

used to assess the similarity of the taxonomic composition of zoobenthos in different years of research. After combining archival and published data with the latest data (2000-2023), the number of taxa in Lake Alakol was 192, in Lake Sasykkol – 80, in Lake Koshkarkol – 60. According to the results of the comparative analysis, over the past ten years (2013-2023) there was a tendency towards an increase in the number of taxa of the benthic fauna of lake Sasyk-Kol compared to the first decade of the 21st century (2000-2012). However, in the lakes Alakol and Koshkar-Kol, a decrease in the species richness of zoobenthos was observed. Zoobenthos communities in the lake system were unique in terms of taxonomic composition, with low similarity. These changes in the taxonomic composition and number of benthic fauna taxa occurred due to the absence or presence in the community of temporary inhabitants of bottom communities that fly out of lakes when the next generation appears.

Keywords: Zoobenthos, Alakol, Sasykkol, Koshkarkol, Balkhash-Alakol basin, heterotopic organisms, benthic invertebrates, taxonomic composition, network analysis, similarity

МРНТИ 68.39.13

DOI <https://doi.org/10.37884/2-2025/04>

Д.М. Бекенов^{*1}, Б.А. Буралхиев¹, Г.Ф. Габит¹, Я. Мичинский²

¹НАО «Казахский Национальный аграрный исследовательский университет»,
г. Алматы, Республика Казахстан, ironlan-1983@inbox.ru*, buralkhiev@bk.ru,
gabitgulzat_07@mail.ru

²Варминско-Мазурский университет в Ольштыне, Республика Польша,
michinsk@uwm.edu.pl

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ СЕКСИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В МОЛОЧНОМ СКОТОВОДСТВЕ МЕТОДОМ «IN VITRO»

Аннотация

Одним из эффективных и экономически выгодных методов получения эмбрионов высокоценных племенных животных для последующей трансплантации реципиентам является получение эмбрионов «in vitro». Использование методики экстракорпорального оплодотворения яйцеклеток, объясняется в первую очередь низкими затратами, возможностью извлечения большого количества яйцеклеток без использования дорогостоящих гормональных препаратов и наименьшими затратами труда при его проведении при том, что яйцеклетки от самок можно получать круглый год и в течение всей жизни животного. Основанием является наличие в половых железах самок сотни тысяч половых клеток, представляющих огромный генетический резерв, который не используется из-за препятствий возникающий с вынашиванием детенышей.

Целью текущего исследования была оценка эффективности получения сексированных эмбрионов крупного рогатого скота молочного направления продуктивности методом «in vitro». За период экспериментальных работ было получено и пересажено 11 морфологически полноценных эмбрионов. Процент оплодотворяемости составил 36,3%. По полученным нами результатам, соотношение желаемого пола у полученных 4 голов телят-трансплантатов составила 25 против 75% или 1 бычок и 3 телочек.

Исследования осуществлялись в соответствии с методикой опытного дела принятой в биотехнологии с обработкой материалов с использованием пакета программ Microsoft Excel. Опыты и используемая методика проведения исследований на лабораторных животных соответствует требованиям биологической безопасности и этическим принципам экспериментирования на животных, изложенных в Европейской конвенции по защите

позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Старсбург, 1987 г.).

Ключевые слова: Эмбрионы сексированные, молочное скотоводство, трансплантация эмбрионов, экстракорпоральное оплодотворение, фолликул, гормон, эмбрион.

Введение

Получение высокопродуктивной коровы имеет решающее значение в повышении уровня рентабельности сельскохозяйственного сектора в целом, в особенности это ярко прослеживается на примере молочного скотоводства [1]. Успешное решение проблемы получения отечественных высокопродуктивных животных невозможно без использования высокопродуктивного маточного поголовья, у которых продуктивные качества значительно выше, чем среднестатистические. Использование такого исходного генетического материнского материала будет способствовать повышению качества получаемого ремонтного молодняка, а соответственно и значительному увеличению выхода продукции как в отдельно взятом хозяйстве, так и по Республике в целом. Однако данный процесс субъективно сдерживается физиологическими особенностями материнского организма - способного вынашивать одного или двух телят в течение одного года. Для решения данной проблемы рационально использовать потенциал высокопродуктивной коровы в течение жизни максимально, т.е. прижизненно использовать ее в качестве донора для получения многочисленных эмбрионов, последующее развитие (вынашивание), которых будет осуществляться в организме другого животного - реципиента с менее продуктивным потенциалом или же суррогатной матерью [2].

Использование методики экстракорпорального оплодотворения яйцеклеток, объясняется в первую очередь низкими затратами, возможностью извлечения большого количества яйцеклеток без использования дорогостоящих гормональных препаратов и наименьшими затратами труда при его проведении при том, что яйцеклетки от самок можно получать круглый год и в течение всей жизни животного. Основанием является наличие в половых железах самок сотни тысяч половых клеток, представляющих огромный генетический резерв, который не используется из-за препятствий возникающий с вынашиванием детенышей [3].

На данном этапе методику получения эмбрионов «in vitro» можно применять не только в ускоренном воспроизводстве ценных генотипов, но также она необходима для проведения научно-исследовательских работ по клеточной и генетической инженерии, связанные с большими успехами достигнутые в совершенствовании методов микроманипуляции эмбрионов (получения клонов, трансгенных животных и эмбриональных стволовых клеток). В развитии этого поставлена задача разработки методов культивирования и оплодотворения фолликулярных ооцитов крупного рогатого скота «in vitro», а также влияния методов крио консервации на эмбрионы оплодотворенных экстракорпорально [4].

Целью данного исследования является оценка эффективности получения сексированных эмбрионов крупного рогатого скота молочного направления продуктивности методом «in vitro».

На решение ставились следующие задачи:

- провести процедуру пункции и сбора фолликулярных ооцитов;
- установить процентное соотношение пригодных ооцитов для дальнейшего экстракорпорального оплодотворения;
- проведение культивирование в различных культуральных средах с добавлением аминокислот и белков, и установление степени созреваемости.

Перспективным методом повышения генетической роли самок на сегодняшнее время является метод экстракорпорального оплодотворения и культивирования ооцитов и эмбрионов «in vitro», позволяющий резко увеличить число их потомков. Эффективностью этого метода является и то, что от самок яйцеклетки можно получать круглый год и в течение всей жизни животного. Вопросы оптимизации процессов оплодотворения ооцитов «in vitro» и

развития эмбрионов в культуре имеют важное практическое значение в связи с возрастающим использованием метода экстракорпорального оплодотворения ооцитов. В теоретическом плане изучение этих вопросов необходимо для развития представлений о молекулярно-клеточных факторах, регулирующих репродуктивную функцию [5], а также для успешного осуществления биотехнологических программ по получению клонов и трансгенных животных [6].

В естественных условиях у самок сельскохозяйственных животных на 75-275 тыс. ооцитов реализуется максимум 5-7, так как репродуктивному потенциалу самок препятствует необходимость вынашивания детенышей. Это препятствие может быть устранено применением методов получения от одной самки большого числа ооцитов. Осуществить его можно путем пункции фолликулов при лапароскопии либо при забое животного непосредственно из яичников. Этот метод включает в себя выделение яйцеклеток из яичников, их дозревание в питательных средах и оплодотворение вне организма с последующей трансплантацией реципиентам [7, 8].

Новизна данного исследования заключается в том, что впервые в Казахстане будут установлены влияния различных культуральных сред на степень дозреваемости и оплодотворяемости фолликулярных ооцитов с последующей криоконсервацией и трансплантацией реципиентам.

Оптимизация технологии оплодотворения «in vitro» обеспечит в необходимом количестве наличие ранних эмбрионов для ускоренного воспроизводства ценных генотипов, а также в исследованиях в области клеточной и генной инженерии, в частности для пересадки ядер, генов и извлечении внутриклеточной массы, изучение модели процесса оплодотворения и ранних стадий эмбриогенеза

Методы и материалы

Наиболее эффективным способом получения эмбрионов крупного рогатого скота с определенным полом является экстракорпоральное оплодотворение фолликулярных ооцитов, извлеченных методом трансвагинальной пункцией однополым (сексированным) семенем и культивированием до стадии поздней морулы и бластоцисты с дальнейшей трансплантацией реципиентам или криоконсервацией в растворе глицерина. Процентное соотношение пола эмбриона будет напрямую зависеть от качества (*процентного соотношения пола гарантирующий производитель семени*) однополого семени [9]. При соблюдении всех требований оплодотворяемость и развитие фолликулярных ооцитов до стадии поздней морулы и бластоцисты составляет в среднем 20%, то есть от одного донора при использовании трансвагинальной пункции возможно получение через каждые 10 дней в среднем по 2 морфологически полноценных эмбриона [10].

В качестве доноров ооцитов отбирали коров с нормальными репродуктивными органами (диаметр яичников в среднем 3-5 см., без признаков образования кист с нормально развивающимися фолликулами). Пункция фолликулов яичников ооцитов выполняли трансвагинально под ультразвуковым контролем с помощью пункционных игл. При проведении этой процедуры применяется сакральная анестезия и перед извлечением ооцитов под ультразвуковым контролем подсчитывается количество фолликулов. Далее под ультразвуковым наблюдением через влагалище вводится игла для трансвагинальной пункции. Игла, направляемая с помощью ультразвука, вводится через стенку влагалища в яичники, где прокалываются и отсасывают с помощью вакуумного насоса фолликулярную жидкость, содержащие яйцеклетки в специальную 10-15 мл. пробирку с раствором для культивирования ооцитов при 36-37⁰С, при этом яичники фиксируются ректально. Полученные яйцеклетки попадают в пробирку. Далее полученный раствор переносится в лабораторию, где под микроскопом собирают яйцеклетки и оценивают по морфологическим критериям. Морфологически полноценные яйцеклетки используют для экстракорпорального оплодотворения. Таким образом получают 5-10 яйцеклеток. По окончании процесса забора фолликулов полученную пробирку с фолликулярной жидкостью переносят в бокс.

В среднем без применения гормональной обработки у донора возможно получение в среднем с двух яичников по 6-8 морфологически полноценных фолликулярных ооцитов. (Данную процедуру можно проводить через каждые 8-10 дней, то есть по мере созревания в яичниках фолликулов).

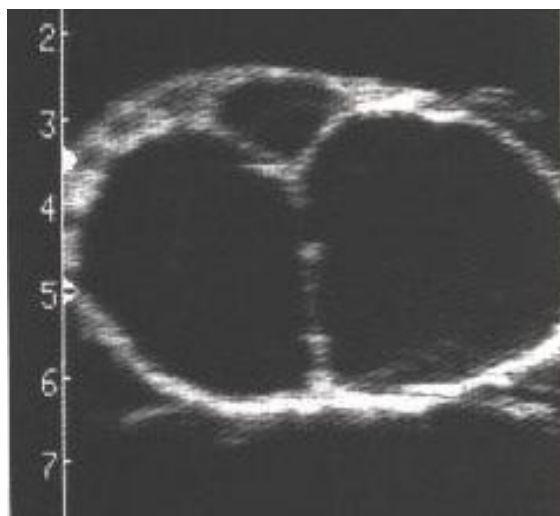


Рисунок 1. Яичник с 3-мя хорошо выраженными фолликулами

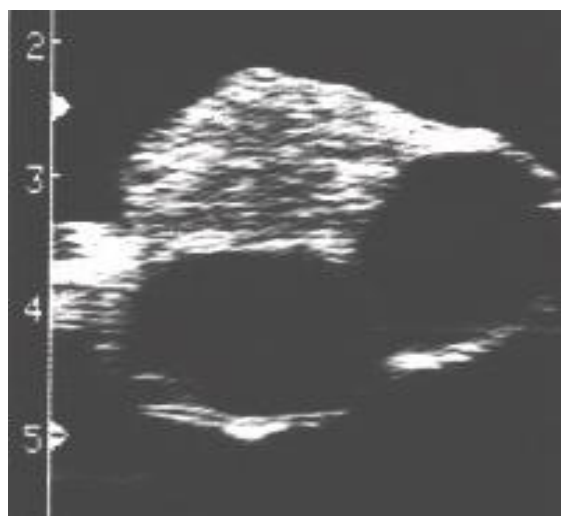


Рисунок 2. Яичник с 2-мя фолликулами и желтым телом (сверху)

Перед культивированием проводят быструю морфологическую оценку ооцитов, яйцеклетки с поврежденной зоной пеллюцида отбраковывают. Пригодными для исследований считаются яйцеклетки округлой формы с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные многослойными компактными фолликулярными клетками.

Культивирование ооцитов и эмбрионов проводят в инкубаторе с 5% CO₂ в воздухе при температуре 37±0,1°C и влажности 80-90%. Эти условия соблюдаются при использовании CO₂-инкубаторов, поддерживающих необходимую температуру, влажность и уровень CO₂ в камере который поддерживается посредством подачи углекислого газа из баллона, где он находится в сжиженном состоянии, и воздуха из окружающей среды. Влажность в камере CO₂-инкубаторов поддерживается постоянным испарением бидистиллированной воды со дна камеры из специального лотка. Уровень pH среды равняется 7,3-7,4 что соответствует pH крови, такая кислотность оптимальна для оплодотворения и предимплантационного развития ооцитов и эмбрионов.

Яйцеклетки культивируют и оплодотворяют в 1 мл. четырехлуночных чашках в 800 мкл. среды для культивирования яйцеклеток. Ооциты переносят в отдельные лунки четырехлуночной чашки из расчета 12-15 штук в одну лунку. Прокультивированные в течение 24 ч. в инкубаторе при температуре 37°C с 5% CO₂ ооциты пипетором переносят в чистую среду для культивирования яйцеклеток, заранее находившиеся в CO₂ инкубаторе в течение 12 ч. Перед инсеминацией ооцитов оценивают по морфологическим критериям. Яйцеклетки со сморщенной цитоплазмой, неправильной (овальной) формы или с поврежденной цитоплазмой выбраковывают. Ооциты с окруженной плотной массой фолликулярных клеток промывают в растворе гиалуронидазы. Методика, которой заключается в следующем: в чашку капают 15-20 мкл. раствора гиалуронидазы, а также раствор для культивирования ооцитов. Сначала пипетором отмывают ооциты в растворе гиалуронидазы до полного или частичного растворения фолликулярных клеток, а затем в среде для культивирования яйцеклеток, с целью очищения яйцеклеток от фермента и переносят в лунку с ооцитами для оплодотворения. В подготовленные таким образом ооциты переносят капацированную сперму в расчете 100 тыс. сперматозоидов на одну яйцеклетку (1-2 мкл. флотированной спермы). Как известно сперматозоиды млекопитающих перед естественным оплодотворением в половых путях самки проходят процесс дозревания (капацитация), и только после этого они способны проникнуть

и оплодотворить яйцеклетку. Процесс капацитации заключается в созревании, удалении протеина и других макромолекулярных субстанций в плазматической мембране сперматозоида, который в естественных условиях происходит в половом аппарате самки точнее в яйцепроводе. Поэтому при проведении работ по *экстракорпоральному оплодотворению* ооцитов необходимо проводить центрифугирование и флотацию сперматозоидов методика, которая заключается в следующем: замороженную соломинку со спермой производителя для оттаивания помещают в водяную баню при температуре 37°C на 12-15 сек. Размороженную таким образом сперму сливают в 15 мл. пробирку и заливают сверху 199 среды до отметки 6 мл. и центрифугируют в течение 10 минут при 3000 об/мин. После центрифугирования с пробирки выливают надосадочную жидкость и вливают 1 мл. среды используемую для культивирования ооцитов и ставят в инкубатор при температуре 37°C на 30-40 мин. По истечении времени культивирования наиболее подвижные сперматозоиды находятся в надосадочной жидкости, которую и применяют для оплодотворения яйцеклеток. Перед оплодотворением сперму оценивают под микроскопом на качество по 10 бальной шкале и направление подвижности сперматозоидов. Для оплодотворения ооцитов используются сперматозоиды с прямолинейно-поступательным движением, с подвижностью не менее 4-х баллов, т.е. не менее 40% подвижных от общего количества сперматозоидов.

Инсеменированные ооциты помещают в CO₂ инкубатор при температуре 37°C на 6-8 ч., после которого ооциты переносят в чистую среду, также заранее находившийся в инкубаторе 12 ч.

По истечении 16-18 ч. от начала инсеминаций, яйцеклетки исследуют на оплодотворенность т.е. на наличие направительных телец и пронуклеусов - мужского и женского. При обнаружении оплодотворенности зиготы переносят в чистую среду и в дальнейшем повторяют данную процедуру через каждые 24 ч. Культивируют эмбрионы до стадии поздней морулы и бластоцисты.

Результаты и обсуждение

Использование ооцитов сельскохозяйственных животных для получения эмбрионов *in vitro* лежит в основе современной биотехнологии ускоренного воспроизводства. Оптимизация технологии оплодотворения «*in vitro*» обеспечит в необходимом количестве наличие ранних эмбрионов для ускоренного воспроизводства ценных генотипов, а также в исследованиях в области клеточной и генной инженерии, в частности для пересадки ядер, генов и извлечения внутриклеточной массы, изучение модели процесса оплодотворения и ранних стадий эмбриогенеза. По данным международного общества по трансплантации эмбрионов число телят молочных и мясных пород, полученных из экстракорпорально созревших ооцитов достиг 106220 и возрастает ежегодно [11]. Успех оплодотворения ооцитов «*in vitro*» зависит от многих факторов. Одним из них является правильный отбор ооцитов и среды, используемые для культивирования.

Фолликулярные ооциты, выделенные с яичников коров-доноров, характеризовались многослойными плотно прилегающими фолликулярными клетками, иногда с рыхлым, отслаивающимся кумулюсом или полностью освобожденные от него. Цитоплазма прозрачная, мелко зернистая гранулированная, с равномерно заполненной внутренней полостью. Ооциты, выделенные с предовуляторных фолликулов, находились на стадии метафазы второго деления мейоза, клетки лучистого венца (*corona radialis*) расходятся лучами от ооцита, фолликулярные клетки (*cumulus*) разросшиеся, но имеет клеточную структуру, полярное тельце уже сформировано.

Таблица 1 - Морфологическая характеристика ооцитов

№	Ооциты	Общее кол-во, п	%
1	Общее кол-во	36	100
2	Морфологически полноценные	21	58,3
3	Дегенерированные	15	41,7
4	Из них:		
5	с поврежденной <i>zona pellucida</i>	7	46,7

6	по состоянию цитоплазмы	8	53,3
---	-------------------------	---	------

За период проведения экспериментальных работ из яичников 5 коров-доноров получено всего 36 ооцитов. Из данных таблицы видно, что при морфологической оценке для дальнейшего культивирования отобрано 21 ооцит или 58,3% от общего количества яйцеклеток (рисунок 1, 2), а 15% были выбракованы вследствие повреждения целостности оболочки и состоянию цитоплазмы. Из числа дегенерированных у 46,7% или у 7 произошло механическое повреждение во время аспирации фолликулов, потерей прозрачности и с утолщенной прозрачной оболочкой, у 53,3% яйцеклеток цитоплазма характеризовалась наличием фрагментацией и вакуолей, а также темноокрашенной и сморщенной цитоплазмой.

В среднем на одного донора выход ооцитов составил $7,2 \pm 0,42$, из которых при морфологической оценке на полноценность для дальнейшего культивирования и оплодотворения было отобрано в среднем по $4,2 \pm 0,36$. Изменчивость выхода общего количества и морфологически полноценных ооцитов составляет 24,9 и 26,4% соответственно. Количество дегенерированных составил в среднем $3 \pm 0,16$ с колебаниями 55,7% (табл.2).

Максимальное и минимальное значения ооцитов, выделенных с одного яичника, находилась в пределах 4 и 12.

Таблица 2 - Средние показатели выхода ооцитов

№	Показатели	$M \pm m$	б	Cv %
1	Общее кол-во	$7,2 \pm 0,42$	4,056	24,9
2	Морф. полноценные	$4,2 \pm 0,36$	3,52	26,4
3	Дегенерированные	$3 \pm 0,16$	1,63	55,7

Извлеченные из фолликулов ооциты возобновляют мейоз спонтанно и могут проходить все стадии созревания до метафазы 2 без какого-либо гормонального воздействия. Однако этот процесс не равнозначен созреванию, которое происходит в фолликулах яичник до овуляции. В условиях культивирования происходит лишь созревание ядра без участия цитоплазмы. Вследствие этого ооцит может дальше не развиваться после оплодотворения, так как в оплодотворении большую роль играет цитоплазматические факторы [12].

У многих видов млекопитающих при оплодотворении и культивировании ранних эмбрионов «in vitro» происходит блок развития на различных стадиях. Так, при культивировании мышинных эмбрионов, эмбриогенез блокируется на стадии 2-х клеток. У коров эмбриональный блок образуется на стадии 8-16 клеток. Однако этот блок обратимый, т.е. развитие может продолжаться при естественных условиях развития, то есть после трансплантации реципиентам [13].

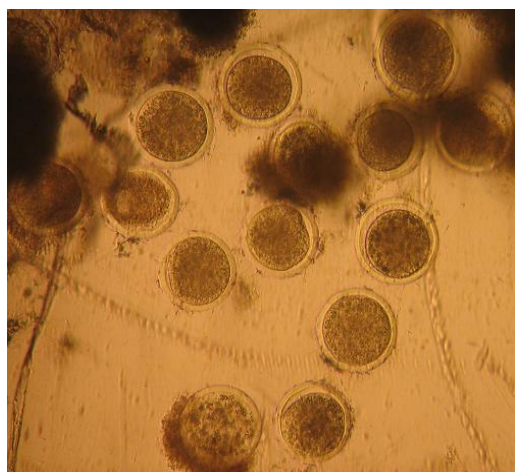


Рисунок 1 - Морфологически полноценные фолликулярные ооциты

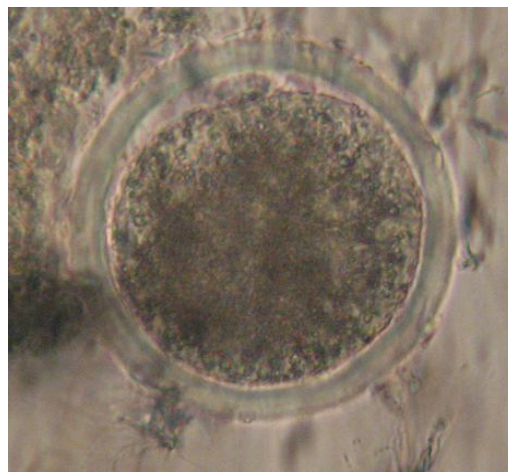


Рисунок 2 - Зрелая яйцеклетка с направленным тельцем (на 12 ч.)

Необходимым условием для нормального оплодотворения и развития эмбриона является полноценность созревания ооцита. В связи с этим важное значение имеет система культивирования, используемые для созревания ооцита. Попытки улучшить системы культивирования модификацией состава сред и физических параметров условий культивирования не привели к полному решению проблемы получения биологически полноценных эмбрионов. Поэтому, чтобы повысить качество ранних эмбрионов в условиях «in vitro», использовали со-культивирования зародышей с такими соматическими клетками как фибробласты, клетки трофобластного пузырька, кумулюса и эпителиальных клеток яйцевода.

Культивирование доимплантационных зародышей млекопитающих вне организма является необходимым звеном при проведении экспериментально-эмбриологических исследований, а также эмбриотехнологических работ по клонированию и получению трансгенных животных. Этот метод лежит в основе лечения бесплодия у людей путем экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Но хотя сам метод существует уже давно, потребности культивируемых эмбрионов и оптимальные условия для их развития «in vitro» окончательно не определены. В состав питательных сред для культивирования доимплантационных эмбрионов млекопитающих входят, как правило, сыворотка или сывороточный альбумин. Использование их приводят к 50-55% созреванию и оплодотворения ооцитов. Однако неясным остается вопрос о необходимости этих белковых добавок, а также об их роли и функциях. До сих пор не все компоненты этих добавок точно идентифицированы, а для известных не всегда выяснено их действие на эмбрионы [14].

Таблица 3 - Результаты оплодотворения фолликулярных ооцитов сексированным семенем и дальнейшее их развитие при культивировании

№	Стадии развития	Общее кол-во	Нормальные		Дегенерированные	
			n	%	n	%
2	Прокультивировано и оплодотворено	21	21	-	-	-
4	Наличие пронуклеусов	16	15	93,7	1	6,3
5	2-х бластомерные	14	14	100	-	-
6	4-6-ти бластомерные	14	13	92,8	1	7,2
7	16-32-х бластомерные	13	11	84,6	2	15,4
8	Морулы и бластоцисты	11	11	100	-	-

Качественная подготовка спермиев является одним из важнейших условий процесса оплодотворения ооцитов вне организма с последующим развитием эмбриона. Крайне сложно получить оплодотворенную зиготу из плохо подготовленных для искусственного оплодотворения спермиев. Это обусловлено тем, что эякулят многокомпонентен и состоит из семенной жидкости, иммунных и эпителиальных клеток, бактерий и клеточного дебриса, которые затрудняют проникновение спермиев в оболочку яйцеклетки. Установлено, что сперматозоиды млекопитающих приобретают способность оплодотворять яйцеклетку лишь после нескольких часов пребывания в женском половом тракте. Поэтому были проведены интенсивные исследования с целью выяснения условий, влияющих на изменение функциональной способности сперматозоидов. Процесс, обуславливающий соответствующую трансформацию сперматозоидов, получил название капацитации. Основное внимание было обращено на гормональные факторы и время, необходимые для капацитации сперматозоидов «in vitro» [15].

В результате сложных биохимических процессов сперматозоид запускает программу развития, заложенную в яйце. В настоящее время капацитация спермы многих видов животных проводится вне организма. Для оплодотворения берут свежеполученную или замороженно-оттаянную сперму. Процесс капацитации сперматозоидов «in vitro» состоит в их отмывке от семенной плазмы и предварительной инкубации перед оплодотворением, после которого, спермии приобретают повышенную способность пенетрировать ткани, что имеет

решающее значение в процессе оплодотворения яйцеклетки. Во время периода капацитации у спермиев происходит существенная реорганизация их мембран, которые приобретают способность распознавать прозрачную зону яйцеклетки и воспринимать клеточные сигналы. Так по результатам оплодотворения ооцитов семенем разделенное по полу было установлено, что процент оплодотворяемости составляет в среднем 76,2%, характеризующимся при микроскопии наличием женского и мужского пронуклеуса через 36 часов после инсеминации. При этом дальнейший рост отмечен у 14 зигот, что в процентном соотношении от количества первоначальных ооцитов составил 66,7%. И до стадии поздней морулы и ранней бластоцисты прокультивировано 11 эмбрионов (рисунок 3, 4) или 52,4% от общего количества морфологически полноценных ооцитов.

Следует так же отметить о том, что для инсеминации было израсходовано 2 дозы или 2 млн. подвижных спермиев, из расчета 100 тыс. сперматозоидов на одну яйцеклетку, что соответствует общепринятым нормативам по ЭКО.

Таким образом, по результатам исследований было установлено, что процент оплодотворяемости фолликулярных ооцитов семенем разделенное по полу находится в пределах 75%, и процент развития до поздней стадии 52,4% или по 2,2 морфологически полноценных эмбрионов на донора. Эмбриональный блок отмечен у 5-ти эмбрионов, из них у одного на стадии двух пронуклеусов и у четверых на стадии 4-32-х бластомеров. В дальнейшем данные эмбрионы были заморожены в 1,5 М растворе этиленгликоля.

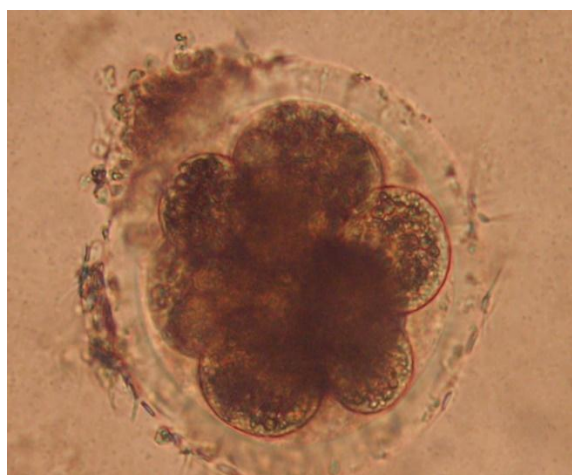


Рисунок 3 - Морфологически полноценный 6-ти клеточный эмбрион

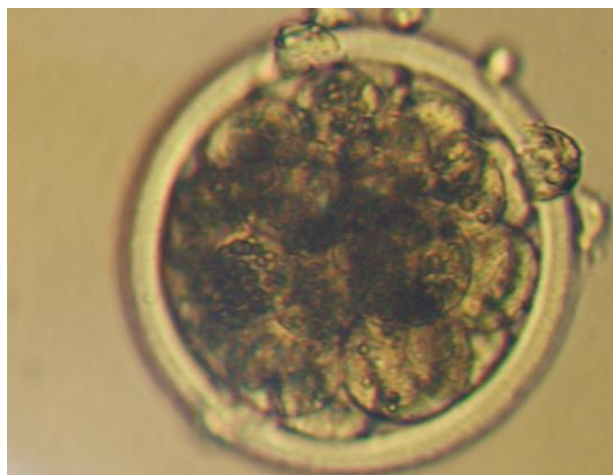


Рисунок 4 - Морфологически нормальный эмбрион на стадии морулы. Все бластомеры четкие, одинаковой величины, равномерно заполненная полость

В связи, с вышеизложенное необходимо более глубокое изучение данного вопроса, с целью повышения эффективности проведения работ по получению эмбрионов с желательным полом.

Таблица 4 - Результаты трансплантации однополых эмбрионов телкам-реципиентам

Эмбрионы	Получено всего, шт.	Заморожено, шт.	Пересажено, шт.	Приживляемость, %/шт.
Эмбрионы «in vitro»	11	11	11	36/4

В соответствии с планом научно-исследовательских работ была проведена трансплантация эмбрионов, полученных методом «in vitro» телкам-реципиентам случайного возраста. Пересадку эмбрионов, полученных методом «in vitro» проводили в замороженно-оттаянном виде. По результатам трансплантации эмбрионов реципиентам и исследовании на стельность приживляемость составила у замороженно-оттаянных полученных in vitro 36% или

стельные 4 из 11 голов. Таким образом, средняя приживляемость однополых эмбрионов при трансплантации синхронизированным по эстральному циклу реципиентам составила в среднем 36,3%, при этом данный показатель у свежеполученных эмбрионов было бы выше по сравнению с замороженно-оттаянными.

Известно, что в молочном скотоводстве большим спросом пользуется сперма, содержащая X хромосому, что определяет женский пол, в мясном - Y хромосому, что определяет мужской пол. Эффективность, получаемая от использования данной методики, составляет 65-95% особей желательного пола [16].

Ввиду того, что сексированная сперма отличается от обычной, успех работы заключается в тщательном планировании и подготовке как животного, так и самой спермы. В США за период с 2006 по 2008 года по данным Министерства Сельского Хозяйства США было искусственно осеменено сексированным семенем 24.239 голов коров и 116.846 телочек, при этом выход телочек составил более 90%.

По полученным нами результатам, соотношение желаемого пола у полученных 4 голов телят-трансплантатов составила 25 против 75% или 1 бычок и 3 телочки. Сравнительно, при проведении искусственного осеменения телок случного возраста данным семенем, соотношение пола составило 87 против 13 или 12 бычков и 82 телочек из 94 отелившихся голов. Ввиду этого соотношение приплода у данного семени находится в районе 90/10, но учитывая малое количество полученных телят-трансплантатов (4 голов) от пересадки эмбрионов процентное соотношение пола является статистически не достоверным.

Выводы

По результатам проведенных научно-исследовательских работ направленная на разработку и усовершенствование методов получения эмбрионов желательного пола у крупного рогатого скота и определение эффективности его использования в увеличении маточного поголовья получены следующие результаты. За период экспериментальных работ было получено всего 11 морфологически полноценных эмбрионов. Средний выход морфологически полноценных эмбрионов методом «in vitro» составил по 2,2 на донора. При этом при морфологической оценке фолликулярных яйцеклеток для культивирования было отобрано 21 ооцит или 58,3% от общего количества яйцеклеток, а 15% были выбракованы вследствие повреждения целостности оболочки и состоянию цитоплазмы. Из числа дегенерированных у 46,7% или у 7 произошло механическое повреждение во время аспирации фолликулов, потерей прозрачности и с утолщенной прозрачной оболочкой, у 53,3% яйцеклеток цитоплазма характеризовалась наличием фрагментацией и вакуолей, а также темноокрашенной и сморщенной цитоплазмой.

В среднем на одного донора выход ооцитов составил $7,2 \pm 0,42$, из которых при морфологической оценке на полноценность для дальнейшего культивирования и оплодотворения было отобрано в среднем по $4,2 \pm 0,36$. Изменчивость выхода общего количества и морфологически полноценных ооцитов составляет 24,9 и 26,4 % соответственно. Количество дегенерированных составил в среднем $3 \pm 0,16$ с колебаниями 55,7%.

По результатам экстракорпорального оплодотворения фолликулярных ооцитов семенем разделенное по полу установлено, что процент оплодотворяемости составляет в среднем 76,2 %, характеризующимся при микроскопии наличием женского и мужского пронуклеуса через 36 часов после инсеминации. При этом дальнейший рост отмечен у 14 зигот, что в процентном соотношении от количества первоначальных ооцитов составил 66,7 %, до стадии поздней морулы и ранней бластоцисты прокультивировано 11 эмбрионов или 52,4 % от общего количества морфологически полноценных ооцитов.

В дальнейшем с целью определения процента приживляемости при пересадке реципиентам проведена их трансплантация, в результате, которого приживляемость у замороженно-оттаянных эмбрионов, полученных методом *in vitro* составила 36%, 4 стельностей соответственно. По итогам средняя приживляемость составила 36,3%, при этом данный показатель у свеживымытых эмбрионов был бы выше по сравнению с замороженно-оттаянными полученные методом *in vitro*.

По полученным нами результатам, соотношение желаемого пола у полученных 4 голов телят-трансплантатов составила 25 против 75% или 1 бычок и 3 телочек.

Благодарность. Статья подготовлена за счет бюджетной образовательной программы докторантуры. Авторы выражают признательность коллективу Агрохолдинга «Байсерке-Агро» и лично директору ТОО «Учебный научно-производственный центр «Байсерке-Агро» Сагындыковой Сымбат Рахатовне за оказанную помощь при проведении данного исследования и написании настоящей статьи.

Список источников

1. L.F. Brito, N. Bedere, F. Douhard, H.R. Oliveira, M. Arnal, F. Peñagaricano, A.P. Schinckel, C.F. Baes, F. Miglior, Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world, *Animal*, Volume 15, Supplement 1, 2021, 100292, ISSN 1751-7311, <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100292>.
2. Lafontaine S, Labrecque R, Blondin P, Cue RI, Sirard MA. Comparison of cattle derived from in vitro fertilization, multiple ovulation embryo transfer, and artificial insemination for milk production and fertility traits. *J Dairy Sci.* 2023 Jun;106(6):4380-4396. doi: 10.3168/jds.2022-22736. Epub 2023 Apr 5. PMID: 37028966.
3. Hansen PJ. Pressing needs and recent advances to enhance production of embryos in vitro in cattle. *Anim Reprod.* 2024 Aug 26;21(3):e20240036. doi: 10.1590/1984-3143-AR2024-0036. PMID: 39286365; PMCID: PMC11404885.
4. Zago FC, Schütz LF, Gerger RPDC, de Aguiar LH, Pinzón-Osorio CA, Mezzallira A, Rodrigues JL, Forell F, Bertolini M. In vitro and in vivo embryo production efficiency in Flemish and Holstein donor females. *Anim Reprod.* 2023 Oct 30;20(3):e20230080. doi: 10.1590/1984-3143-AR2023-0080. PMID: 38025999; PMCID: PMC10681134.
5. Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology.* 2017 Mar 1;90:54-58. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.002. Epub 2016 Nov 11. PMID: 28166988.
6. Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol.* 2003 Feb;21(2):157-62. doi: 10.1038/nbt783. Epub 2003 Jan 27. PMID: 12548290.
7. Feres LF, Siqueira LGB, Palhao MP, Dos Santos LL, Brandao FZ, Viana JHM. Likelihood of pregnancy after the transfer of embryos derived from follicle aspiration and in vitro embryo production sessions with different relative efficiencies. *Anim Reprod Sci.* 2018 Jun;193:165-170. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.065. Epub 2018 Apr 15. PMID: 29678568.
8. Seneda MM, Zangirolamo AF, Bergamo LZ, Morotti F. Follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology.* 2020 Jul 1;150:180-185. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.024. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31982155.
9. Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology.* 2009 Jan 1;71(1):30-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.017. Epub 2008 Nov 11. PMID: 19004490.
10. Yaginuma H, Funeshima N, Tanikawa N, Miyamura M, Tsuchiya H, Noguchi T, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K, Hamano S. Improvement of fertility in repeat breeder dairy cattle by embryo transfer following artificial insemination: possibility of interferon tau replenishment effect. *J Reprod Dev.* 2019 Jun 14;65(3):223-229. doi: 10.1262/jrd.2018-121. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30745523; PMCID: PMC6584180.
11. 4. Ombaev A., Mirzakulov S., Chindaliev A.. (2023). SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF LIVESTOCK DEVELOPMENT IN KAZAKHSTAN. *Izdenister Natigeler*, (3(99), 36–48. <https://doi.org/10.37884/3-2023/04>.

12. Izadyar F., Van Tol H. T. A., Colenbrander B., Bevers M. M. 1997. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol. Reprod. Develop.* 47 : 175—180.

13. Кузьмина Т.И. Биологические аспекты экстракорпорального созревания, оплодотворения ооцитов и партеногенетического развития эмбрионов сельскохозяйственных животных. Международная научная конференция, Дубровицы-2003, 40-46 с.

14. Wooldridge LK, Keane JA, Rhoads ML, Ealy AD. Bioactive supplements influencing bovine in vitro embryo development. *J Anim Sci.* 2022 Jul 1;100(7):skac091. doi: 10.1093/jas/skac091. PMID: 35772761; PMCID: PMC9246663.

15. Bromfield JJ. Interaction of semen with female reproductive tract tissues: what we know, what we guess and what we need to do. *Anim Reprod.* 2024 Aug 5;21(3):e20240042. doi: 10.1590/1984-3143-AR2024-0042. PMID: 39176000; PMCID: PMC11340795.

16. Fetrow, J., M. Overton, and S. Eicker. 2007. Sexed semen: economics of a new technology. Proceedings Western Dairy Management Conference, March 7-9, Reno, NV. Available at <http://www.wdmc.org/2007/fetrow.pdf>.

References

1. L.F. Brito, N. Bedere, F. Douhard, H.R. Oliveira, M. Arnal, F. Peñagaricano, A.P. Schinckel, C.F. Baes, F. Miglior, Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world, *Animal*, Volume 15, Supplement 1, 2021, 100292, ISSN 1751-7311, <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100292>.

2. Lafontaine S, Labrecque R, Blondin P, Cue RI, Sirard MA. Comparison of cattle derived from in vitro fertilization, multiple ovulation embryo transfer, and artificial insemination for milk production and fertility traits. *J Dairy Sci.* 2023 Jun;106(6):4380-4396. doi: 10.3168/jds.2022-22736. Epub 2023 Apr 5. PMID: 37028966.

3. Hansen PJ. Pressing needs and recent advances to enhance production of embryos in vitro in cattle. *Anim Reprod.* 2024 Aug 26;21(3):e20240036. doi: 10.1590/1984-3143-AR2024-0036. PMID: 39286365; PMCID: PMC11404885.

4. Zago FC, Schütz LF, Gerger RPDC, de Aguiar LH, Pinzón-Osorio CA, Mezzallira A, Rodrigues JL, Forell F, Bertolini M. In vitro and in vivo embryo production efficiency in Flemish and Holstein donor females. *Anim Reprod.* 2023 Oct 30;20(3):e20230080. doi: 10.1590/1984-3143-AR2023-0080. PMID: 38025999; PMCID: PMC10681134.

5. Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology.* 2017 Mar 1;90:54-58. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.002. Epub 2016 Nov 11. PMID: 28166988.

6. Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol.* 2003 Feb;21(2):157-62. doi: 10.1038/nbt783. Epub 2003 Jan 27. PMID: 12548290.

7. Feres LF, Siqueira LGB, Palhao MP, Dos Santos LL, Brandao FZ, Viana JHM. Likelihood of pregnancy after the transfer of embryos derived from follicle aspiration and in vitro embryo production sessions with different relative efficiencies. *Anim Reprod Sci.* 2018 Jun;193:165-170. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.065. Epub 2018 Apr 15. PMID: 29678568.

8. Seneda MM, Zangirolamo AF, Bergamo LZ, Morotti F. Follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology.* 2020 Jul 1;150:180-185. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.024. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31982155.

9. Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology.* 2009 Jan 1;71(1):30-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.017. Epub 2008 Nov 11. PMID: 19004490.

10. Yaginuma H, Funeshima N, Tanikawa N, Miyamura M, Tsuchiya H, Noguchi T, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K, Hamano S. Improvement of fertility in repeat breeder dairy cattle by

embryo transfer following artificial insemination: possibility of interferon tau replenishment effect. J Reprod Dev. 2019 Jun 14;65(3):223-229. doi: 10.1262/jrd.2018-121. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30745523; PMCID: PMC6584180.

11. 4. Ombaev A., Mirzakulov S., Chindaliev A.. (2023). SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF LIVESTOCK DEVELOPMENT IN KAZAKHSTAN. Izdenister Natigeler, (3(99)), 36–48. <https://doi.org/10.37884/3-2023/04>.

12. Izadyar F., Van Tol H. T. A., Colenbrander B., Bevers M. M. 1997. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. Mol. Reprod. Develop. 47 : 175—180.

13. Kuz'mina T.I. Biologicheskie aspekty ehkstrakorporal'nogo sozrevaniya, oplodotvoreniya ootsitov i partenogeneticheskogo razvitiya ehmbriionov sel'skokhozyajstvennykh zhivotnykh. Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya, Dubrovitsy-2003, 40-46 s.

14. Wooldridge LK, Keane JA, Rhoads ML, Ealy AD. Bioactive supplements influencing bovine in vitro embryo development. J Anim Sci. 2022 Jul 1;100(7):skac091. doi: 10.1093/jas/skac091. PMID: 35772761; PMCID: PMC9246663.

15. Bromfield JJ. Interaction of semen with female reproductive tract tissues: what we know, what we guess and what we need to do. Anim Reprod. 2024 Aug 5;21(3):e20240042. doi: 10.1590/1984-3143-AR2024-0042. PMID: 39176000; PMCID: PMC11340795.

16. Fetrow, J., M. Overton, and S. Eicker. 2007. Sexed semen: economics of a new technology. Proceedings Western Dairy Management Conference, March 7-9, Reno, NV. Available at <http://www.wdmc.org/2007/fetrow.pdf>.

Д.М. Бекенов^{*1}, Б.А. Буралхиев¹, Г.Ф. Габит¹, Я. Мичинский²

¹«Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КеАҚ, Алматы, Қазақстан Республикасы, Ironlan-1983@inbox.ru*, buralkhiev@bk.ru, gabitgulzat_07@mail.ru

²Варминск-Мазур университеті, Польша, micinsk@uwm.edu.pl

«IN VITRO» ӘДІСІ БОЙЫНША СҮТТІ ІРІ ҚАРА МАЛ ШАРУАШЫЛЫҒЫНДА БІР ЖЫНЫСТЫ ЭМБРИОНДАРДЫ АЛУ ТИІМДІЛІГІН БАҒАЛАУ

Аңдатпа

Реципиенттерге кейіннен трансплантациялау үшін жоғары құнды асыл тұқымды малдардың эмбриондарын алудың тиімді және үнемді әдістерінің бірі эмбриондарды «in vitro» өндіру болып табылады. Жұмыртқаларды экстракорпоралды ұрықтандыру әдісін қолдану, ең алдымен, төмен шығындармен, қымбат гормоналды препараттарды қолданбай жұмыртқаны көп мөлшерде алу мүмкіндігімен және оны жүзеге асыру кезінде ең аз еңбек шығындарымен түсіндіріледі, өйткені аналық жұмыртқаны жыл бойы және жануардың бүкіл өмірінде алуға болады. Оның негізі – ұрғашы малдардың жыныс бездерінде жас ұрпақты өсіру кезінде пайда болатын кедергілерге байланысты пайдаланылмайтын үлкен генетикалық резервті білдіретін жүздеген мың жыныс жасушаларының болуы. Бұл зерттеудің мақсаты in vitro әдісімен сүтті ірі қара малдың жынысты эмбриондарын алудың тиімділігін бағалау болды. Эксперименттік жұмыс барысында 11 морфологиялық толық эмбриондар алынып, трансплантацияланды. Ұрықтану көрсеткіші 36,3 пайызды құрады. Біздің нәтижелеріміз бойынша трансплантациядан алынған 4 бұзаудағы қажетті жыныстың қатынасы 75% немесе 1 бұқа мен 3 құнажынға қарсы 25 болды.

Зерттеулер биотехнологияда қабылданған тәжірибелік әдістемеге сәйкес Microsoft Excel бағдарламалық пакетін қолдану арқылы материалдарды өңдеу арқылы жүргізілді. Зертханалық жануарларға зерттеулер жүргізу үшін қолданылатын эксперименттер мен әдістеме биологиялық қауіпсіздік талаптарына және эксперименттік және басқа да ғылыми мақсаттар үшін пайдаланылатын омыртқалы жануарларды қорғау жөніндегі Еуропалық конвенцияда (Старсбург, 1987) белгіленген жануарларға тәжірибе жүргізудің этикалық принциптеріне сәйкес келеді.

Кілт сөздер: Бір жынысты эмбриондар, сүтті ірі қара мал шаруашылығы, эмбриондарды трансплантациялау, экстракорпоралды ұрықтандыру, фолликул, гормон, эмбрион.

D.M. Bekenov*¹, B.A. Buralkhiev¹, G.G. Gabit¹, J. Michinsky²

¹Non-profit joint-stock company «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, Republic of Kazakhstan, ironlan-1983@inbox.ru*, buralkhiev@bk.ru, gabitgulzat_07@mail.ru

²University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Republic of Poland, micinsk@uwm.edu.pl

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF OBTAINING SEXED CATTLE EMBRYOS IN DAIRY CATTLE BREEDING BY THE «IN VITRO» METHOD

Abstract

One of the effective and cost-effective methods of obtaining embryos of highly valuable breeding animals for subsequent transplantation to recipients is the production of embryos “in vitro”. The use of the method of in vitro fertilization of eggs is explained primarily by low costs, the possibility of extracting a large number of eggs without the use of expensive hormonal drugs and the lowest labor costs during its implementation, given that eggs from females can be obtained all year round and throughout the life of the animal. The basis is the presence in the female sex glands of hundreds of thousands of sex cells, representing a huge genetic reserve that is not used due to the obstacles that arise with bearing young. The aim of the current study was to evaluate the efficiency of obtaining sexed embryos of dairy cattle using the in vitro method. During the experimental work, 11 morphologically complete embryos were obtained and transplanted. The percentage of fertilization was 36.3%. According to our results, the ratio of the desired sex in the 4 transplant calves was 25 versus 75% or 1 bull and 3 heifers.

The studies were carried out in accordance with the methodology of experimental work adopted in biotechnology with the processing of materials using the Microsoft Excel software package. The experiments and the methodology used to conduct studies on laboratory animals comply with the requirements of biological safety and the ethical principles of experimentation on animals set out in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Starsburg, 1987).

Key words: Sexed embryos, dairy cattle breeding, embryo transplantation, in vitro fertilization, follicle, hormone, embryo.

МРНТИ 639.212.3

DOI <https://doi.org/10.37884/2-2025/05>

*Альпейсов Ш.А¹., Маратова Г.М*²., Аубакирова М.О²., Аблайсанова Г.М.²*

¹ *Казахский Национальный Аграрный исследовательский университет, г. Алматы, Республика Казахстан, sh.alpeisov@mail.ru*

² *ТОО «Научно-производственный центр рыбного хозяйства», г. Алматы, Республика Казахстан, guldana.maratova.91@mail.ru*, judo_moldir@mail.ru, ablai_gulmira@mail.ru*

ОПЫТ ВОСПРОИЗВОДСТВА СТЕРЛЯДИ В УСЛОВИЯХ РГКП «УРАЛО-АТЫРАУСКИЙ ОСЕТРОВЫЙ РЫБОВОДНЫЙ ЗАВОД»

Аннотация

Растущая антропогенная нагрузка на естественные популяции гидробионтов часто приводит к негативным изменениям их структуры, снижению численности, иногда даже к полному исчезновению. Весьма показательна ситуация, сложившаяся в настоящее время с представителями отряда осетрообразных. Имеющие широкий ареал распространения, эти рыбы во многих местах своего традиционного обитания потеряли промысловое значение. Это существенным образом может быть объяснено изменением гидрологического режима в связи с зарегулированием большинства рек и резким сокращением площадей естественных нерестилищ. Поэтому вопрос о формировании ремонтно-маточных стад с целью