143 представлены данные о возрасте, живой массе и индексе осеменения подопытных тёлочек при их первом осеменении.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что тёлочки всех опытных групп не превышали технологический норматив наступления хозяйственной зрелости. Тёлочки второй, третьей и четвертой опытных групп превосходили по живой массе при

первом осеменении своих сверстниц из контрольной группы. Однако, наиболее существенные различия по этому показателю имели животные венгерской селекции (IV группа), средняя живая масса которых в этом возрасте составила 396,2 кг, ($P \leq 0,005$). Наиболее скороспелыми оказались тёлки канадской (III группа) и венгерской (IV группа) селекций, которые достигли физиологической зрелости и были плодотворно осеменены соответственно: на 2,5 и 2,7 месяцев раньше, чем сверстницы контрольной группы ($P \leq 0,001$). Более позднеспелыми были тёлки белорусской селекции, у которых сроки формирования физиологической зрелости наступили на 1,9 месяцев позже, чем у сверстниц второй группы ($P \leq 0,001$). Полученные нами данные о скороспелости помесных тёлочек согласуются с исследованиями других авторов [111].

Таблица 143 – Воспроизводительная способность подопытных тёлочек

Группы	Плодотворное осеменение			
	Возраст, мес	Живая масса, кг	Индекс осеменения	Оплодотв-сть от первого осеменения, %
I – контрольная	17,7±0,21	389,7±6,17	1,1±0,10	90
II – опытная	15,8±0,20***	383,5±2,99	1,2±0,13	80
III – опытная	15,2±0,13***	390,0±3,70	1,6±0,27	60
IV – опытная	15,0±0,20***	396,2±4,36*	1,3±0,15	70

Величина индекса осеменения, характеризующего воспроизводительную способность, у животных подопытных групп находилась в пределах допустимых норм. Наибольшей величиной индекса осеменения (1,6) характеризовались тёлки, полученные методом трансплантации, что на 0,5, 0,4 и 0,3 ед. выше, чем у животных I, II и IV групп. Более высокие результаты по оплодотворяемости были получены при осеменении тёлочек белорусской чёрно-пёстрой породы, а также помесей. Так, после первого осеменения оказались стельными только 60 % тёлочек-трансплантатов и 70 % тёлочек венгерской

селекции, в то время как у животных, полученных от осеменения спермой быков-производителей канадской селекции и быков белорусской селекции, общая оплодотворяемость после первого осеменения составила 80 и 90 %, соответственно.

Таким образом, интенсивное выращивание ремонтных тёлочек голштинской породы импортной селекции позволяет их осеменять в возрасте 15–15,2 месяцев, что раньше сверстниц белорусской чёрно-пёстрой породы на 2,5–2,7 месяцев ($P \leq 0,001$). Это дает возможность раньше использовать их для селекции и производства молока, а также сократить затраты на их выращивание.

Молочная продуктивность коров обусловлена многими генетическими и паратипическими факторами и кроме всего прочего тесно связана с воспроизводительными способностями животных. Так, с одной стороны, полная реализация воспроизводительных функций коров – это основа и гарантия количественного и качественного обновления и роста стада. С другой стороны, у животных с высокой молочной продуктивностью значительно удлиняется период нормализации циклической деятельности яичников после отёла, снижаются показатели оплодотворяемости, отмечается более продолжительный межотельный и сервис-период, которые в конечном итоге обуславливают и выход телят, и молочную продуктивность коров [80].

Известно, что воспроизводительная функция коров формируется в результате реализации генотипа под влиянием конкретных условий окружающей среды. Воспроизводительные качества коров, наряду с молочной продуктивностью, скоростью молокоотдачи, живой массой, определяют эффективность использования животных. Нарушения воспроизводительной функции связаны как с наследственными факторами, так и с влиянием условий кормления и содержания коров [68].

О тесной взаимосвязи молочной продуктивности и воспроизводительных способностей коров свидетельствуют результаты исследований ряда авторов. Так, одни авторы отмечают, что рост молочной продуктивности коров

сопровождается снижением их воспроизводительной способности [18]. Исследования Н. Д. Родиной [80] показывают, что у чистопородных чёрно-пёстрых коров продолжительность сервис-периода была близкой к норме, у полукровных по голштинской породе – несколько удлинённой, а у 3/4 и 7/8-кровных помесей она значительно увеличилась и достигла 130–150 дней. По данным других авторов, наиболее высокая продолжительность сервис-периода (135 дней) наблюдалась у коров-первотёлок с кровностью до 50 % по голштинской породе [67].

Эффективность использования животных определяется не только уровнем реализации потенциала их продуктивных и воспроизводительных качеств, но и характером их взаимосвязи. Результаты таких исследований достаточно неоднозначны, что послужило поводом изучения и сравнительной оценки особенностей проявления продуктивных и воспроизводительных качеств у коров разных генотипов, полученных путём использования различных биотехнологических методов.

Анализ молочной продуктивности подопытных животных показал, что наиболее высокий удой за первую лактацию имеют чистопородные голштинские коровы – трансплантаты канадской и животные венгерской селекции (таблица 144). Так, коровы-первотёлки импортной селекции (III и IV групп) достоверно ($P \leq 0,001$) превосходили чёрно-пёстрых ровесниц отечественной селекции (I группы) и помесных (II группы) на 2475–3194 кг (или 45,1–58,1 %) и 1 999–2 718 кг (или 33,5–45,5 %) молока, соответственно. По второй лактации разница в исследуемых группах животных по данному признаку оказалась так же высокой и составила 3 134–3 227 кг (или 52,8–54,4 %) и 2 019–2 112 кг (или 28,6–30 %), соответственно. По половозрастным коровам наблюдалась та же закономерность.

Превосходство коров-трансплантантов канадской селекции над белорусскими чистопородными и канадскими помесями возросло и составило 3 475 кг (55,1 %) и 2 118 кг (27,6 %) соответственно. Преимущество венгерских сверстниц

достигло 3 036 кг (48,1 %) и 1 679 кг (21,9 %) молока.

Таблица 144 – Молочная продуктивность коров

Показатели	Лактация	Группы животных			
		I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
Удой, кг	I	5495±118,4	5971±115,2*	7970±172,2***	8689±201,2***
	II	5932±146,4	7048±290,7**	9066±258,6***	9160±199,2***
	III	6309±182,7	7666±267,0***	9784±312,8***	9345±234,4***
Жир, %	I	3,86±0,05	3,87±0,06	3,81±0,05	4,11±0,05***
	II	3,85±0,05	3,79±0,08	3,79±0,05	4,25±0,08***
	III	3,88±0,08	4,17±0,06	4,03±0,04	4,07±0,05
Белок, %	I	3,26±0,04	3,16±0,04	3,24±0,02	3,19±0,05
	II	3,23±0,06	3,19±0,04	3,32±0,02*	3,29±0,07
	III	3,21±0,03	3,31±0,03*	3,25±0,02	3,28±0,05
Молочный жир, кг	I	211,8±4,6	231,5±7,1*	305,0±7,8***	366,4±8,4***
	II	230,2±6,4	270,5±13,2*	342,0±9,9***	384,5±8,1***
	III	244,2±7,3	320,1±12,9***	394,0±13,2***	377,6±9,8***
Молочный, белок, кг	I	179,0±3,9	188,8±4,7***	258,0±5,9***	277,8±7,5***
	II	191,0±3,7	225,2±10,3**	300,2±8,0***	300,0±5,4***
	III	202,6±6,6	258,5±10,9***	317,6±9,9***	306,4±8,5***

У помесных животных удои также были выше, чем в контроле, однако они оказались ниже, чем у коров голштинской породы III и IV опытных групп. Данные, представленные в таблице 154, показывают, что скрещивание коров чёрно-пёстрой породы отечественной селекции с голштинскими быками канадской селекции позволило увеличить молочную продуктивность помесей по сравнению с чистопородными животными. В частности, по первой лактации эта разница составляет 476 кг или 8,7 %, по второй лактации – 1116 кг или 18,8 %, по третьей лактации – 1357 кг или 21,5 %. Во всех случаях разница статистически достоверная ($P \leq 0,05$ – $P \leq 0,001$).

В то же время более высокая возрастная динамика молочной продуктивности отмечена у помесных животных второй опытной группы. Их удой с I по III лактацию увеличился на 1695 кг (28,4 %), в то время как у коров, полученных методом трансплантации эмбрионов голштинской породы канадской селекции – на 1814 кг (22,8 %). У коров венгерской селекции (IV группа) этот показатель составил 656 кг (7,5 %), а у животных контрольной группы за данный период удой увеличился на 814 кг или 14,8 %.

Суммарная продуктивность (удой за три лактации) животных IV опытной группы составила 27 193 кг молока, что больше, чем у сверстниц белорусской черно-пестрой породы (I контрольная) и помесных животных (II опытная группа), соответственно, на 9 457 кг (или 53 %) и 6 508 кг (или 31,5 %). Разница по удою между коровами венгерской селекции и коровами, полученными от пересадки эмбрионов крупного рогатого скота канадской селекции, оказалась незначительной и составила 374 кг (или 1,4 %).

Характеризуя качественные показатели молока, следует отметить, что динамика жирномолочности у коров I и IV групп с возрастом незначительная, а у коров II и III групп – положительная (0,3 и 0,22 п. п., соответственно). Аналогичная тенденция отмечена по содержанию белка.

Коровы III и IV опытных групп достоверно превосходили животных контрольной группы по выходу молочного жира: по 1 лактации на 93,2–155,2 кг (44–73 %) при $P \leq 0,001$, по 2 лактации на 111,8–154,3 кг (48,6–67 %) при $P \leq 0,001$, по 3 лактации на 133,4–150 кг (54,6–61,4 %) при $P \leq 0,001$. Разница по количеству молочного жира между животными белорусской селекции и помесными коровами за 3 лактацию оказалась также достоверной и составила 76 кг или 31 % ($P < 0,001$). Чистопородные голштинские сверстницы (III и IV группы) также имели значительное преимущество по данному признаку при сравнении с помесными по всем трём лактациям.

По количеству молочного белка коровы белорусской чёрно-пёстрой породы по всем лактациям уступали помесным

сверстницам на 5,5–27,6 % ($P \leq 0,001$), коровам-трансплантатам – на 44,2–57,2 % ($P \leq 0,001$), животным, полученным от нетелей голштинской породы, завезённых из Венгрии – на 51,3–57,1 % ($P \leq 0,001$).

Подобная тенденция повышения удоев и жирномолочности у коров с повышением их кровности по голштинской породе прослеживается и в исследованиях других авторов [99].

Уровень молочной продуктивности коров характеризует их производственную и частично племенную ценность, но не отражает возможность отбора животных по конкретному признаку. С этой целью пользуются коэффициентами изменчивости и наследуемости, которые являются основополагающими параметрами популяционной генетики и широко используются при составлении программ и планов селекционной работы по совершенствованию продуктивных и племенных качеств крупного рогатого скота. Популяционно-генетические параметры одноименных признаков зависят от условий кормления и содержания животных, метода разведения, достигнутого уровня продуктивности и других факторов. В связи с этим нами была изучена изменчивость признаков молочной продуктивности подопытных коров, которая характеризуется данными, представленными в таблице 145.

Известно, что фенотипическая изменчивость удоя выше, чем содержание жира и белка, которое в большей степени обусловлено генотипом животного, и в меньшей степени влиянием паратипических факторов. Межгрупповые и межлактационные различия фенотипической изменчивости этих признаков имели сходное значение и составили по содержанию жира в молоке в среднем 3,9 % (max 8,1 % и min 4,2 %), а белка – 6,2 % (max 8,8 % и min 2,2 %).

Наиболее полно молочную продуктивность коров отражают выход молочного жира и белка, включающие в себя уровень удоя, содержание жира и белка в молоке. По этим признакам помесные животные второй группы характеризуются повышенной изменчивостью как по количеству молочного жира,

так и по количеству молочного белка. По второй лактации коэффициент изменчивости количества молочного жира у них составил 18,9 %, тогда как у сверстниц из других групп 8,2–11,3 %, по третьей – 15,7 % и 10,1–13,1 % соответственно. Сходная закономерность выявлена и по коэффициенту изменчивости количества молочного белка, который у помесных коров по второй лактации составил 17,8 %, у сверстниц из других групп – 7,0–10,9 %, по третьей – 16,4 % и 10,7–12,6 %, соответственно.

Таблица 145 – Изменчивость признаков молочной продуктивности коров

Признаки	Лактация	Группы животных			
		I – контрольная	II – опытная	III – опытная	IV – опытная
Удой, кг	I	8,4	7,5	8,4	9,0
	II	9,6	16,0	11,0	8,4
	III	11,2	13,5	12,4	9,7
Жир, %	I	4,8	6,2	5,0	4,6
	II	4,9	8,1	4,6	7,0
	III	8,0	5,8	4,2	4,5
Белок, %	I	4,8	4,4	2,3	5,5
	II	6,7	4,5	2,2	8,4
	III	3,1	3,4	2,5	5,5
Молочный жир, кг	I	8,5	12,0	10,0	8,9
	II	10,8	18,9	11,3	8,2
	III	11,6	15,7	13,1	10,1
Молочный белок, кг	I	8,5	9,8	8,9	10,5
	II	7,6	17,8	10,3	7,0
	III	12,6	16,4	12,1	10,7

Повышенная изменчивость признаков молочной продуктивности помесных коров свидетельствует о том, что скрещивание животных белорусской чёрно-пёстрой породы с быками голштинской ведёт к получению животных различного качества. В силу своей неоднородности эта категория животных требует повышенного внимания, тщательного изучения

селекционируемых признаков и большего селекционного давления при организации племенного отбора. Это положение согласуется с выводами других авторов [68].

Наименьшая степень изменчивости признаков молочной продуктивности выявлена у коров белорусской чёрно-пёстрой породы и животных венгерской селекции, что может быть обусловлено повышением у них уровня гомозиготности по продуктивным признакам.

Сходные результаты по изменчивости удоя, содержания жира и белка в молоке у коров чёрно-пёстрой породы были получены и другими исследователями [73]. Однако эти данные являются результатом исследований продуктивности коров лишь по наивысшей лактации.

При изучении воспроизводительных качеств животных были отмечены некоторые межпородные различия (таблица 146).

Как показывает анализ приведенных в таблице данных, в среднем по трём отёлам индекс осеменения составил: по чистопородным чёрно-пёстрым коровам белорусской селекции – 2,3; по помесным животным второй группы – 2,5; по коровам голштинской породы, полученным методом трансплантации эмбрионов – 2,7; по коровам венгерской селекции – 2,6. Несмотря на то, что в контрольной группе индекс осеменений самый низкий, его значение также превышает оптимальные параметры.

Установлено, что по всем трём лактациям наиболее удлинённый сервис-период наблюдался у чистопородных голштинских коров III и IV групп, у которых продолжительность сервис-периода по первой лактации была на 10,1–13,2 дня длиннее, чем у сверстниц контрольной группы. При этом указанная разница с возрастом достоверно увеличивалась и составила по третьей лактации 38,5–35,7 дня ($P \leq 0,05$). У коров всех опытных групп с повышением удоев от первой к третьей лактации сервис-период увеличивался на 12,3–22,1 дня. Проявление данной тенденции подтверждается также исследованиями других авторов [67].

Таблица 146 – Воспроизводительные качества коров

Группы коров	1 лактация		2 лактация		3 лактация	
	Индекс осеменения	сервис-период, дней	Индекс осеменения	сервис-период, дней	Индекс осеменения	сервис-период, дней
I -к	2,1±0,18	114,3±12,01	2,5±0,17	113,7±8,25	2,3±0,16	108,1±9,41
II	2,3±0,21	113,0±13,03	2,4±0,21	114,1±10,38	2,7±0,21	125,3±8,31
III	2,5±0,24	124,5±10,81	2,7±0,21	134,2±9,72	3,1±0,17**	146,5±10,4*
IV	2,4±0,21	127,5±11,44	2,6±0,13	136,1±12,11	2,8±0,17	143,7±11,74*

Изучение корреляции между продолжительностью сервис-периода и удоем коров свидетельствует о том, что она положительная. Величина коэффициента корреляции находится в пределах от 0,24 (вторая группа) до 0,35 (четвёртая группа). Это значит, что с ростом удоев наблюдается некоторое увеличение продолжительности сервис-периода. Сходная тенденция прослеживается во всех странах с высокоразвитым молочным скотоводством.

Известно, что животные существуют за счёт внешней среды и подвергаются её влиянию. Чтобы выжить и существовать, организм должен приспособиться к условиям жизни. При этом надо иметь в виду, что различные генотипы на одно и то же изменение среды могут реагировать по-разному. Генотипы контролируют адаптационную систему, которая, в свою очередь, обеспечивает существование и воспроизведение генетической системы. Под адаптационной системой здесь понимается весь организм, который под влиянием внешней среды может изменить ответную реакцию гена, не изменяя самого гена.

Эффективность применения современных методов в селекции животных во многом определяется состоянием воспроизводства молочного скота в сельскохозяйственных

организациях. Однако на большинстве молочных ферм и комплексов продуктивность дойного стада ниже его генетического потенциала. По мнению исследователей, причиной этого является несоответствие между биологическими возможностями животных и технологическими условиями механизированного производства [3].

Использование современных доильных установок на молочной ферме должно сочетаться с перестройкой технологии производственных процессов, изменением организации труда на основе учёта физиологии животных, перегруппировкой стада с целью выделения животных, пригодных для машинного доения. Это предполагает наличие молочных пород, которые способны в условиях индустриального производства длительное время без ущерба для здоровья проявлять высокую молочную продуктивность. Наличие в стаде животных, обладающих неодинаковой приспособляемостью к условиям промышленной технологии производства молока и неодинаковыми продуктивными качествами с одинаковым генотипом, аргументировано указывает на актуальность изучения проблемы адаптации животных. Для формирования высокопродуктивного стада целесообразно отбирать животных с сильным типом высшей нервной деятельности, обеспечивающих сокращение потерь молочной продуктивности [44; 45].

Известно, что промышленная технология предусматривает несколько перегруппировок, перегонов животных. Однако чем чаще производятся перегруппировки и комплектование новых групп, тем сильнее и продолжительнее стрессовые реакции, тем более выражены их отрицательные последствия (снижение энергии роста, ухудшение оплаты корма, повышение заболеваемости и т. д.). Особенно сильно реагируют на перегруппировки высокопродуктивные животные [69].

Для оценки влияния перегруппировки стада на молочную продуктивность коров различного происхождения у животных подопытных групп оценивали среднесуточный удой молока у каждой коровы за 30 дней до перегруппировки и через 30 дней после перегруппировки.

В целом за 30 суток после перегруппировки среднесуточный удой у коров снизился: в I группе на 0,04 кг или 0,2 %, во II группе на 0,3 кг или 1,3 %, в III группе на 1,3 кг или 4,2 %, и в IV группе на 1,5 кг или 4,9 % ($P \leq 0,05$), соответственно.

Анализ динамики молоковыделения показал, что внутри каждой группы наблюдались животные, которые восстановили свою продуктивность на 5–6-й день после перегруппировки. Однако большинство животных во всех группах завершили процесс восстановления на 9–11-й день наблюдения. Большее количество коров, которые быстрее адаптировались к новым условиям, связанным с перегруппировкой, было отмечено во второй группе (помесные коровы).

Следует отметить, что среднесуточный удой коров, полученных разными биотехнологическими методами, отличается друг от друга. Наиболее высокие среднесуточные удои оказались у коров III группы – 32,4 и 31,1 до и после перегруппировки, соответственно. Однако в этой группе животных восстановление исходного удоя у большинства животных наблюдалось только на 13–15-й день. Самый низкий среднесуточный удой был в первой (контрольной) группе, однако на величину среднесуточного удоя коров белорусской селекции перегруппировка не повлияла.

Полученные данные дают основание предполагать, что удой коров, полученных разными биотехнологическими методами, зависит от генотипов, которые совмещают генетический потенциал продуктивности со способностью проявлять ее в условиях стресса.

В соответствии с Государственной программой устойчивого развития села на 2011–2015 годы одна из стратегических задач животноводческой отрасли заключалась в достижении к 2015 году производства 10,7 млн т молока.

Молочному скотоводству должен быть отдан приоритет в развитии и в ближайшей перспективе, что обусловливается многими обстоятельствами. Во-первых, производство молока, как один из важных видов деятельности, определяющий в

значительной степени продовольственную безопасность страны, является основой экономического благополучия большинства сельскохозяйственных организаций. Во-вторых, из молока вырабатывается большое количество разнообразных продуктов питания, без которых трудно обойтись всему населению. Это формирует постоянный и повышенный спрос на соответствующее продовольствие как внутри страны, так и за её пределами.

Постоянный рост себестоимости продукции, находящийся в зависимости от ежегодного удорожания приобретаемых материально-технических ресурсов и к тому же не всегда рационального их использования, неотрегулированности закупочных цен и иных финансово-экономических механизмов, не позволяют субъектам хозяйствования иметь требуемые накопления для самофинансирования отрасли, развития на основе расширенного воспроизводства. По данным А. Святогора, А. Горбатовского, В. Шварацкого [186], в 2004, 2005 и 2008 годах закупочные цены на молоко, реализуемое в госресурсы, обеспечили среднюю рентабельность его производства на уровне 17,0; 14,4; и 18,8 %, соответственно. В остальные годы этот показатель не превышал 5,4–10,9 %, а в 2000–2003 годах производство молока для хозяйств было убыточным.

Очевидно, что лишь при достижении высоких производственных показателей субъекты хозяйствования в состоянии обеспечить производство молока с нормативным уровнем рентабельности, позволяющим развивать отрасль на принципах самоокупаемости и самофинансирования. Согласно расчётам А. Святогора, А. Горбатовского, В. Шварацкого [86], для выполнения республиканской программы развития молочной отрасли на 2010–2015 годы, в частности увеличения объёмов производства продукции, необходимо ежегодно повышать продуктивность молочных коров минимум на 3,1% (147 кг).

В последние годы с целью выхода на высокие производственно-экономические показатели отрасль всё более

интенсифицируется, ориентируясь на использование инноваций, оптимальных решений по концентрации и специализации производства, окупаемости затрат. Интенсификация производства, увеличение численности поголовья животных и рациональное его использование служат решающей предпосылкой для обеспечения населения продуктами питания. Необходимо разработать такие формы и методы производства, которые гарантировали бы максимально возможный эффект при оптимальных затратах средств и труда. Одним из важнейших путей увеличения поголовья и повышения потенциала его продуктивности является использование метода трансплантации эмбрионов. В связи с указанным выше, проведен расчёт экономической эффективности использования современных биотехнологических методов при создании высокопродуктивного молочного стада. В целях объективности оценки экономической эффективности, все расчёты проводились в перерасчёте на цены и курс доллара конца 2011 года (8 590 руб. за 1 доллар США).

Установлено, что неодинаковая интенсивность роста тёлочек разных генотипов сказалась на сроках достижения физиологической зрелости и затратах на их выращивание до отёла. Так, наименьшее количество кормо-дней для выращивания до первого отёла затрачено у тёлочек, полученных от венгерских нетелей и тёлочек-трансплантантов (740 и 746 дней, соответственно). Однако с учётом затрат на закупку нетелей в Венгрии, стоимость одной тёлочки до первого отёла по этой группе животных была самой высокой и составила 32 893 390 руб., что дороже чем в первой группе на 27 870 996 руб. (в 6,5 раз), во второй – на 28 160 190 руб. (в 6,9 раз), и в третьей группе – на 24 368 790 (в 3,9 раз).

Значительно дешевле обошлось выращивание тёлочек, полученных путём трансплантации эмбрионов от канадских доноров реципиентам белорусской селекции. На выращивание одной тёлочки, полученной данным биотехнологическим методом, затрачено 8 524 600 рублей, что в 3,9 раза меньше, чем при получении от венгерских нетелей. Несмотря на несколько

старший возраст при первом осеменении тёлочек, полученных от коров, белорусской селекции, осеменённых спермой быков белорусской чёрно-пёстрой и голштинской породы, себестоимость выращивания их до отёла была значительно меньше, и составила, соответственно, 5 022 394 и 4 733 200 рублей в расчёте на одно животное.

Исходя из полученных данных (таблица 158), видно, что за первую лактацию наибольшее количество молока базисной жирности получено от коров-трансплантантов, и коров венгерской селекции (8 435 и 9 920 кг, соответственно), что на 2 543,2–4 028,1 кг (43,2–68,4 %) больше, чем от животных чёрно-пёстрой породы белорусской селекции.

Наибольшее количество продукции в денежном исчислении получено от животных венгерской селекции и составило в расчёте на одну корову 27,3 млн рублей, что на 11,1 млн руб. больше, чем от коров контрольной группы. Несмотря на самый высокий удой за первую лактацию коров венгерского происхождения, стоимость произведённого молока не компенсировала затраты на покупку нетелей из Венгрии и получение от них коров. С учётом затрат на выращивание тёлки и содержание коровы общие затраты при этом составили 40,1 млн рублей, что в 3,3 раза выше по сравнению с их величиной в контрольной группе. Таким образом, наиболее затратным оказалось использование такого биотехнологического метода, как покупка венгерских нетелей.

В то же время при одинаковых условиях кормления, содержания и ухода, производство молока от коров белорусской селекции, помесных животных и канадских коров-трансплантантов принесло прибыль, размер которой позволил окупить все затраты на проведение соответствующих биотехнологических методов, выращивание тёлочек и содержание коров-первотёлочек. Сопоставление полученных показателей (таблица 147) показывает, что больше дополнительного молока базисной жирности относительно контрольной группы в расчёте на одно животное получено от коров третьей и четвёртой групп (9 896 и 12 262 кг, соответственно).

Таблица 147 – Экономическая эффективность использования коров, полученных различными биотехнологическими методами

Показатели	Группы коров											
	I – контрольная			II – опытная			III – опытная			IV – опытная		
	за первую лактацию	за две лактации	за три лактации	за первую лактацию	за две лактации	за три лактации	за первую лактацию	за две лактации	за три лактации	за первую лактацию	за две лактации	за три лактации
Получено молока базисной жирности на 1 корову, кг	5 892	12 236	19 036	6 419	13 839	22 718	8 435	17 979	28 932	9920	20 733	31 298
Получено дополнительно молока базисной жирности, кг	-	-	-	527	1 603	3 682	2 543	5 743	9 896	4028	8 497	12 262
Стоимость 1 кг молока, руб.	2 756	2 756	2 756	2 756	2 756	2 756	2 756	2 756	2 756	2 756	2 756	2 756
Стоимость реализованной продукции, млн. руб.	16,2	33,7	52,5	17,7	38,1	62,6	23,2	49,6	79,7	27,3	57,1	86,3
Совокупные затраты на выращивание телки и содержание 1 коровы, млн. руб.	12,2	19,4	26,7	11,9	19,2	26,4	15,7	22,9	30,2	40,1	47,3	54,5
Прибыль на 1 корову, млн. руб.	4,0	14,3	25,8	5,8	18,9	36,2	7,5	26,7	49,5	- 12,8	9,8	31,8
Дополнительная прибыль, млн. руб.	-	-	-	1,8	4,6	10,4	3,5	12,4	23,7	-	-	6
Уровень рентабельности, %	32,7	73,4	96,8	48,1	99,1	137,5	47,7	116,0	163,9	-	20,8	58,3

Закономерность по величине среднего удою, сложившаяся по результатам первой лактации, сохранилась и во второй лактации. По количеству молока базисной жирности лидировали коровы венгерской селекции и их сверстницы, полученные методом трансплантации, средний удой которых по второй лактации составил, соответственно, 10 813 и 9 544 кг. Такая же тенденция наблюдалась и по удою, полученному за две первые лактации. В результате совокупные затраты на использование изучаемых биотехнологических методов, выращивание тёлки и содержание дойной коровы за две лактации окупались по всем группам. Учёт показателей молочной продуктивности за три первые лактации позволяет дать более объективную и достоверную экономическую оценку биотехнологических методов, использованных при получении подопытных животных. Несмотря на достаточно высокую сумму затрат на выращивание и содержание одной коровы в течение трёх лактаций, наиболее экономически эффективным является метод трансплантации эмбрионов, использование которого позволило получить самую высокую прибыль в расчёте на одну корову (49,5 млн руб.) и наиболее высокую рентабельность производства молока (163,9 %). Данные таблицы 3.26 позволяют сделать вывод, что использование этого метода позволяет получить наибольшую прибыль уже по результатам первой лактации и окупить затраты в более короткие сроки по сравнению с другими методами. Это связано с тем, что животные голштинской породы, полученные путём трансплантации, имели достаточно ранний возраст начала репродуктивного использования (15,2 мес.). Таким образом, проведённые исследования свидетельствуют, что наиболее эффективным являлось производство молока от коров, полученных методом трансплантации эмбрионов, импортированных из Канады.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алиев, А.А. Гонадотропные и половые стероидные гормоны у крупного рогатого скота в различные периоды воспроизводительного цикла и их рецепция в желтом теле. Автореферат дис. канд. биол. наук. - Боровск, 1992. - 24 с.
2. Антане, В.В., Николаев Н.В. Взаимосвязь между эндокринной функцией яичников и получением эмбрионов.// Тез. докл. конф. молодых ученых, ЛСХИ, - 1987. – С.271-272.
3. Антонова, В. Резервы повышения продуктивности коров и улучшения качества молока / В. Антонова // Молочное и мясное скотоводство. – 2004. – № 4. – С. 8–10.
4. Батанов, С. Взаимосвязь состава крови телят с интенсивностью их роста и развития / С. Батанов, Г. Берёзкина // Молочное и мясное скотоводство. – 2004. – № 7. – С. 41–42.
5. Байбеков, Ф.Р. Усовершенствование метода культивирования и оплодотворения ооцитов коров *in vitro* в различных культуральных системах / Автореф. дис. на соиск. учен. степени. канд. биол. наук, Дубровицы, 1992 – 24с.
6. Бич, А.И., Создание новых высокопродуктивных заводских типов черно-пестрого скота // Создание новых пород сельскохозяйственных животных: Сб. тр. / Всесоюз. акад. с.-х. наук им. В.И. Ленина. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 22-30.
7. Бриль, Э.Е. Гормоны и воспроизводство крупного рогатого скота. - Мн.: Ураджай, 1979. - 88 с.
8. Бугров, А.Д., Коркин В.А. Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота.// Тез. докл. – Тарту, Таллин: 1986. - С.7-8.
9. Будевич, И.И. Сравнительный анализ результатов суперовуляции и эмбриопродукции доноров при использовании различных гормональных препаратов.// Научные основы развития животноводства в Республике Беларусь: Сб. ст. - Минск, 1995. - Вып. 26. - С. 41-46.
10. Бушманов, В.И., Смылова Н.И. Уровень суперовуляции, качество и приживляемость эмбрионов у коров различных пород. // Биотехнологические приемы в технологии

трансплантации эмбрионов. Бюл. Научн. работ. – Дубровицы, 1991г. – вып. 104. – С.18-21.

11. Гордон, А. Контроль воспроизводства сельскохозяйственных животных. - М.: Агропромиздат, 1988. - 415 с.

12. Гормональный профиль у коров при суперовуляции/ Хилькевич С.Н., Тяпугин Е.А., Самоделкин А.Г., Шириев В.М. Докл. Рос. акад. с.-х. наук. - 1995. - № 3. - С. 38-39.

13. Васильева, Е. А. Клиническая биохимия сельскохозяйственных животных / Е. А. Васильева. – М. : Россельхозиздат, 1982. – 254 с.

14. Гормональные эффекты препаратов, применяемых для стимуляции половой охоты / Гладкова А.И., Натаров В.В., Безбородов Н.В., Горшков Г.И., Давиденко В.М., Катрошенко А.И. // Биол. Основы высокой продуктивности с.-х. жив.:Мат. Междунар. Конф. (3-7 сентября 1990г.). – Боровск, 1991. – Ч.3 – С.48-50.

15. Гормональный профиль коров и телок при разном состоянии репродуктивной функции/ Нежданов А.Г., Лободин А.С., Власов С.А., Соловьев Н.А.// Проблемы диагностики, терапии и профилактики незаразных болезней сельскохозяйственных животных в промышленном животноводстве: Тез. докл. Всес. научн. конф. - Воронеж, 1986 - Ч. II. - С. 39-40.

16. Гормонсинтезирующая способность желез внутренней секреции у коров-доноров при вызывании полиовуляции/ Челецкий М.М., Шаловило С.Г., Шаран Н.М., Кудла И.М., Сенкус Я.Т.// О мерах по повышению эффективности и улучшению организации более широкого использования биотехнологии в племенном животноводстве: Тез. докл. II Республ. научно-произв. конф. - Львов, 1989. - С.98-99.

17. Гормоны и воспроизводительная функция сельскохозяйственных животных: Обзорная информация/ Сергиенко А.И., Синагурский Д.И., Везденко О.С., Гелецкая А.Г. - М.: ВНИИТЭИагропром. - 1991 - 47 с.

18. Гриценко, С. Связь воспроизводительной способности с удоем коров / С. Гриценко // Молочное и мясное скотоводство. – 2007. – № 3. – С. 20–22.

19. Гузеватый О.Е., Кузьмина Т.И. Кратковременное хранение ооцитов вне организма // Разработка методов биоинженерии в животноводстве для совершенствования продуктивных и технологических качеств сельскохозяйственных животных. Материалы VI конф. молодых ученых. / Ленинград, 1987 – С. 29-31.

20. Гузеватый О. Е. Запліднення *in vitro* – один із способів відтворення стада. // Генетико-селекційні технологічні проблеми воспроизводства сельскохозяйственных животных. /Тезисы докладов научно-практической конференции./ Киев – 1994г. - С. 77.

21. Гуляева А.Я. Хозяйственно-полезные признаки помесей в зависимости от их генотипа. // Разведение, кормление, технология содержания и продуктивность жвачных животных в условиях Западной Сибири. – Омск, 1988. – С. 4-8.

22. Дашкевич, М. А. Особенности развития тёлочек различных генотипов по голштинской породе / М. А. Дашкевич, М. П. Гринь // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. / науч. ред. И.П. Шейко. – Жодино : РУП «БелНИИЖ», 2002. – Т. 37. – С. 14–19.

23. Дегай В. Эндокринные аспекты физиологии и патологии размножения крупного рогатого скота. – Владивосток, 1994. – 177с.

24. Динамика содержания белковых и стероидных гормонов в крови коров при нормальном половом цикле/ Шамаров А.В., Судаков Г.И., Бенеметский Ю.С., Афонин А.С.// Науч.-техн. бюл. ВАСХНИЛ СО, Сиб. н.-и. и проект.-технол. ин-т жив-ва. - 1990. - № 4. - С. 10-14.

25. Дьяконов Е.Ф. Содержание гонадотропных гормонов в сыворотке крови коров в течение полового цикла, после обработки СЖК и стимуляции. Автореф. дис. канд. биол. наук/ ВНИИРГЖ. - Пушкин, 1967- 23 с.

26. Ежова, Т. А. Экстерьер и молочная продуктивность / Т. А. Ежова // Генетический прогресс в повышении продуктивности сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. – Л. : ВНИИРГЖ, 1991. – С. 48–60.

27. Журавель Р.И. Цитогенетический анализ овоцитов крупного рогатого скота разного возраста *in vivo* и в процессе созревания *in vitro*. Автореф. дис. канд. биол. наук.-Пушкин, 1983. – 21 с.

28. Завадовский М.М. О взаимоотношениях органов в теле животного// Бюл. экспер. биол. и мед. - 1936. - Т.1, № 3. - С. 190-192

29. Завадовский М.М., Липгарт Т. Взаимопротиворечивое взаимодействие функции гипофиза и половых желез/ Бюл. эксп. биол. и мед. - 1939. - Т.7, № 6. - С. 533-540.

30. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. - Л.: Агропромиздат, 1989. - 255 с.

31. Игнатенко Л. В., Галиева Л. Д., Свиридов Б. Е. Использование кондиционных сред для культивирования ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота.//Актуальные проблемы биологии в животноводстве./ Тезисы докладов II международной конференции./ Боровск – 1995г. - С. 182.

32. Кауффольд П., Тамм Н., Шихов Н. Я. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота./ Москва Агропромиздат – 1990г. - С. 56.

33. Качанская В. В., Кузьмина Т. И. Модификация сред для оплодотворения ооцитов коров путем введения в них биологически активных веществ. / Бюллетень ВНИИРГЖ , выпуск 195. – 1987г. - С. 24 – 25.

34. Карпич А.Г. Хозяйственные и биологические особенности черно-пестрого скота различной кровности по голштинской породе: Автореф. дис. канд. с.-х. наук. – Пушкин, 1986. – 21с

35. Кесян А.З., Удовленникова Н.Н. Культивирование эмбрионов крупного рогатого скота вне организма до стадии бластоцисты с инактивированной и неинактивированной

сывороткой // Селекційно- біотехнологічні методи використання генетичного потенціалу сільськогосподарських творін. – Київ, 1994. – С. – 37.

36. К вопросу о критических периодах в развитии трансплантированных эмбрионов крупного рогатого скота. / Рябых В.П., Бахитов К.И., Логинов Л.Г., Столярова В.Н. // Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота. Тез. докл. – Жодио, 1989. – С. 47-49.

37. Кива М.С. Продуктивность коров, приносящих двойни и влияние на нее двойневых отелов // Научн. Тр. УСХА. – 1976. – вып. 157. – С. 113-115.

38. Кива М.С. Многоплодие коров, его параметры биологические особенности и хозяйственное значение // Пути увеличения производства и улучшения качества продукции земледелия и животноводства – Белая Церковь. – 1980. – С. 98-100.

39. Китаев Э.М., Никитин А.И. Закономерности фолликулогенеза в яичниках млекопитающих и человека// Проблемы репродукции. - 1995. - № 3. -С. 10-15.

40. Кочанов Н.Е., Василенко Т.Ф., Борисенков М.Ф. Эстральный цикл коровы. - Сыктывкар, 1994. - 60 с.

41. Коронец, И. Н. Воспроизводительные качества коров белорусской чёрно-пёстрой породы различной селекции / И. Н. Коронец, Л. А. Танана, З. И. Тараненко // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2008. – № 2. – С. 67–71.

42. Красовская О.В. Трансплантация яйца кролика в матку другого животного // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1936. – Т. 15. – № 2. – С. 326-329.

43. Кривохарченко А.С., Рябых В.П., Вильянович Л.И. К вопросу о роли сыворотки в средах для культивирования.// Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Тез. докл. - Боровск, 1995. – С. 189-190.

44. Кудрин, А. Г. Этологический отбор и молочная продуктивность коров / А. Г. Кудрин, С. А. Гаврилин // С.-х.

биология. Серия «Биология животных». – 2010. – № 4. – С. 78–81.

45. Кузнецов, А. С. Продуктивные и этологические показатели молочных коров при промышленной технологии / А. С. Кузнецов, Е. С. Приступа // Зоотехния. – 2011. – № 10. – С. 21–23.

46. Кузнецов В.Е., Елизарова И.Б., Романко В.Н. Получение метафазных пластинок при культивировании разделенных морул крупного рогатого скота: Тез. докл. – Харьков, 1988. – С.75.

47. Кузьмина Т.И. Влияние возраста доноров ооцитов на качество эмбрионов коров, полученных *in vitro*/ Доклады Россельхозакадемии, 1998. - №1. – С.35-36.

48. Лебедева И.Ю., Лебедев В.А., Кузьмина Т.И. Уровни пролактина и соматотропина у коров в жидкости антральных фолликулов яичников на разных стадиях развития / Конкурентоспособное производство продукции животноводства в Республике Беларусь. Сб. работ междунар. конф. - Жодино, 1998, - С.99-101.

49. Левин К.Л. Физиология, патология воспроизводства свиней. - М., Агропромиздат, 1990. - С. 114-115.

50. Леткевич Л.Л. Прогнозирование эффективности трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота: Автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. с.-х.- наук. – Жодино, 1993. – 24с.

51. Лея, Ю. Я. Оценка результатов клинических анализов крови и мочи / Ю. Я. Лея. – М : МЕДпресс, 2000. – 185 с.

52. Лобченко В. А. Состояние и перспективы развития биотехнологии в животноводстве./ Тез. докл. республ. научн. конф./ Харьков – 1988г. - С. 83.

53. Маас А.О. Уровень прогестерона и эстрадиола-17 ☐ при вызывании суперовуляции у коров// Селекционно-биотехнологические методы использования генетического потенциала с.-х. животных: Тез. докл. 1 Междунар. научной конференции молодых ученых и специалистов (16-17 февраля 1994г.) - Киев, 1994. - С. 49.

54. Мадисон В.Л., Сальников И.М., Тарасюк Н.И. Результаты криоконсервирования, дальней транспортировки и пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота. // Бюл. научн. работ, вып . 87. – Дубровицы, 1987. – С. 47-49.

55. Мазоло, В. Н. Продуктивные качества, рост и развитие молодняка крупного рогатого скота айрширской и чёрно-пёстрой породы / В. Н. Мазоло, А. А. Лазовский // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. / под ред. В. К. Пестиса. – Гродно : УО «Гродненский государственный аграрный университет», 2010. – Т. 1. – С. 98–105.

56. Маленко Г. П./ Получение ранних зародышей крупного рогатого скота при созревании и оплодотворении ооцитов вне организма.// Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных:/ Тез. докл. между. конф. - Боровск, 1980 г. - С. 127 – 128.

57. Медведев Г.Ф., Алемаеху Т. Взаимосвязь эндокринного статуса и оплодотворяемости коров// 8 Съезд Бел. физиол. о-ва им. И.П. Павлова: Тез. докл. - Минск, 1991. – С. 84.

58. Миненко Г.В., Пивовар О.К. Гормональный фон эстральной сыворотки крови коров после суперовуляции.// Селекционно-биотехно-логические методы использования генетического потенциала с.-х. животных: Тез. докл. I Междунар. научной конференции молодых ученых и специалистов (16-17 февраля 1994 г.) - Киев, 1994. - С.57.

59. Мишуковская Г.С. Уровень суперовуляции и качество эмбрионов в зависимости от типа гонадотропина.// Проблемы развития биотехнологии в животноводстве. - Дубровицы, 1990. - С 56-57.

60. Нейфельд В.Г. Динамика концентрации гормонов (ЛГ, эстрадиола и прогестерона) в сыворотке крови коров герефордской породы в период полового цикла: Тр. Всесоюзн. н.-и. инст. мясн. скот-ва. - Оренбург, 1982. - С. 87-90.

61. Нетеча В.И. Современная технология криоконсервирования эмбрионов // Трансплантация эмбрионов

сельскохозяйственных животных. / Сб. научн. тр. – М.: 1988. – С.81

62. Никитченко, И. Н. Адаптация, стрессы, и продуктивность сельскохозяйственных животных / И. Н. Никитченко, С. И. Плященко, А. С. Зеньков. – Минск, Ураджай, 1988. – 200 с.

63. Овчинников А.В. Результаты нехирургической трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота Трансплантация эмбрионов в молочном скотоводстве и овцеводстве. Дубровицы, 1985. – С. 25-28.

64. Пасицкий Н.Д., Шавкун В.Е., Лесев М.Н. Новые аспекты участия биологически активных веществ в регуляции метабоизма и продуктивности с.-х- животных. – Боровск, 1991. – С.101-102.

65. Пацевичюте В. Геналогия, продуктивность и качесвто молока черно-пестрого скота ФРГ. // Тр. Лит. Ветакадемии и Лит.НИИ ветеринарии. 1987. – 6 с.

66. Пелехатый Н., Савчук И., Синаженский Э. Продуктивные качества молока черно-пестрого скота разного происхождения. // Молочное и мясное скотоводство. – 1990. – № 3 – С. 30-31.

67. Петкевич, Н. Методы повышения воспроизводительной способности животных / Н. Петкевич // Молочное и мясное скотоводство. – 2006. – № 4. – С. 11–12.

68. Племенная работа и воспроизводство стада в молочном скотоводстве : моногр. / Н. В. Казаровец и [др.]. – Горки : БСХА, 2001. – 212 с.

69. Плященко, С. И. Воздействие стрессовых факторов на здоровье и продуктивность сельскохозяйственных животных / С. И. Плященко, В. Т. Сидоров. – Минск : Бел НИИНТИ, 1981. – 43 с.

70. Погодаев С.Ф., Гречко Ю.Ф. Удой коров разных типов голштинизированной черно-пестрой породы. // Зоотехния, 1992. – № 11-12. – С. 7-10.

71. Порівняння дозрівання та запліднення поза організмам у попередньо селекціонованих і не селекціонованих ооцит-

кумуляційних комплексів корів./ Гузеватий О.Е., Старостка В.В., Свідерська Е.А., Ясінський В.В.// Селекційно-біотехнологічні методи використання генетичного потенціалу сільськогосподарських тварин. - Київ, 1994. – С. 25.

72. Приживляемость свежеполученных и деконсервированных эмбрионов в зависимости от породных особенностей коров-доноров. Кыса И.С., Бабенков В.Ю., Бабенкова Л.В., Сивая Н.Н., Рошлау К. // Матеріали Міжнародної науково-виробничої конференції "Використання трансплантації ембріонів в селекції і відтворенні сільськогосподарських тварин." Київ, Асканія-Нова, 1997. – С. 38-39.

73. Применение популяционно-генетических параметров в селекции молочного скота / А. Делян [и др.] // Молочное и мясное скотоводство. – 2012. – № 1. – С. 17–18.

74. Прозора К.И., Таравский С.С., Соколова Г.А. Комплексная оценка животных различных генотипов по голштинской породе. // В кн.: Селекция молочного скота и промышленные технологии. – М.: Агропромиздат, 1992. – С. 55-59.

75. Прокофьев М.И. Роль гонадотропинов в формировании полового цикла и гормональные методы его регулирования у сельскохозяйственных животных: Автореф. дис. докт. биол. наук. - Харьков, 1979.

76. Прокофьев М.И., Бакулов А.С., Леднев П.И. Гормональный контроль сроков овуляции у коров. В кн.: Проблемы эндокринологии сельскохозяйственных животных и применение гормональных препаратов в животноводстве. - Л.: Пушкин, 1975, с. 19-20.

77. Прохоренко П.Н., Логинов Ж.Г. Голштино-фризская порода скота. – Л.: Агропромиздат, 1986. – 238 с.

78. Регуляция созревания яйцеклеток сельскохозяйственных животных./ Голубев А.К., Сироткин А.В., Кузьмина Т.И., Макарова З.Н.// Итоги науки и техники ВИНТИ животнов. и вет. - 1987. - №15. - С.22-50.

79. Решетникова Н.М., Рябых В.П., Кувшинова В.С. Взаимосвязь реакции суперовуляции у коров с гормональным уровнем.// Биология воспроизводства и биотехнологические методы разведения с.-х. животных. - М., 1989. - С. 25-28.

80. Родина, Н. Д. Воспроизводительная способность чистопородных чёрно-пёстрых и голштинизированных тёлочек / Н. Д. Родина // Зоотехния. – 2005. – № 4. – С. 27–29.

81. Розен В.Б. Основы эндокринологии. - М.: Высш. шк., 1984. - 336с.

82. Романенко, Л. В. Мониторинг выращивания племенных тёлочек чёрно-пёстрой породы голштинского происхождения в племенных хозяйствах / Л. В. Романенко, В. И. Волгин, З. Л. Федорова // Зоотехния. – 2011. – № 4. – С. 9–12.

83. Рябых В.П., Никитина В.М., Стрельников А.М. Динамика половых гормонов в крови телок-доноров и реципиентов в период, предшествующий извлечению и пересадке эмбрионов// Сб. н. тр. ВНИИЖЛП. - 1983. - Т. 27. - С. 22-34.

84. Самбуров, Н. Особенности роста и развития помесных и чёрно-пёстрых тёлочек // Молочное и мясное скотоводство. – 2000. – № 4. – С. 30–31.

85. Самоделкин А.Г., Гавриков А.М., Сергеев Н.С. / Трансплантация эмбрионов в мясном скотоводстве. – М.: АОЗТ "Зоосалон", 1996. – С. 15-18.

86. Святогор, А. Резервы эффективности молочной отрасли / А. Святогор, А. Горбатовский, В. Шварацкий // Аграрная экономика. – 2010. – № 9. – С. 34–40.

87. Сельцов, В. И. Экстерьерная оценка в системе разведения молочно-мясных пород / В. И. Сельцов // Зоотехния. – 2006. – № 1. – С. 20–23.

88. Сергеев Н.И., Мадисон В.Л. Использование метода трансплантации в животноводстве.// Междунар. с.-х. журнал. - 1985. - № 6. - С. 14-15.

89. Сергеев Н.И. Получение двоен путем трансплантации эмбрионов осеменённым коровам-реципиентам // Докл. ВАСХНИЛ. 1986. – № 4. – С. 26-28.

90. Сергеев Н.И., Амарбаев А. – В.М. Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота. – Алма-Ата, Кайнар, 1987. – 158 с.
91. Сергеев, И. И. Целесообразность раннего оплодотворения тёлочек / И. И. Сергеев // Зоотехния. – 2005. – № 4. – С. 25–27.
92. Сироткин А.В., Мамлеев Р.С. Влияние сиптидных гормонов на созревание ооцитов коров *in vitro*.// Трансплантация и культивирование эмбрионов крупного рогатого скота: Сб. научн. трудов, Ленинград, 1989. – С.75-78.
93. Сичаева В.А., Кузнецова И.В., Кузнецов А.В. Связывание экзогенной ДНК сперматозоидами.// Проблемы репродукции. – 1996. - №2. – С.18-20.
94. Смыслова Н.И. Результаты суперовуляции у коров-доноров в зависимости от исходного гормонального фона.// Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота. Тез. докл. – Тарту, 1986. – С. 13-14.
95. Смыслова Н.И., Бушманов В. Влияние некоторых факторов на жизнеспособность замороженно-оттаянных эмбрионов // Бюл. научн. работ. вып. 104. ВИЖ, 1988. – № 89. – С. 26-28.
96. Смыслова Н.И. Результаты трансплантации эмбрионов в практике скотоводства.// Проблемы развития биотехнологии в животноводстве. Тез. докл. Всес. науч.-техн. совещ. во Всесоюзном н.-и. инст. животноводства. - Дубровицы, 1990. - С. 65-67.
97. Сорокин В.И. Динамика гонадотропных и стероидных гормонов в периоды становления и реализации репродуктивной функции у чистопородных и помесных самок крупного рогатого скота: Автореф. дис. канд. биол. наук. -Ленинград, 1986. - 18 с.
98. Старостка В.В., Гузеватый О.Е. Влияние температуры среды для транспортировки яичников на мейоз и оплодотворение *in vitro* ооцит-кумулюсных комплексов коров./ Актуальные проблемы биологии в животноводстве: Тез. докл.. - Боровск, 1995. – С.222.

99. Степанов, Д. В. Молочная продуктивность голштинизированных чёрно-пёстрых коров разных генотипов / Д. В. Степанов, О. Б. Сеин, Н. Д. Родина // Вестник Орловского ГАУ. – 2007. – № 1. – С. 19–23

100. Тарадайник Т., Сироткин А. Факторы влияние на созревание ооцитов свиней вне организма. - Свиноводство, 1996. - №4. – С. 30-31.

101. Таранов, М. Т. Биохимия и продуктивность животных / М. Т. Таранов. – М.: Колос, 1976. – 240 с.

102. Тарасенко А.Г. Метаболизм пролактина в крови лактирующих животных.// Бюл. УкрНИИ физиол. и биох. с.-х. животных. - 1981. - Вып. 1(4). – С.38-39.

103. Тегене А. Оплодотворяемость коров и телок в зависимости от их гормонального статуса в период осеменения в естественный и синхронизированный половой цикл. Автореф. дис. канд. с.-х. наук. - Горки, 1993.

104. Троцинский Ю.В. Эффективность разведения черно-пестрого скота при использовании животных различных генотипов: Автореф. дис. канд. с.-х. наук. – Жодино, 1996. – 20 с.

105. Факторы, влияющие на созревание и оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота при дозревании *in vitro*./ Альм Х., Торнер Х., Гёктус М., Кауффольд П.// Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. Тезисы докладов международной конференции. - Боровск, 1990г. - С.139 - 140.

106. Фолликулярный синтез стероидов крупного рогатого скота *in vivo* и *in vitro* под действием гонадотропных гормональных препаратов./ Гетце М., Шнайдер Ф., Кауффольд П., Китциг М., Бледов Г., Герасимова Г.Г., Ковалев П.Ф.// Вестн. с.-х. науки. - 1991. - №8. - С. 90-96.

107. Характеристика экстерьера быкопроизводящих коров белорусской чёрно-пёстрой породы / И. Н. Коронец [и др.] // Проблемы повышения эффективности производства животноводческой продукции : тез. докл. Междунар. науч.-

практ. конф. (г. Жодино, 12–13 октября 2007 г.). – Жодино, 2007. – С. 81–83.

108. Шанова О.Н. Динамика концентрации эстрадиола-17

биологии и патологии сельскохозяйственных животных: Сб. тр. - М., 1982. - С. 23-26.

109. Шириев В.М., Лебедев В.Н., Хилькевич С.Н. Применение гипофизарных гонадотропинов для вызывания суперовуляции у коров-доноров. Тез. докл. – Дубровицы, 1990. – С.61-62.

110. Шацкий, А. Д. Влияние комплексного индекса типа (КИТ) на молочную продуктивность коров / А. Д. Шацкий, Е. Б. Чечко, А. А. Парфеевец // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. В 2 т. – Гродно : ГГАУ, 2009. – Т. 2. – С. 212–219.

111. Щербакова, Н. А. Сравнительная оценка роста, развития и скороспелости чёрно-пёстрых тёлочек разных генотипов / Н. А. Щербакова, В. А. Равенко // Наука – сельскохозяйственному производству и образованию : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 30-летию со дня основания ФГОУ ВПО «Смоленский сельскохозяйственный институт» (г. Смоленск, 14–15 декабря 2004 г.). – Смоленск : Смоленский сельскохозяйственный институт, 2004. – Том 1. Зоотехния, ветеринарная медицина. – С. 359–361.

112. Эндокринные и биохимические изменения крови коров-доноров при суперовуляции./ Леткевич Л.Л., Жук Н.Ф., Горбунов Ю.А., Голубец Л.В. // Научные основы развития животноводства в Республике Беларусь. Сб. статей. – Вып.26. – Минск, 1995, - С.36-40.

113. Эрнст Л.К., Сергеев Н.И. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных. Москва, ВО – Агропромиздат, 1989. – 302 с.

114. Якусевич А.М. Использование голштинской породы при совершенствовании черно-пестрого скота Белоруссии. //

□ В СЫВ

Проблемы интенсификации производства молока: Тез. науч.-произв. конф. – Мн., 1991. – Ч. 1. – С. 8-10.

115. Якусевич А.М., Гринь М.П., Бекиш Р.В. Молочная продуктивность голштинизированных коров. // Научные основы развития Животноводства в БССР. – Мн., 1988. – В. 18. – С. 114-120.

116. Abeydeera L., Funachashi H., Kim N. In vitro genetration of pig oocytes by commercially prepared frozen-thawed Boar spermatozoa in chemically semi-defined bicarbonate-free medium. - Theriogenology, 1996. – vol.45., - №1. – P.265.

117. Alcivar A.A., Maurer R.R., Anderson L.L. Endocrine changes in beef heifers superovulated with follicle-stimulating hormone (FSH-P) or human menopausal gonadotropin.// J. Anim. Sci. - 1992. - №70. - P. 224-231.

118. Aoyagi, Y.; Konishi, M.; Takedomi, Effect of lipid rich bovine serum albumin on direct transfer of frozenthawed bovine embryos. // Theriogenology, 1996, 45, 165-166.

119. Arlotto T. The effect of hormonal supplementation of steer serum during bovine oocyte maturation on subsequent in vitro embryo development.// Theriogenology, 1998 vol. 49, № 1, p – 305.

120. Azato M. Morphology of bovine oocytes collected from autral follicles and their developmental competence after in vitro fertilization.// Vet. Res. – 1996. - 44., №1 – P.45-46.

121. Aurah, T. Multiple binths in Norwegian cattle. Acta, Agric; Scand, 1974, 24, 207-210.

122. Barahao J., Salamone D. In vitro effects of different doses of FSH on oocytes maturation and embryo development.// Theriogenology 1995 - vol. 44, № 1 - P.164.

123. Beatty R.A. Sex determination in farm and laboratory animals: a review. // VetRec, 1972 – 90-243.

124. Bernard C., Valet J.P., Beland R. Prediction of bovine ovulation by a rapid radioimmunoassay for plasma LH// J. Reprod. Fertil. - 1983. - №68. - P. 425-430.

125. Bevers M.M., Dieleman S.J. Superovulation of cows with PMSG: variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of

preovulatory follicles.// Anim. Reprod. Sci. - 1987. - №15. - P. 37-52.

26. Bilton, R.J. Preservation of embryos of the large domestic species. // Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A. I., Madri, (1980), Vol. 2, 245-253.

127. Borland, R.M.; Biggers, J.D. and C.P. Lechene Kinetic aspects of rabbit blastocoele fluid accumulation: An application of electron probe microanalysis. // Dev. Biol., 1976. – 1-8.

128. Bimund L. Biochemical changes in bull spermatozoa during capacitation in vitro.// Theriogenology, 1992 vol. 37. - P 571-578.

129. Blodow G., Kanitz E., Kitzig M., Kanitz W., Duschinski U. Vergleichende Untersuchungen zur Steuerrung der Ovarfunktion beim Rind mit PMSG und FSH.// Reprod. Dom. Anim. - 1983. - №28. - P. 97-107.

130. Boediono A., Rajamahendran R., saha S. /Effect of the presence of a CL in the ovary on oocytes number cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle.// Theriogenology, 1995 - vol. 43, - № 1. - P. 169.

131. Boguest A., Wang W., Day B. Addition glutathione during porcine IVF increases subsequent blastocyst formation rates.// Theriogenology, 1998 - vol. 49, № 1 - P. 278.

132. Booman P. Sexing of bovine primilation embryos. // Advances in animal breeding. 1988. 119-123.

133. Boyd H., Reed H.C.B. Investigation into the incidence and causes of infertility in dairy cattle. – Br. Vet., 1961, I. 117, P. 18 – 35.

134. Bhattacharya, P., Prabhu, S.S. and Chatterjee. Twin and multiple Indian cattle. Z. Tierz. Zucht. Biol. 1956, – 66, – 301-305.

135. Brackett B., Zucke K., Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos.// Theriogenology, 1993. - vol.39, - P. 43-64.

136. Bungartz L., Lucas A., Rath D. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages.// Theriogenology, 1995 - vol. 43. - P. 667-675.

137. Cady, R.A. and Van Vleck, L.D. Factors affecting twinning and effects of twinning in Holstein dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 1978, 46, 950-956.

138. Cambell K., Recd W., Bunch T. The preseuce of integrating or integrin like molecules on the surface of bovine oocytes and their possible role as sperm receptors.// *Theriogenology*, 1998 - vol. 49, № 1, - P. 279.

139. Carolan C., Lonergan P., Monget P. Effect of follicul size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmatic maturation of bovine oocytes.// *Theriogenology*, 1995 - vol. 3. - № 12. - P. 439.

140. Chian R., Park C., Sirard M. Cumulus cells act as sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocutes.// *Theriogenology*, 1996. - P. 258.

141. Commercial aspects of oocytes retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problems cows./ Looney C., Linsey B., Gonseth C.,Jonson D.// *Theriogenology*, 1994 - vol. 42. - P. 67-72.

142. Cordoba M., Santa-Coloma T.,Beorlegni N. Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm.// *Biochim. And Mol. Biol.* – 1997. – vol.41. - №4. – P.725-733.

143. Dieleman S.J., Blankenstein D.M. Changes in oestrogen-synthesizing ability of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH.// *J. Reprod. Fertil.* - 1984. - №72. - P. 487-494.

144. Dieleman S.J., Blankenstein D.M. Progesterone-synthesizing ability of preovulatory follicles of cows relative to the peak of LH.// *J. Reprod. Fertil.* - 1985. - №75. - P. 609-615.

145. Diez, C.; Le Bourhis, D.; Heyman, Y. Effekt of partial lipid removal in vitro produced bovine zygotes on further development in vitro and on the freezing tolerance of blastocysts. // *Theriogenology*, 1996, 5, 166-167.

146. Diller, K.R. Te influence of controlled ice nucleation on regulating the thermal history duiring freezing. // *Cryobiology*, 1985, 22, 268-281.

147. Dobson H. Radioimmunoassay of FSH in the plasma of post partum dairy cows.// *J. Reprod. Fert.* -1978. - №52. - 45-49.

148. Dobson H., Hopkinson C.R.N. and Ward W.R. Progesterone, 17 β -oestradiol and LH in relation to ovulation in cow.// Vet. Rec. -1973. - №93. - P. 76.

149. Domeki I. Endocrinology of embryo donor cows.// Japanese Journal of Animal Reproduction. - 1991. - V.37. - №5. - P. 57-64.

150. Donaldson L.E., Bassett J.M. and Thorburn G.D. Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycle, pregnancy and lactation, and the effect of under-nutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentrations.// J. Endocrin. -1970. - №48. - P. 599-614.

151. Donnay J., Augucir P., Grisart B. Effect of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos.// Theriogenology, 1997 - vol. 47, № 8. - P. 137.

152. Effect of Hypotaaurine on development in vitro derived bovine embryos. / Guyader C., Ponehon S., heyman Y., Menezo Y., Renard P.// Theriogenology, 1998 - vol. 49, № 1 - P. 201.

153. Effect of oxygen Tension and β -mercaptoethanol on development of in vitro produced bovine embryos. / Caamano I., Pugh M., Rowson a., Youngs C.// Theriogenology, 1998 - vol. 49, - P. 196.

154. Energy requirement of bovine spermatozoa for in vitro capacitation. / Dalvit G., Miragaya M., Chaves M., Beconi M.// Theriogenology, 1995 - vol. 44. - P. 1051-1058.

155. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. / Grauder D., Lane M., Spiezer a., Batt P.// Biol. Reprod. - 1994. - vol. 50. - №2. - P. 390-400.

156. Farin C., Hasler J., Martus N. A comparison of Menezo's B2 and Tissue culture medium-199 for in production of bovine blastocysts.// Theriogenology, 1997 - vol. 47, № 1. - P.119-121.

157. Frim, J. and P. Mazur Interactions of cooling rate, warming rate, glycerol concentration, and dilute procedure on the viability of frozen-thawed human granulocytes. // Cryobiology, 1983, 20, 657-676.

158. Fukui Y., Ono H. Effect of sera, hormones and granylosa celss added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes./ J. Reprod. Fert. 1989. – № 86. – P. 501-506.
159. 276. Gandolfi F., Milanese E., Pocar P. Comparative analysis of calfs and cow oocytes during in vitro maturation.// Mol. Reprod. and Dev. – 1998. – V.49. - №2. – P. 168-175.
160. Gandolfi F., Pocar P., Luchiano A. Effect of EGF and JGF-1 during in vitro maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabotism.// Theriogenology, 1996 - vol. 45, № 1, - P. 277.
161. Gardner R.L. Edwards R.G. Control of the sex ratio at term in the rabbit by transferring sexed blastocests. Nature, Land. 1968 – 218 – 346-349.
162. Gerther O., Wiltbank M., Friche P. et al. Selection of the dominant follicle in cattl.//. Biol. Reprod. - 1996. - №55. - P. 1187-1194.
163. Gordon I. And Boland M.P. Towards cattle twins by egg transfer. World. Rev. Anim. Prod. 1978. 14(2), 9-23
164. Greve T. // Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturatio Nord Vet meg, 1983, 35. 1, 422-439
165. Greve T., Callesen H., Hyttel P. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow./ Nord.vet. med. - 1983. - №35. - P. 408-421.
166. Grodahl M., Hyttel P., Greve T. Acrosomal status in fresch and frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy.// Anat. Embryol. 1994. – vol. 190. – P. 195-200.
167. Guay P., Rieger D., Roberge S. Superovulatory and endocryne responses in holstein heifers treated with either prostaglandin F2□ cloprostenol or fenprostalene.// Theriogenology, 1988. - №29. - P. 1193-1199.
168. Hahn J. Die unblutige Eigewinnung beim Rind unter Berucksichrigung der Vorbereitung der Sprndertiere und der Entwicklung im Eileiter und Gebarmutter.// Deutsch. tierarztl. Wirt. sch. – 1978. – № 85. – S. 113-152.

169. Hasler, J.F.; Hurtgen, P.J.; Stokes, J.E. and Z.Q. Jin (1996) Influence of time of exposure to glycerol or ethylene glycol on the survival of frozen-thawed bovine IVF embryos. // *Theriogenology*, 1996, 45, 172-173.
170. Hawk H., Wall K. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes.// *Theriogenology*, 1994 - vol. 41. - P. 1585-1594.
171. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother.// *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* (1891) – №48. – P. 457-459.
172. Heape W. Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother.// *Proc. R. Soc. Lond. Sci* (1897). - № 62 – P. 178-183.
173. Hendy C.R., Bowman J.C. Twinning in cattle. *Anim. Breed. Abstract.*, 1970., 38., p. 22 – 37.
174. Henricks D.M., Dickey J.F. and Hill J.R. Plasma estrogen and progesterone levels in cows prior to and during estrus.// *Endocr.* - 1971. - №89. - P. 1350-1355.
175. Hillier S. Paracrine regulation of follicular E2 synthesis.// *Sem. Reprod. endocr.* - 1991. - №9. - P. 332-440.
176. Hunter R.H.F. Low incidence of fertilization in superovulated cows: a physiological explanation.// *Vet. Rec.* - 1988. - №123. - P. 443.
177. Hyttel P., Callesen H., Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle.// *J. Reprod. Fertil.* - 1986. - №76. - P. 645-656.
178. Hyttel P., Greve T., Callesen H. Is deviant fertilization a significant problem in superovulated cattle?// *IETS Embryo transfer newsletter.* - 1991. - №9. - P. 9-13.
179. Hyttel P., Greve T., Callesen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle.// *J. Reprod. Fertil.* - 1989. - №38. - P. 35-47.
180. Introduction of twinning in beef heifers bilateral embryo transfer. Anderson, G.B., Gurro P.T., Grost N. And Horton, M.B. *J. Anim. Sci.* 1978, 46, 449-452.

181. Influencia potencial do diametro dos foliculos sobre a maturacao in vitro de oocitos bovinos./ Carcia M. C., Franceschini P. H., Toniollo G. H., Silva L. R. // *Ars. Vet.* 1995. –11, №2 – c 132 – 135.

182. Ishida T., Sakai Y. Gryopreservation of bovine embryos in the medium with glycerol (1.4 M) a suerose // *Japan J. Anim. Reprod.* – 1989. – V.35 – № 3 – P. 125-129.

183. Jackowski, S.C. und S.P. Leibo Response of fertilized mouse ova to freezing and thawing as a function of permeation by glycerol. // *Cryobiology*, 1976, 13, 646 (Abstr.).

184. Janowitz, U. Und A. Görlach Durchbruch beim Auftauen von Embryonen. // *Tierzucht*, 1994, 46, 24-25.

185. Kasai, M.; NIWA, K. and A. Iritani Protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0°C. // *J. Reprod. Fertil.*, 1983, 68, 337-338.

186. Kato H., Seidel G. Effect ofEGF in bovine oocytes maturation and embryonic development.// *Theriogenology*, 1996 - vol. 45, № 1, - P. 276.

187. Kim K., Minami N., Jamada M. Functional role of cumulus cells during maturation in development of in vitro matured and fertilized bovin oocytes.// *Theriogenology*, 1996 - vol. 45, № 1, - P. 276.

188. 251. Kliewer R. Balanced breeding programs. – *Holstein – Friesian World*. – 1979. – V. 76. – N 14. – P. 172-173.

189. Kotongole C.B., Naftolin F. And Younglai E.V. Diurnal variations in ovarian steroids and luteinizing hormone in cows at oestrus.// *Steroids Lipids Res.* - 1973. - №4. - P. 1-5.

190. Kuzmina T., Torner H., Alm H. Effect of bovine prolactin (PRL) on oocyte maturation and early embryonic development in different culture systems.// *Theriogenology*, 1998 - vol. 1. - P. 334.

191. Kweon O., Osasa M. Factors affecting serum total cholesterol level of lactating Holstens cows.// *Vet. Sci.* - 1986. – v. 48. – P.481-486.

192. Kyssa I.S. A system of quality control of milk in the Brest Region of the Republic of Belarus. // *Cattle Identification and Milk in*

Central and Eastern European Countries. Warsaw, Poland. 23 august 1998. – P. 39-42.

193. Lange, H. Macht ein neuer TG-Verfahren den Embryotransfer attraktiver? // Vortrag; FET-d, Tagung (9./10. Juni) 1994, P. 18-20.

194. Lange H. Cryopreservation of bovine embryos and demi-embryos using ethyleng-glycol for direct transfer after thawing., Cryobiology, 1993. – V. 1. – P. 183-191.

195. Langendouct A., Auquier P., Donnay I. Acceleration of in vitro embryos development in the presence of fetal serum.// Theriogenology, 1996 - vol. 45, № 1, - P. 194.

196. Lee E., Fukui Y. Effect of various Growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro.// Theriogenology, 1995 - vol. 44, - № 1. - P 71 – 85.

197. Lehn-Jensen H., Rall W. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing // Theriogenology, – 1983. – V. 10. – № 2. – P. 263-277.

198. Leibo S.P. and P. Masur Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing.// In: J.C. Daniel, Jr. (Hrsg.)// Methods in mammalian reproduction. Akademik Press, New York - 1978 – P. 179-201.

199. Leibo S.P. Introductions to embryo freezing. In: Zeilmaker, G.H. (Hrsg.)// Frozen storage of laboratory animals.// Fischer Verlag. Stuttgart. - New York - 1981. – P.231-233.

200. Leibo, S.P.; McGrath, J.J. and E.G. Cravalho Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilised mouse ova as a function of cooling rate.// Cryobiology, 1978, 15, 257-271.

201. Leibo, S.P. Field trial of one-step frozen bovine embryos transferred non-surgically. // Theriogenology, 1983, 19, 139 (Abstr.).

202. Leibo, S.P. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos: An update. // Theriogenology, 1985, 23, 201.

203. Lieman P., Tulka Y. Pregnancy rate after synchronous and asynchronous transfer of frozen – thawed bovine embryos // Anim. Reprod. Sci. – 1986. – Vol. 11, – N. 3. – P. 181-186.

204. Lim J., Reggio B., Godke R. Culture of the bovine embryos in a dynamic culture system: effect of bovine oviduct epithelial cells on the development of 8-cell embryos to the blastocyst stage.// *Theriogenology* - 1996 - vol. 45 - № 1.- P.102-106
205. Lindsell C.E., Murphy B.D., Mapletoft R.J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle.// *Theriogenology* - 1986 - № 26 - P. 209-219.
206. Looney, C.R.; Broek, D.M.; Gue, C.S.; Funk, D.J. and D.C. Faber Field experiences with bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. // *Theriogenology*, 1996, 45, 170.
207. Lorenzo P., Illera M., Illera I. Role of EGF, Igf-1 sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes.// *Theriogenology* – 1995 - vol. 44, № 1. - P. 109-119.
208. Maijala K. And Syvarjavi J. On the possibility of developing multiparous cattle by selection. *Z. Tierarzuchtg Zuchr.* 94, 126 –150.
209. Marcos M, Spele A., Butine M. Influence of cumulus cell on in vitro maturation and fertilization of equine oocytes.// *Theriogenology* - 1996. - V. 45. - № 1. - P. 263.
210. Martino M., Roland J., Nakagawa A., Leibo S. The kinetics of chilling sensitivity of bovine oocytes cooled to non physiological temperatures.// *Theriogenology*. - 1995 - vol. 43 - № 1 - P. 272.
211. Massip, A.; Van der Zwalm, P.; Ectors, F.; Coster, R.D.; Ieteren, C.D. and C. Hanzen Deep freezing of cattle embryos in glass ampules or french straws. // *Theriogenology*, 1979, 12, 79-84.
212. Mazur P. Freezing and low-temperature storage of living cells. // In: Muhlbock, O. (Hrsg.) *Proceedings of the workshop on basic aspects of freeze preservation of mouse strains*. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1974.
213. Mazur P. Slow freezing injury in mammalian cells. In: Elliot, K., u. J. Whelan (Hrsg.): *The freezing of mammalian embryos*.

// Ciba. Fndn. Symp. No.52, Elsevier, Amsterdam, 1977, N. 52. – P. 311-315.

214. McNatty K. Relationship between plasma prolactin and the endocrine microenvironment of the developing human antral follicle.// Fertil. Steril. - 1979. - №32. - V 4. - P. 433-438.

215. McNeilly A.S. Prolactin and the control of gonadotrophin secretion in the female.// J. Reprod. Fertil. - 1980. - №58. - P. 537-549.

216. Mingoti G., Roza e Silva A., Goreia J. Sintese de esteroides pro celulos da granulose co-cultivadas com oocitos bovinos.// 10 Renn. anu. Soc. bras. transfer emorioes, 1995. - V.11 - № 2. – P.142-143.

217. Modifying factors of fertility after different oestrous treatments in beef cattle. In, control of Reproduction in the cow. Mauleon P., Chupin D., Pelot J. And Aguer D. European Economic Community Seminar. (Galway), 1978, 531-545.

218. Moor R.M., Kruip T.A.M., Green D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limit to superovulation?// Theriogenology. - 1984. - №21. - P. 103-116.

219. Moststs L. Hahn I. Experimental production of identical twin mice. Dtsch. Tierarztl. Woch., 1978, 85, 242-244.

220. Mulvehill P. And Sreenan J.M. Improvement of Fertility after different oestrous treatment with PMSG and progestagen. // Journal of Reproduction and Fertility. 1977., 50., 323-325.

221. Nagao Y., Sacki K., Nagai M. Effects embryo deusety okygen concentration and medium composition on in vitro development of bovine early embryos.// Theriogenology - 1998. - V. 43. - № 1. - P. 299.

222. Nakajima A., Suzuki H., Hirazumi S Preovulatory plasma progesterone and estradiol 17 β concentrations and superovulatory response in PMSG-treated donor cows.// Anim. Sci. and Technol. - 1992. – V.63, №7. – P. 704-707.

223. Nelson L., Saidel G. Elsdon, Superovulation of cows using follielle stimulating hormone and prostaglandin F2 α // Theriogenology.- 1979.- V.11. - № 1-P.104.

224. Niemann, H. Cryopreservation of bovine embryos in the field. // Embryo Transfer Newsletter, 1990, 8, 5-7.

225. Niemann, H.; Sacher, B. and F. Elsasser Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos.// Theriosenology. – 1985 - №23. – P.631-639.

226. Niemann H.; Smidt. Tiefgefrieren von Rindermbrionen. Methoden und Einflußfaktoren.// Landbauforsch. Volkenroole. - 1985. - Bd.35.- № 4. - P.205-211.

227. Non – surgical collection and transfer of bovine embryos. / Habn Y., Roselnis R., Romanowski W., Scheiden U. // Archives Andrologia. – 1980. –N. 5., – P. 106.

228. O'Doherty E., Wade M., Mill J. Effect of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development.// Theriogenology - 1997 - vol.47 - №8 - P. 331.

229. Olson S., Seidel G. Vitamin E improves development of bovine embryos produced in vitro.// Theriogenology - 1998. - vol. 43. - №1. - P. 289.

230. Osil Y.R. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. // Journal of reproduction and fertility. 1983. – Vol. 69. – N. 3. – P. 463-468.

231. Patridge R., Pullar D., Wrathall A. Consumption of amino acids by in vitro and in vivo derived bovine embryos.// Theriogenology - 1996. - V. 45. - № 1. - P. 181.

232. Peters A.R. Ergebnisse und Perspektiven des Embryotransfer beim Rind.// Tagungsber Akad. Landneutsehaftsueiss (DDR). - 1987. - №218. - P. 153-157.

233. Pinyopummiter T., Bavister B. Minimum energy substate requirements for early cleavage stages of bovine embryo development in vitro.// Theriogenology - 1998. - vol. 43. - №1. - P. 299.

234. Rall, W.F. and G.M. Fahy Vitrification: A new approach to embryo cryopreservation. // Theriogenology, 1985, 23, 220.

235. Rall W., Fahy G., Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification // Nature, 1985, P. 573-575.

236. Recovery and Transfer of embryos by non-surgical procedures in lactating dairy cattle. Brand A. Acerts M., Zaayer D., Oxendr W. Jn, Control of Reproduction in the cow. Galway, Screnan I. Ed. 1978. – P. 531-533.

237. Renard, J.P.; Heyman, Y.; Leymonie, P. and J.-P. PLAT Sucrose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. // Theriogenology, 1983, 19, 145.

238. Renard J.P., Ozil J.P. and Heyman Y. The use of embryo transfer in the field for increased calving in beef and dairy cattle. // Animal Reproduction Science 1979. – 2. 353-361.

239. Rocosou L.M. Embryo transfer in the sheep; The significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. I. Reprod Fert., 1966. 11. 207-212.

240. Rowson L.E.A., Lawson R.A.S., Moor R.M. Production of twine cattle by EGG transfer. // Journal of Reproduction and fertility. 1971. – vol.25. – N.2. p. 517-523.

241. Rowson L.E.N., Moor R.N., Lawson R.A.S. Fertility following egg transfer in the cow: a effect of method medium and Fertility. 1969. – Vol. 18. – P. 517-523.

242. Rutledge Y.Y. Twinning in cattle. – Journal of Anim Science., 1975., 40. – P. 803-815.

243. Savage N.C., Howell W., Mapletoft R.J. Superovulation in the cow using estradiol-17 β of GnRH in conjunction with FSH-P.// Theriogenology. - 1987. - №27. - P. 383-394.

244. Scanlon P.F. Studies in reproduction in the cow.// Ph. D. Thesis, N.U.I. - Dublin, 1969. - P. 114-117

245. Scalon P.T. Gordon I. and Sreeman J.M. Multiple Ovulations, Multiple Pregnancies and Multiple births in Irish cattle. // Journal departmant Agriculture. Irish Republic, 1974 – 70. – P. 45-61.

246. Solti L., Greve T., Kocfoed-Johnsen H. Plasma progesterone assays in superovulated cattle.// Acta Vet. Scand. - 1978. - V.19. - P. 299-309.

247. Soom A., Vauroose G., Cruif A. Glutathione addition during fertilization doubles embryo production but has no effect upon

embryo quality in cattle.// Theriogenology – 1998 – V.49 - №1 – P. 301.

248. Sreenan J.M. and Buhan D. Embryo survival development at various stages of gestation after bilateral egg transfer in the cow. // Journal of Reproduction and Fertility. 1976, 47 – 127-128.

249. Sreenan J.M. Embryo transfer for the induction of twinning in cattle. In, Embryo transfer in Farm Animals. K.I. Betteridge, Ed. Canada Dept. Agric. Monograph. 1977. – 76 p.

250. Sreenan J.M. Non – surgical embryotransfer in the cow. // Theriogenology 1978. 9 (1), 69-83.

251. Sreenan J.M. Increasing the calf crop: synchronisation and twin calving. // Irish Farmer Journal. 1979. – 31 (7), 46 –47

252. Stock A., Smith K. Studies to improve the in vitro development of bovine embryos considering that development competence of oocytes in creases with follicular maturation.// Reproduction in domestic animal 29th conference on Physiology and Pathology of Reproduction., Leipzig - 1996 – P.363.

253. Stout J. Milking shorthorn J. – 1982. – V. 62 – N. 4. – P. 30.

254. Sumatri C., Ooe M., Saha S., Boedino A. The influence of sperm-oocyte incubation time and breed of bull on in vitro embryo development in cattle.// Theriogenology - 1996 - vol. 45 - № 1. - P 269.

255. Suzuki T., Shimokira T., Fujiyama M. Transfer of bovine frozen embryos by one step straw method // Japan J. Anim. Reproduct., 1983. – V.29 – № 3. – P. 162-163.

256. Swanson L.V. and Hafs J.S. LH and prolactin in blood serum from estrus to ovulation in Holstein heifers.// J. Anim. Sci. - 1971. - №33. - P. 1038-1041

257. Swanson G.Y.T. The genetic improvement of dairy cattle in England and Wales Communications Y.N.Y.A. // Yist.nac. de investigacioner agrarias Ser.: Producton animal. – 1987. – N. 11. – P. 53-61.

258. Szell, A. and Shelton Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. // J. Reprod. Fertil 76, 401-408.

259. Taneja M., Kelly J., Rowe J. Influence of glutathione in presence of Heparin and caffeine on bovine in vitro fertilization.// Theriogenology - 1998. - vol. 49. - №1. - P. 298.

260. Testart Y. Godard, C. And du Mesnil du Buisson, Transvaginal transplantation of an extra egg to obtain twinning in cattle. // Theriogenology, 1975, 4, - 4. - 163.

261. Torner H., Kuzmina T., Lohre B. Effect of prolactin on in vitro maturation of bovine oocytes.// Reproduction in domestic animals 29th conference Physiology and pathology of Reproduction. - 1996. - P. 430.

262. Tornesi M., Salomone D., Archer J. In vitro maturation of bovine oocytes in serum-free medium.// Theriogenology - 1997. - vol. 43. - №1. - P.339.

263. Trounson A., Branol A., Ferts M., Nou-curgical transfer of deep-frozen bovine embryos // Theryogenology. - 1978. - V.10. - №1. - P. 111-115.

264. Uchockiene, D., Gedgaudas E. The Temperature in fluence for bulls sperm capatitation.// Animal Production for Welfare, - 1983. - V.2. - P.199-200.

265. Voelkel, S.A. and Y.X. Hu Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. // Theriogenology, 1992, 37, 23-35

266. Walton, J.S., Stubbings R.B. Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-Friesian cows.// Theriogenology. - 1986. - V. 26. - №2. - P. 167-177.

267. Weldt, D.E., Woody H.D, Duletow W.R. Induction of multiple ovulation in the cow with single injection of FSH and HCG. // Journal of reproduction and Fertility. 1975, 44, P. 583-586.

268. Whittingham, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature, 1971, 233, 126.

269. Whittingham, D.G.; Wood, M.; Farrant, J.; LEE, H. and J.A. HALSEY Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. // J.Reprod. Fertil, 1979, 56, 11-21.

270. Whittingham, D.G.; Sensitivity of mouse embryos to the rate of thawing. Zeilmaker G.H. (Hrsg.): The frozen storage of laboratory animals. // Fischer Verlag Stuttgart / New York. 1981 - P. 237-241.

271. Willadsen, S.M.; Polge, C.; and L.E.A. Rowson: The viability of deep frozen cow embryos. *J. Reprod. Fertil*, 1978, 52, 391-393.

272. Willadsen, S.M.; The viability of early cleavage stages containing half the normal of blastomeres on the sheep. // *J. Reprod. Fertil*, 1980, 59, 357-362.

273. Willet, E.L. Successful transplantation of a fertilised bovine ovum. // *Science*. – 1951. – Vol. 113. – P. 247.

274. Wilmut, I. and L. E.A. Rowson Experiments on low-temperature preservation of cows embryos. // *Vet. Rec.*, 1973, 92, 686-690.

275. Wilmut, J. Variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals.// *Theriogenology*. - 1985. - №23. - P. 107-119

276. Ymaschita, T., Sato T., Hoshi H. Bovine blastocyst formation from IVM/IVF produced zygotes in serum and serum-free medium.// *Theriogenology* - 1996. - vol. 45. - №1. - P.197.

Научное издание

Голубец Леонид Викторович
Дешко Александр Станиславович
Кысса Иван Степанович
Стецкевич Елена Казимировна

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
В РАЗВЕДЕНИИ И СЕЛЕКЦИИ
ПЛЕМЕННОГО СКОТА

Монография

Компьютерная верстка: А. С. Дешко

Подписано в печать 02.12.2019
Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Печать Riso. Усл. печ. л. 25,0. Уч.-изд. л. 21,70.
Тираж 100 экз. Заказ 5044



Издатель и полиграфическое исполнение:

Учреждение образования
«Гродненский государственный
аграрный университет»
Свидетельство о государственной
регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/304 от 22.04.2014.

Ул. Терешковой, 28, 230008, г. Гродно.

*Сверстано и отпечатано с материалов, представленных на электронных носителях.
За достоверность информации, а также ошибки и неточности, допущенные авторами,
редакция ответственности не несет.*

