

ISSN 2305-9397

*Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық
университетінің ғылыми-практикалық журналы*

*Научно-практический журнал Западно-Казахстанского
аграрно-технического университета имени Жангир хана*

*Scientific and practical journal of Zhangir Khan West Kazakhstan
Agrarian-Technical University*

2005 жылдан бастап әр тоқсан сайын шығады

Издается ежеквартально с 2005 года

Published quarterly since 2005

ҒЫЛЫМ ЖӘНЕ БІЛІМ
Наука и образование
Science and education
2-бөлім

№ 2-2 (75) 2024

14 Abilov, A.I. Metabolicheskiy profil' i spermoprodukciya u golshtinskih bykov-proizvoditelej zarubezhnoj selekcii pri soderzhanii v raznyh klimaticheskikh i geohimicheskikh usloviyah v Rossii i Kazahstane [Tekst] / A.I. Abilov [i dr.] // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. – 2021. – T. 56. № 4. – S. 730-751.

15 Harzhau, A.H. Harakteristika plemennyh resursov krupnogo rogatogo skota respubliki kazahstan na osnove ispol'zovaniya DNK-mikrosatellitov [Tekst] / A. Harzhau [i dr.] // V sbornike: Sovremennye dostizheniya i problemy biotekhnologii sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh BioTekhZH – 2016. Materialy 11-j Vserossijskoj konferencii-shkoly molodyh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiem. – 2016. – S. 236-244.

16 Bogdanov, E.A. Tipy teloslozheniya s.-h. zhivotnyh i cheloveka (obshchezootekhnicheskie osnovy ekster'era) / E.A. Bogdanov // Gosizdat. – 1923. – 311s.

17 Pridorogin, M.I. Voprosy zhivotnovodstva. «Novaya derevnya» [Tekst] / M.I. Pridorogin. – Moskva. 1929. – 190 s.

18 Eklz, K.G. Molochnoe skotovodstvo SSHA [Tekst] / K.G. Eklz // Gosudarstvennoe izdatel'stvo s.-h. literatury, Moskva, 1960. – 639s.

19 Anohin, N. Osobennosti golshtinizirovannogo skota razlichnoj selekcii [Tekst] / N. Anohin // Molochnoe i myasnoe skotovodstvo. – 2005. – №2. – S. 23-24.

20 Loginov, ZH.G. Linejnaya ocenka ekster'era golshtinskih korov [Tekst] / ZH.G. Loginov [i dr.] // Zootekhnika. – 1995. – N 6. – S. 2-5.

21 Loginov, ZH. G. Metodicheskie rekomendacii po ocenke bykov po tipu ih docherej, poluchaemyh pri poglotitel'nom skreshchivanii korov otechestvennyh porod s golshtinami / ZH.G. Loginov [i dr.]. – L., 1989. – 31 s.

22 Oblivancov, V. Linejnaya ocenka ekster'era korov buryh porod Ukrainy [Tekst] / V. Oblivancov // Molochnoe i myasnoe skotovodstvo. – 2004. – N 7. – S. 35-38.

23 Prozherin, V.P. Linejnaya ocenka ekster'era korov holmogorskoj породы [Tekst] / V.P. Prozherin [i dr.] // Zootekhnika. – 2008. – №12. – S. 3-4.

24 Prohorenko, P.N. Linejnaya ocenka teloslozheniya ajrshirskogo skota i ee svyaz' s molochnoj produktivnost'yu [Tekst] / P.N. Prohorenko [i dr.] // Zootekhnika. – 2003. – № 12. – S. 2-5.

ТҮЙІН

Жануарлардың сыртқы конституциялық қасиеттеріне арналған селекция дене бітімінің құрылымы жақсы жануарлар табынын құруға мүмкіндік береді, бұл олардың өнімділігі мен өмір сүру ұзақтығын жақсартуға көмектеседі. Осы орайда сүт өндірісінің қарқынды дамуы өнімділік деңгейінен басқа, жануарлар конституциясының беріктігіне, дене бітіміне және басқа да сыртқы көрсеткіштеріне жоғары талаптар қойылады. Нәтижесінде жануарлардың конституциялық және сыртқы ерекшеліктеріне көбірек көңіл бөлінеді. Осы ретте жұмыстың мақсаты – голштин қара-ала тұқымды бұқалардың қыздарының дене бітімін бағалау және соның нәтижесінде сыртқы дене бітімі қажетті типтегі табын түзету мақсатында қолданылатын асыл тұқымды бұқаларды іріктеп алу. Ақмола облысының 5 шаруашылығында 1-3 төлдеу маусымындағы 149 асыл тұқымды сиыр дене бітімі бойынша желілік бағаланды. Желілік бағалау, көздік бағалау және сыртқы профиль деректерінің көрсеткіштеріне сәйкес, зерттелген шаруашылықтардың мал басына Дио 7013 және Дод 7005 бұқаларын енгізу Лайнеріне 1881 бұқасына қарағанда жақсы. Дио 7013 және Дода 7005 қыздары ең жақсы көрініске ие.

УДК 636.018
МРНТИ 68.39.13

DOI 10.52578/2305-9397-2024-2-2-189-200

Бекенов Д.М., магистр естественных наук и биотехнологии, **основной автор**
<https://orcid.org/0000-0003-2244-0878>,

НАО «Казахский Национальный аграрный исследовательский университет», ул. Абая 8, г. Алматы, Республика Казахстан ironlan-1983@inbox.ru,

Баймуканов Д.А., член-корреспондент Национальной академии наук Республики Казахстан, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, <https://orcid.org/0000-0002-4684-7114>,

ТОО «Научно-производственный центр животноводства и ветеринарии», ул. Кенесары, 40, офис 1505, 010000 (Z10P6B8), г. Астана, Республика Казахстан, dbaimukanov@mail.ru,

Каргаева М.Т., кандидат биологических наук, <https://orcid.org/0000-0001-7955-6340>,

ТОО «Научно-производственный центр животноводства и ветеринарии», г. Астана, ул. Кенесары 40, 010000, Республика Казахстан, makpal.11@list.ru,

Буралхиев Б.А., кандидат сельскохозяйственных наук, <https://orcid.org/0000-0002-8381-7045>

НАО «Казахский Национальный аграрный исследовательский университет», ул. Абая 8, г. Алматы, Республика Казахстан, buralkhiev@bk.ru.

Bekenov D.M., Master of Natural Sciences and Biotechnology, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0003-2244-0878>

NAO «Kazakh National Agrarian Research University», 8 Abaya str., Almaty, Republic of Kazakhstan ironlan-1983@inbox.ru,

Baimukanov D.A., Corresponding Member of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Doctor of Agricultural Sciences, Associate Professor, <https://orcid.org/0000-0002-4684-7114>

LLP «Scientific and Production Center of Animal Husbandry and Veterinary Medicine», 40 Kenesary St., office 1505, 010000 (Z10P6B8), Astana, Republic of Kazakhstan, dbaimukanov@mail.ru,

Kargaeva M.T., Candidate of Biological Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-7955-6340>

LLP «Scientific and Production Center of animal husbandry and Veterinary Medicine», Astana, 40 Kenesary str., 010000, Republic of Kazakhstan, makpal.11@list.ru,

Buralkhiev B.A., Buralhiev, Candidate of Agricultural Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-8381-7045>

NAO «Kazakh National Agrarian Research University», 8 Abaya str., Almaty, Republic of Kazakhstan, buralkhiev@bk.ru

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ООЦИТОВ И РАЗВИТИЕ
ЭМБРИОНОВ В УСЛОВИЯХ «IN VITRO» В МОЛОЧНОМ СКОТОВОДСТВЕ
ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF OOCYTE FERTILIZATION AND
DEVELOPMENT OF EMBRYOS IN "IN VITRO" CONDITIONS IN DAIRY CATTLE
FARMING**

Аннотация

Целью работы явилось определение эффективности оплодотворения фолликулярных ооцитов и развития экстракорпорально оплодотворенных эмбрионов крупного рогатого скота молочного направления продуктивности.

Исследования осуществлялись в соответствии с методикой опытного дела принятая 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.).

В настоящее время как способ получения множественных эмбрионов в передовых зарубежных странах широко применяется метод получения яйцеклеток от живых доноров с помощью ультразвукового аппарата и вакуумного насоса без использования гонадотропных препаратов, чем и объясняется широкое распространение на рынке недорогих эмбрионов полученных на основе экстракорпорального оплодотворения. От высокоценных коров-доноров в течение года, возможно, получать морфологически полноценные яйцеклетки с преовуляторных фолликулов через каждые 15-20 дней, что позволит повысить экономическую эффективность и ускоренное воспроизводство высокопродуктивных племенных животных в

несколько раз. Но на данном этапе в практике животноводства и в науке Казахстана эти методы практически не отработаны, чем и объясняется его не востребованность и в связи с этим на сегодняшнее время является немаловажным разработка и широкое распространение данного направления.

По результатам проведенных исследований установлено, что при экстракорпоральном оплодотворении фолликулярных ооцитов коров в различных культуральных системах в сравнительном аспекте было установлено, что наибольший процент оплодотворения и дальнейшего развития эмбрионов наблюдается в синтетической среде IVF- Universal, 64% против 16,8% и 21,8%, а развитие эмбрионов до поздней стадии составил 35,3%, тогда как в двух других использованных культуральных средах не было обнаружено ни одного эмбриона.

ANNOTATION

The purpose of the work was to determine the efficiency of fertilization of follicular oocytes and the development of in vitro fertilized embryos of dairy cattle.

The research was carried out in accordance with the experimental methodology adopted in biotechnology with the processing of materials using the Microsoft Excel software package. The experiments and methods used for conducting research on laboratory animals comply with the requirements of biological safety and 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).

Currently, as a method of obtaining multiple embryos in advanced foreign countries, the method of obtaining eggs from living donors using an ultrasound machine and a vacuum pump without the use of gonadotropic drugs is widely used, which explains the widespread availability on the market of inexpensive embryos obtained on the basis of in vitro fertilization. From high-value donor cows, it is possible to obtain morphologically complete eggs from preovulatory follicles every 15-20 days throughout the year, which will increase economic efficiency and accelerate the reproduction of highly productive breeding animals several times. But at this stage, in the practice of livestock farming and in the science of Kazakhstan, these methods have practically not been worked out, which explains its lack of demand, and in connection with this, the development and widespread dissemination of this direction is important today.

Based on the results of the studies, it was established that during in vitro fertilization of follicular oocytes of cows in various cultural systems, in a comparative aspect, it was found that the highest percentage of fertilization and further development of embryos is observed in the synthetic IVF-Universal medium, 64% versus 16.8% and 21.8 %, and the development of embryos to the late stage was 35.3%, while not a single embryo was detected in the other two culture media used.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, молочное скотоводство, экстракорпоральное оплодотворение, in vitro, фолликул, ооцит, эмбрион.

Key words: cattle, dairy farming, in vitro fertilization, in vitro, follicle, oocyte, embryo.

Введение. Важнейшим направлением развития животноводства в Казахстане является интенсификация производства, основанная на современных научных достижениях, обеспечивающих высокую производительность продукции животноводства. Внедрение прогрессивных технологий производства продуктов животноводства создает условия для наиболее полного проявления генетического потенциала животных [1].

При этом особое значение придается разработке и освоению эффективных методов биотехнологии, клеточной и геномной инженерии, созданию на их основе эффективных методов размножения высокоценных сельскохозяйственных животных [2]. За последние десятилетия биологическая наука бурно развивается и создаёт новые направления, которые не только помогают решать задачи, но и намечает пути принципиально нового биологического производства, которая давно ставила перед биологией производственная практика [3-5].

Стремительно расширяющиеся знания о процессах жизнедеятельности позволяют не только приспособливать эти процессы для практических целей, но и управлять ими, а также

создавать весьма перспективные в практическом отношении новые системы, не существующие в природе, хотя и аналогичные существующим.

Кардинальное решение проблемы ускоренного воспроизводства животных в настоящее время основываются на том, чтобы перейти к нетрадиционным способам увеличения плодовитости. Для этого применяется целый ряд биотехнологических методов, разработанных на основе углубленных исследований репродуктивной функции, её регуляции, а также на совершенствование приемов манипуляции с эмбрионами, половыми и соматическими клетками.

Одним из эффективных и экономически выгодных методов позволяющая наиболее полно реализовать потенциал животных является разработка методики получения эмбрионов «in vitro» [6]. 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 [7]. Тем более известно, что в яичнике самок содержатся сотни тысяч половых клеток, представляющих огромный генетический резерв, который не используется из-за препятствий возникающий с вынашиванием детенышей [8].

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) [9]. В развитии этого поставлена задача разработки методов культивирования и оплодотворения фолликулярных ооцитов коров in vitro, а также влияния методов микроманипуляции на эмбрионы оплодотворенных экстракорпорально.

Цель исследования - определение эффективности оплодотворения фолликулярных ооцитов и развития экстракорпорально оплодотворенных эмбрионов крупного рогатого скота молочного направления продуктивности.

В соответствии с поставленной целью решали следующие задачи:

- определить степень оплодотворения фолликулярных ооцитов;
- оценка развития экстракорпорально оплодотворенных эмбрионов.

Материалы и методы исследований. Научные исследования проводились в лаборатории ТОО «Учебный научно-производственный центр «Байсерке-Агро» Талгарского района Алматинской области на яичниках, полученных от забитых на убойном цехе Агрохолдинга «Байсерке-Агро» коров голштинской породы.

1. Получение и подготовка спермы к оплодотворению ооцитов. При проведении наших исследований для оплодотворения яйцеклеток мы использовали замороженно-оттаянное семя быка-производителя.

Как известно сперматозоиды млекопитающих перед естественным оплодотворением в половых путях самки проходит процесс созревания так называемый процесс капацитации, и только после этого они способны проникнуть и оплодотворить яйцеклетку [10]. Процесс капацитации по мнению некоторых авторов заключается в созревании, удалении протеина и других макромолекулярных субстанции в плазматической мембране сперматозоида, который в естественных условиях происходит в половом аппарате самки точнее в яйцепроводе. Поэтому при проведении работ по ЭКО ооцитов необходимо проводить центрифугирование и флотацию сперматозоидов [11].

2. Культивирование и оплодотворение ооцитов. Культивирование ооцитов и эмбрионов проводили 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 7,4, что соответствует pH крови, такая кислотность оптимальна для оплодотворения и предимплантационного развития ооцитов и эмбрионов [12, 13].

Яйцеклетки культивировали и оплодотворяли в 1 мл четырех-луночных чашках в 800 мкл среды для культивирования яйцеклеток. Ооциты переносили в отдельные лунки четырех-

луночной 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 переносили в чистую среду для культивирования яйцеклеток, заранее находившиеся в CO₂ инкубаторе в течение 12 ч [14].

Результаты и их обсуждение. Помимо процессов созревания ядерного аппарата, в самой цитоплазме яйцеклетки также происходят структурные и биохимические преобразования: идет активный синтез и накопление необходимых для развития ооцита и будущего эмбриона веществ - белков, молекул-источников энергии, молекул РНК, а также распределение по цитоплазме клеточных органелл [15]. При созревании яйцеклетка накапливает в себе необходимый для развития эмбриона набор веществ и в момент оплодотворения находится на стадии II блока мейоза, который снимается при проникновении сперматозоида. И исходя из этого для развития и оплодотворения незрелых фолликулярных ооцитов необходимы условия наиболее максимально соответствующие естественным, т.е. тем, в которых обеспечивается нормальное функционирование механизмов регуляции оогенеза и раннего эмбриогенеза «*in vivo*». В качестве биологически активного фактора в большинстве используют сыворотку крови, содержащую компоненты, способствующие выживанию и нормальному развитию клеток [16, 17, 18].

Изучение эффективности использования в качестве стимуляторов оогенеза экзогенных культуральных сред в культивировании «*in vitro*», исследование влияния различных систем на процессы оогенеза и эмбриогенеза у коров «*in vitro*», проведение сравнительного анализа позволит совершенствовать биотехнологические методы получения полноценных эмбрионов для работ по клеточной инженерии, а также в ускоренном воспроизводстве ценных генотипов [19, 20]. В связи с этим нами ставилась задача изучения влияния различных культуральных систем на степень созревания, оплодотворения и в дальнейшем на дробление эмбрионов. Для этого мы использовали среду на основе Дюльбекко с 10% гомологичной сывороткой, 100% фолликулярную жидкость и среду IVF-Universal, разработанная для проведения экстракорпорального оплодотворения ооцитов «*in vitro*».

Таким образом, всего на культивирование как было сказано, поставлено 1243 ооцита полученные из яичников забитых овец, которые для сравнительного анализа были разделены на 3 группы. Первую группу состоящих из 356 морфологически полноценных ооцитов культивировали в среде Дюльбекко с 10% гомологичной сывороткой, вторую группу из 428 ооцитов в 100 % фолликулярной жидкости и третью группу из 459 ооцитов в среде IVF-Universal.

В ходе проведения эксперимента поэтапно проводили морфологическую оценку, то есть после культивирования перед оплодотворением, через 14-16 часов после инсеминации спермой (рис.18) и при каждом переносе эмбрионов в чистую среду. Морфологически неполноценные ооциты и эмбрионы выбраковывали. Основными критериями, которого служили неравномерность состояния цитоплазмы, наличие более двух пронуклеусов, асимметричное и фрагментированное деление клеток эмбриона.

Как видно из данных таблицы 1 при культивировании ооцитов в среде Дюльбекко с 10% гомологичной сывороткой морфологическую полноценность сохранили 77 % из 356 ооцитов, что составляет 274 ооцита, 23 % или 82 яйцеклетки были выбракованы вследствие фрагментации и дегенерирования внутренней массы. В фолликулярной жидкости показатель полноценности наблюдалось у 88,8 % или у 380 из 428 яйцеклеток, из которых 11,2 % также были выбракованы. Наиболее высокие показатели получены в среде IVF, в котором морфологическую полноценность сохранили 92 % из 459, что составляет 422 ооцитов, процент дегенерирования составил 8 или 37 ооцитов. При дальнейшем культивировании и инсеминацией спермой ооцитов и наблюдении через 14-18 ч. наличие оплодотворения т.е. двух пронуклеусов и направительных телец обнаружено в среде Дюльбекко у 14,6 % от общего количества ооцитов или у 52 ооцитов из которых полноценными оказались 41 (78,8 %). У ооцитов, прокультивированных в ФЖ этот показатель был немного выше и составил 29,2 % от 428 ооцитов из которых 86,4 % полноценные. В среде IVF наличие двух пронуклеусов обнаружено у 54,4 %, что при сравнении во многом превышает показатели обеих сред.

Таблица 1 –Сравнительная характеристика оплодотворения ооцитов и развития эмбрионов в различных культуральных системах

№	Наименование среды	Дюльбекко с 10% гомологичной сывороткой					Фолликулярная жидкость					IVF- Universal				
		Общее кол-во	Нормальные		Дегенерированные		Общее кол-во	Нормальные		Дегенерированные		Общее кол-во	Нормальные		Дегенерированные	
			п	%	п	%		п	%				п	%	п	%
1	Прокультивировано и оплодотворено	356	274	77	82	23	428	380	88,8	48	11,2	459	422	92	37	8
2	Наличие пронуклеусов	52	41	78,8	11	21,2	125	108	86,4	17	13,6	250	224	89,6	26	10,4
3	2-х бластомерные	46	33	71,7	13	28,3	83	56	67,5	27	32,5	270	221	81,85	49	18,15
4	4-6-ти бластомерные	22	19	86,36	3	13,64	48	36	75	12	25	208	196	94,23	12	5,77
5	16-32-х бластомерные	13	8	61,54	5	38,46	8	5	62,5	3	37,5	193	186	96,37	7	3,63
6	Морулы и бластоцисты	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	162	158	97,53	4	2,47

В ходе проведения эксперимента поэтапно проводили морфологическую оценку, то есть после культивирования перед оплодотворением, через 14-16 часов после инсеминации спермой (рис.18) и при каждом переносе эмбрионов в чистую среду. Морфологически неполноценные ооциты и эмбрионы выбраковывали. Основными критериями, которого служили неравномерность состояния цитоплазмы, наличие более двух пронуклеусов, асимметричное и фрагментированное деление клеток эмбриона.

Как видно из данных таблицы 1 при культивировании ооцитов в среде Дюльбекко с 10% гомологичной сывороткой морфологическую полноценность сохранили 77 % из 356 ооцитов, что составляет 274 ооцита, 23 % или 82 яйцеклетки были выбракованы вследствие фрагментации и дегенерирования внутренней массы. В фолликулярной жидкости показатель полноценности наблюдалось у 88,8 % или у 380 из 428 яйцеклеток, из которых 11,2 % также были выбракованы. Наиболее высокие показатели получены в среде IVF, в котором морфологическую полноценность сохранили 92 % из 459, что составляет 422 ооцита, процент дегенерирования составил 8 или 37 ооцитов. При дальнейшем культивировании и инсеминацией спермой ооцитов и наблюдении через 14-18 ч. наличие оплодотворения т.е. двух пронуклеусов и направительных телец обнаружено в среде Дюльбекко у 14,6 % от общего количества ооцитов или у 52 ооцитов из которых полноценными оказались 41 (78,8 %). У ооцитов, прокультивированных в ФЖ этот показатель был немного выше и составил 29,2 % от 428 ооцитов из которых 86,4 % полноценные. В среде IVF наличие двух пронуклеусов обнаружено у 54,4 %, что при сравнении во многом превышает показатели обоих сред.

Через 24-36 ч. культивирования происходило дробление оплодотворенных ооцитов и при микроскопической оценке наличие двух бластомеров в среде Дюльбекко с 10% гомологичной сывороткой обнаружено у 46 эмбрионов, что составляет от общего количества оплодотворенных яйцеклеток 12,9 %, из которых без видимых признаков фрагментации и с нормальным дроблением клеток оказались 33 эмбриона (71,7 %), а у 21,2 % наблюдались патологии связанные с фрагментированными и асинхронными дроблениями бластомеров. В ФЖ количество дробящихся эмбрионов составило 19,39 % или 83 двухбластомерных эмбрионов и нормальных 67,5 % или 56 эмбрионов. В IVF количество дробящихся эмбрионов было выше и составило 58,8 % (270) от числа ооцитов, а процент дегенерированных 18,5%.

Таким образом, всего на культивирование как было сказано, поставлено 1243 ооцита полученные из яичников забитых овец, которые для сравнительного анализа были разделены на 3 группы. Первую группу состоящих из 356 морфологически полноценных ооцитов культивировали в среде Дюльбекко с 10% гомологичной сывороткой, вторую группу из 428 ооцитов в 100 % фолликулярной жидкости и третью группу из 459 ооцитов в среде IVF-Universal. В ходе проведения эксперимента поэтапно проводили морфологическую оценку, то есть после культивирования перед оплодотворением, через 14-16 часов после инсеминации спермой и при каждом переносе эмбрионов в чистую среду. Морфологически неполноценные ооциты и эмбрионы выбраковывали. Основными критериями, которого служили неравномерность состояния цитоплазмы, наличие более двух пронуклеусов, асимметричное и фрагментированное деление клеток эмбриона.

При переносе эмбрионов в чистую среду и культивировании до стадии 4-6-ти бластомеров дробились в среде Дюльбекко 22 эмбриона, из которых 86,36 % (19) морфологически полноценные, в ФЖ 48 или 11,2 % от числа ооцитов, в среде IVF-Universal данный показатель равнялся к 45,3 % или 208 4-х, 6-ти бластомерных эмбрионов, из которых нормальную морфологию сохранили 94,23 % или 196 эмбрионов. До стадии 16-ти, 32 –х бластомеров дробились в Дюльбекко 13 эмбрионов, из которых 38,46 % наблюдалось асинхронное деление бластомеров, в ФЖ эмбрионы продолживших дробление резко сократилось и составило всего 1,86 % от числа оплодотворенных ооцитов, а в среде IVF количество дробящихся остался практически на том же уровне и составил 42 % из которых у 96,37 % происходило нормальное дробление. На 6-8 день культивирования при просмотре под микроскопом у эмбрионов прокультивированные и оплодотворенные в средах Дюльбекко и ФЖ произошла остановка развития и наблюдалось сморщивание клеток, а между тем в среде IVF-Universal количество эмбрионов на поздних стадиях развития составило 35,3 %, что составляет 162 от общего числа оплодотворенных фолликулярных ооцитов (рис 1.).

Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что основной составляющей нормального оплодотворения и развития эмбрионов является культуральная система. При культивировании в средах Дюльбекко с 10% гомологичной сывороткой и фолликулярной жидкости процент оплодотворенных составил 12,9 и 19,4, при культивировании дробление до 16-ти, 32-х клеток составило 3,65 % и 1,87 % соответственно, после которого происходил так называемый эмбриональный блок развития, то есть эмбрионы останавливали дальнейшее развитие и происходила их дегенерация. В сравнении количество оплодотворенных и прокультивированных до стадии 16-ти, 32-х клеток в среде IVF-Universal составили 58,8 % и 42 %, а количество прокультивированных эмбрионов до поздней стадии развития 35,3 %.

Таким образом, полученные нами результаты показали, что при культивировании и оплодотворении ооцитов наиболее высокие показатели отмечены у среды IVF- Universal. При морфологической оценке на степень оплодотворения, наличие пронуклеусов обнаружено в среде Дюльбекко у 18,9 %, в ФЖ у 32,9 % и в среде IVF- Universal у 59,24 % от общего количества отобранных морфологически полноценных ооцитов. Через 24-36 ч. культивирования наличие 2-х бластомеров обнаружено в среде Дюльбекко у 16,8 %, в ФЖ у 21,8 % и в IVF-Universal 64 %, что характеризует также наиболее достоверный показатель оплодотворения фолликулярных ооцитов.

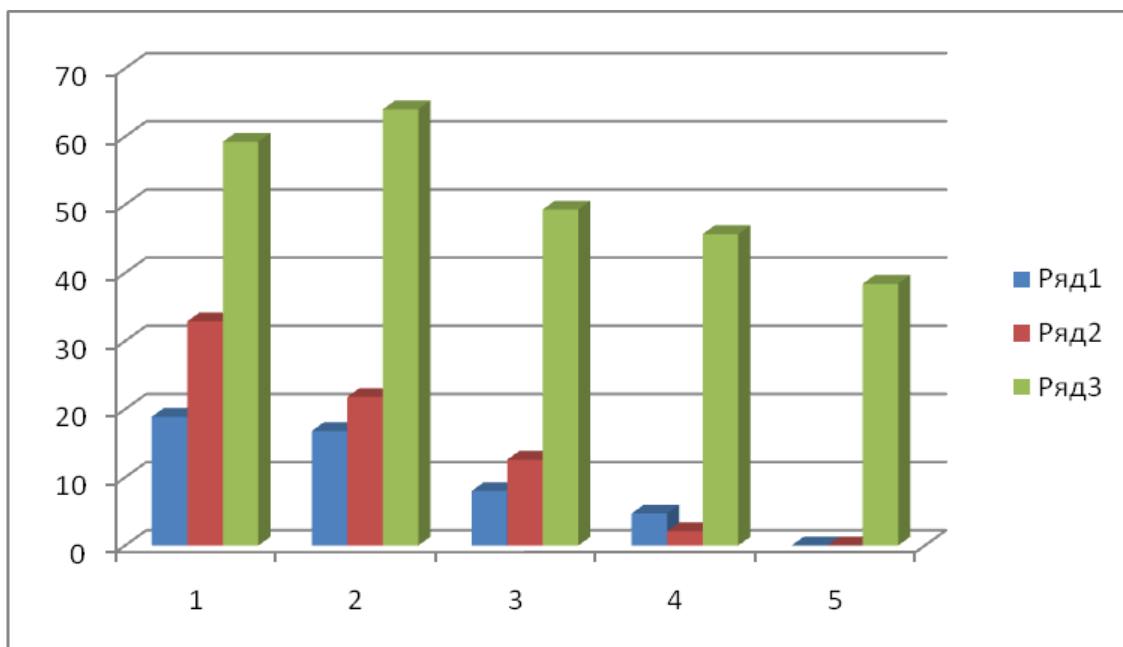


Рисунок 1 – Степень оплодотворения и развития эмбрионов от числа морфологически полноценных ооцитов. (Синий - Дюльбекко, красный - ФЖ, зеленый - IVF-Universal)

1-й столбик – обнаружено пронуклеусов

2-й столбик – 2-х бластомерные

3-й столбик – 4,6-ти бластомерные

4-й столбик – 16,32-х бластомерные

5-й столбик – морулы и бластоцисты

При культивировании дальнейшее дробление до 4, 6-ти бластомеров продолжили 8 %, 12,6 % и 49,3 % от общего числа ооцитов. Все эти данные показывают о том, что использование в работах среды IVF-Universal намного эффективнее и превышают показатели других систем при созревании и оплодотворении ооцитов, а также при культивировании эмбрионов в среднем в десять раз.

Также следует отметить, что при культивировании эмбрионов наблюдалось асинхронное развитие эмбрионов, который по данным ряда авторов характерно даже в естественных условиях развития. Наличие эмбрионов на стадии морулы и 16-ти клеток при одинаковом времени и условии оплодотворения и культивирования. Асинхронность развития эмбрионов в

культуре обычно связывают с гетерогенностью созревания ооцитов и в последующем различиями во времени проникновения сперматозоидов в ооциты.

Заключение. После проведения эксперимента по культивированию «in vitro» и экстракорпоральному оплодотворению фолликулярных ооцитов крупного рогатого скота выделенных из фолликулов яичника убойных коров и телок случного возраста получены результаты, которые указывают, что основным условием созревания и соответственно последующего развития эмбрионов является культуральная система.

При экстракорпоральном культивировании и оплодотворении фолликулярных ооцитов коров в различных культуральных системах в сравнительном аспекте было установлено, что наибольший процент созревания, оплодотворения и дальнейшего развития эмбрионов наблюдается в синтетической среде IVF- Universal, 64% против 16,8% и 21,8%, а развитие эмбрионов до поздних стадий составил 35,3%, тогда как в двух других использованных культуральных средах не было обнаружено ни одного эмбриона.

Исходя из вышеизложенного можно прийти к выводу, что эмбрионы, полученные на основе экстракорпорального оплодотворения можно использовать в экспериментальных работах клеточной биотехнологии.

Благодарности. Финансирование данного исследования проводилось за счет Агрохолдинга «Байсерке-Агро». Хочу выразить особую признательность и огромную благодарность своему наставнику и другу Баймуканову Дастанбеку Асылбековичу за бесценную помощь в процессе научных исследований. Также я крайне признателен коллективу авторов данной работы, в особенности Каргаевой Макпал Темирхановне за совместную научно-исследовательскую работу, так как она является лучшим специалистом в области животноводства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Mohamed, S. Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction, [Text]/ S. Mohamed // Journal of Advanced Research, 10.1016/j.jare.2010.03.003, 1, 2, (123-128), (2010).

2 Bols, PE. Puncture of immature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. [Text]/ PE. Bols // Verh K Acad Geneesk Belg. 2005;67(3):177-202. PMID: 16089298.

3 Bols, P.E.J., Stout, T.A.E. (2018). Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in Cows and Mares. In: Niemann, H., Wrenzycki, C. (eds) Animal Biotechnology 1. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_10.

4 Hansen, PJ. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? [Text]/ PJ. Hansen // J Anim Sci. 2020 Nov 1;98(11):skaa288. doi: 10.1093/jas/skaa288. PMID: 33141879; PMCID: PMC7608916.

5 Kassens, A. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and In Vitro-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. B. Reprod, PJ.Hansen [Text]/ A. Kassens// 2015 Jun;92(6):150. doi: 10.1095/biolreprod.114.124883. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25926438.

6 Ризос, Д. Последствия созревания ооцитов крупного рогатого скота, оплодотворения или раннего развития эмбрионов in vitro по сравнению с in vivo: влияние на выход бластоцисты и качество бластоцисты [Текст]/ Д. Ризос // Мол. Репродукция. Дев. 61: 234 – 48.

7 Kate H. In Vitro maturation of oocytes [Text]/ H. Kate // British Medical Bulletin, Volume 56, Issue 3, 2000, Pages 588–602, <https://doi.org/10.1258/0007142001903391>.

8 Ashry M Application of embryo transfer using in vitro produced embryos: intrinsic factors affecting efficiency [Text]/ M. Ashry // Cattle Pract. 2015;23(Pt 1):1-8. Epub 2015 Jan 21. PMID: 33384478; PMCID: PMC7773171.

9 Alan, D. Butler, Invited review: Use of assisted reproduction techniques to accelerate genetic gain and increase value of beef production in dairy herds [Text]/ D. Alan // Journal of Dairy Science, Volume 104, Issue 12, 2021, Pages 12189-12206, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20281>.

10 Ickowicz, D. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases [Text]/ D. Ickowicz// Asian J Androl. 2012 Nov;14(6):816-21. doi: 10.1038/aja.2012.81. Epub 2012 Sep 24. PMID: 23001443; PMCID: PMC3720105.

- 11 Parrish, JJ. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin [Text]/ JJ. Parrish // *Theriogenology*. 2014 Jan 1;81(1):67-73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005. PMID: 24274411; PMCID: PMC3886814.
- 12 Усенбеков, Е.С. Трансвагинальная аспирация ооцитов у коров-доноров и их экстракорпоральное оплодотворение [Текст]/ Е.С. Усенбеков // XII международная научно-практическая конференция "аграрная наука - сельскому хозяйству" Барнаул, 07–08 февраля 2017 года // сборник статей: в 3 книгах. Том Книга 3. Алтайский государственный аграрный университет. 2017.
- 13 Сингина, Г.Н. "Получение эмбрионов in vitro методом межвидового оплодотворения яйцеклеток коров (*Bos taurus*) семенем зубра (*bison bonasus*) [Текст]/ Г.Н. Сингина // *Сельскохозяйственная биология*, vol. 51, no. 6, 2016, pp. 824-829.
- 14 Сингина, Г.Н. "Способность ооцитов коров к эмбриональному развитию при созревании в разных системах двухфазного культивирования" [Текст]/ Г.Н. Сингина, // *Сельскохозяйственная биология*, vol. 52, no. 4, 2017, pp. 776-784.
- 15 Толмачева, И.А. Биотехнология [Электронный ресурс]: учебное пособие [Текст] / И.А. Толмачева; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2022. – 4,26 Мб; 177 с.
- 16 Soto-Moreno, EJ. Serum supplementation during bovine embryo culture affects their development and proliferation through macroautophagy and endoplasmic reticulum stress regulation. [Text]/ EJ. Soto-Moreno // *PLoS One*. 2021 Dec 9;16(12):e0260123. doi: 10.1371/journal.pone.0260123. PMID: 34882691; PMCID: PMC8659681.
- 17 Thompson, JG. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. [Text]/ JG. Thompson, // *Theriogenology*. 1998 Apr 15;49(6):1239-49. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00071-5. PMID: 10732061.
- 18 Rorie, RW. In vitro development of bovine embryos as affected by different lots of bovine serum albumin and citrate. *Theriogenology*. 1994;42(3):397-403. doi: 10.1016/0093-691x(94)90678-c. PMID: 16727547.
- 19 Wang, JJ. Complete in vitro oogenesis: retrospects and prospects [Text]/ JJ. Wang // *Cell Death Differ*. 2017 Nov;24(11):1845-1852. doi: 10.1038/cdd.2017.134. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28841213; PMCID: PMC5635224.
- 20 Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. [Text]/ VR. Araújo *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Aug 13;12:78. doi: 10.1186/1477-7827-12-78. PMID: 25117631; PMCID: PMC4148547.

REFERENCES

- 1 Mohamed, S. Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction, [Text]/ S. Mohamed // *Journal of Advanced Research*, 10.1016/j.jare.2010.03.003, 1, 2, (123-128), (2010).
- 2 Bols, PE. Puncture of immature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. [Text]/ PE. Bols // *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2005;67(3):177-202. PMID: 16089298.
- 3 Bols, P.E.J., Stout, T.A.E. (2018). Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in Cows and Mares. In: Niemann, H., Wrenzycki, C. (eds) *Animal Biotechnology 1*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_10.
- 4 Hansen, PJ. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? [Text]/ PJ. Hansen // *J Anim Sci*. 2020 Nov 1;98(11):skaa288. doi: 10.1093/jas/skaa288. PMID: 33141879; PMCID: PMC7608916.
- 5 Kassens, A. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and In Vitro-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. B. *Reprod*, PJ.Hansen [Text]/ A. Kassens// 2015 Jun;92(6):150. doi: 10.1095/biolreprod.114.124883. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25926438.
- 6 Rizos, D. Posledstviya sozrevaniya oocitov krupnogo rogatogo skota, oplodotvoreniya ili rannego razvitiya embrionov in vitro po sravneniyu s in vivo: vliyanie na vyhod blastocisty i kachestvo blastocisty [Текст]/ D. Rizos // *Mol. Reprodukciya. Dev*. 61: 234 – 48.
- 7 Kate H. In Vitro maturation of oocytes [Text]/ H. Kate // *British Medical Bulletin*, Volume 56, Issue 3, 2000, Pages 588–602, <https://doi.org/10.1258/0007142001903391>.

8 Ashry M Application of embryo transfer using in vitro produced embryos: intrinsic factors affecting efficiency [Text]/ M. Ashry // Cattle Pract. 2015;23(Pt 1):1-8. Epub 2015 Jan 21. PMID: 33384478; PMCID: PMC7773171.

9 Alan, D. Butler, Invited review: Use of assisted reproduction techniques to accelerate genetic gain and increase value of beef production in dairy herds [Text]/ D. Alan // Journal of Dairy Science, Volume 104, Issue 12, 2021, Pages 12189-12206, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20281>.

10 Ickowicz, D. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases [Text]/ D. Ickowicz// Asian J Androl. 2012 Nov;14(6):816-21. doi: 10.1038/aja.2012.81. Epub 2012 Sep 24. PMID: 23001443; PMCID: PMC3720105.

11 Parrish, JJ. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin [Text]/ JJ. Parrish // Theriogenology. 2014 Jan 1;81(1):67-73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005. PMID: 24274411; PMCID: PMC3886814.

12 Usenbekov, E.S. Transvaginal'naya aspiraciya oocitov u korov-donorov i ih ekstrakorporal'noe oplodotvorenje [Tekst]/ E.S. Usenbekov // XII mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferenciya "agrar'naya nauka - sel'skomu hozyajstvu" Barnaul, 07–08 fevralya 2017 goda // sbornik statej: v 3 knigah. Tom Kniga 3. Altajskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet. 2017.

13 Singina, G.N. "Poluchenie embrionov in vitro metodom mezhhvidovogo oplodotvorenija jajcekletok korov (Bos taurus) semenem zubra (bison bonasus) [Tekst]/ G.N. Singina // Sel'skohozyajstvennaya biologiya, vol. 51, no. 6, 2016, pp. 824-829.

14 Singina, G.N. "Sposobnost' oocitov korov k embrional'nomu razvitiyu pri sozrevanii v raznyh sistemah dvuhfaznogo kul'tivirovaniya" [Tekst]/ G.N. Singina, // Sel'skohozyajstvennaya biologiya, vol. 52, no. 4, 2017, pp. 776-784.

15 Tolmacheva, I.A. Biotekhnologiya [Elektronnyj resurs]: uchebnoe posobie [Tekst] / I.A. Tolmacheva; Permskij gosudarstvennyj nacional'nyj issledovatel'skij universitet. – Elektronnye dannye. – Perm', 2022. – 4,26 Mb; 177 s.

16 Soto-Moreno, EJ. Serum supplementation during bovine embryo culture affects their development and proliferation through macroautophagy and endoplasmic reticulum stress regulation. [Text]/ EJ. Soto-Moreno // PLoS One. 2021 Dec 9;16(12):e0260123. doi: 10.1371/journal.pone.0260123. PMID: 34882691; PMCID: PMC8659681.

17 Thompson, JG. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. [Text]/ JG. Thompson, //Theriogenology. 1998 Apr 15;49(6):1239-49. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00071-5. PMID: 10732061.

18 Rorie, RW. In vitro development of bovine embryos as affected by different lots of bovine serum albumin and citrate. Theriogenology. 1994;42(3):397-403. doi: 10.1016/0093-691x(94)90678-c. PMID: 16727547.

19 Wang, JJ. Complete in vitro oogenesis: retrospects and prospects [Text]/ JJ. Wang // Cell Death Differ. 2017 Nov;24(11):1845-1852. doi: 10.1038/cdd.2017.134. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28841213; PMCID: PMC5635224.

20 Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. [Text]/ VR. Araújo Reprod Biol Endocrinol. 2014 Aug 13;12:78. doi: 10.1186/1477-7827-12-78. PMID: 25117631; PMCID: PMC4148547.

ТҮЙІН

Жұмыстың мақсаты фолликулярлық ооциттерді ұрықтандырудың тиімділігін анықтау және сүтті ірі қара малдың «in vitro» ұрықтандырылған эмбриондарын дамыту болды.

Зерттеу жұмысы биотехнологияда қабылданған тәжірибелік әдістемеге сәйкес Microsoft Excel бағдарламалық пакетінің көмегімен материалдарды өңдеу арқылы жүргізілді. Зертханалық жануарларға зерттеулер жүргізу үшін қолданылатын тәжірибелер мен әдістер эксперименттік және басқа да ғылыми мақсаттарда пайдаланылатын омыртқалы жануарларды қорғау туралы Еуропалық конвенцияда (Старсбург, 1987) бекітілген жануарларға эксперимент жүргізудің биологиялық қауіпсіздігі мен этикалық принциптерінің талаптарына сәйкес келеді.

Қазіргі уақытта алдыңғы қатарлы шет елдерде көптеген эмбриондарды алу әдісі ретінде гонадотропты препараттарды қолданбай ультрадыбыстық аппарат [1] және вакуумдық сорғы арқылы тірі донорлардан жұмыртқа алу әдісі кеңінен қолданылады, бұл оның кең таралғанын түсіндіреді. экстракорпоралды ұрықтандыру негізінде алынған қымбат емес эмбриондар нарығы [2, 3]. Құнды донорлық сиырлардан жыл бойына 15-20 күн сайын овуляцияға дейінгі фолликулалардан морфологиялық толық жұмыртқа алуға болады, бұл экономикалық

тиімділікті арттырады және өнімділігі жоғары асыл тұқымды малдардың көбеюін бірнеше есе тездетеді [4, 5]. Бірақ қазіргі кезеңде мал шаруашылығы тәжірибесінде және Қазақстан ғылымында бұл әдістер іс жүзінде пысықталмаған, бұл оның сұраныссыздығын түсіндіреді, осыған байланысты бұл бағытты дамыту және кеңінен тарату маңызды. бүгін.

Зерттеулер нәтижелері бойынша сиырлардың фолликулярлық ооциттерін *in vitro* ұрықтандыру кезінде әртүрлі мәдени жүйелерде салыстырмалы аспектіде ұрықтандырудың және эмбриондардың одан әрі дамуының ең жоғары пайызы синтетикалық сиырларда байқалатыны анықталды. IVF-эмбебап орта, 64% қарсы 16,8% және 21,8% және эмбриондардың кеш сатысына дейін дамуы 35,3% құрады, ал басқа екі қоректік ортада бірде-бір эмбрион анықталған жоқ.

УДК 638.12: 591.4
МРНТИ 68.39.43

DOI 10.52578/2305-9397-2024-2-2-200-208

Баймуканов Д. А., член-корреспондент Национальной академии наук Республики Казахстан, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0002-4684-7114>

ТОО «Научно-производственный центр животноводства и ветеринарии», 010000 (Z10P6B8), ул. Кенесары, 40, г. Астана, Республика Казахстан, dbaimukanov@mail.ru

Бисембаев А.Т., кандидат сельскохозяйственных наук, <https://orcid.org/0000-0001-8795-0700>

ТОО «Научно-производственный центр животноводства и ветеринарии», г.Астана, ул. Кенесары 40, г. Астана, Республика Казахстан, npczhiv@mail.ru

Скворцов А.И., кандидат сельскохозяйственных наук, <https://orcid.org/0000-0001-9357-8765>

Чувашский государственный аграрный университет, Чебоксары, 428003, г.Чебоксары, ул. К. Маркса, дом 29, Чувашская Республика, Россия, skvorcovaniv48@mail.ru

Семенов В.Г., доктор биологических наук, профессор, <https://orcid.org/0000-0002-0349-5825>, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, заведующий кафедрой морфологии, акушерства и терапии

Чувашский государственный аграрный университет, Чебоксары, 428003, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, дом 29, Чувашская Республика, Россия, semenov_v.g@list.ru

D.A. Baimukanov, Corresponding member of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Doctor of agricultural sciences, associate professor, the main author, <https://orcid.org/0000-0002-4684-7114>

«Scientific and Production Center of Animal husbandry and Veterinary Medicine» LLP, 40 Kenesary str., Astana, Republic of Kazakhstan, dbaimukanov@mail.ru

A.T. Bissembayev, Candidate of Agricultural Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-8795-0700>

«Scientific and Production Center of Animal husbandry and Veterinary Medicine» LLP, 40 Kenesary str., Astana, Republic of Kazakhstan, npczhiv@mail.ru

A.I. Skvortsov, Candidate of Agricultural Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-9357-8765> «Chuvash State Agrarian University», Cheboksary, 428003, Cheboksary, st. K. Marx, house 29, Chuvash Republic, Russia, skvorcovaniv48@mail.ru

V.G. Semenov, Doctor of Biological Sciences, professor, <https://orcid.org/0000-0002-0349-5825>, Honored Worker of Science of the Russian Federation, head of the Department of Morphology, Obstetrics and Therapy

Chuvash State Agrarian University, Cheboksary, 428003, Cheboksary, st. K. Marx, house 29, Chuvash Republic, Russia, semenov_v.g@list.ru

РАЗНООБРАЗИЕ ЦВЕТА ФАСЕТОЧНЫХ И ДОРСАЛЬНЫХ ГЛАЗ У ТРУТНЕЙ *APIS MELLIFERA*

VARIATION IN COLOR OF COMPOUND AND DORSAL EYES IN *APIS MELLIFERA* DRONES

Аннотация

В период сбора нектара и пыльцы пчелы являются одной из первых наиболее уязвимых мишеней из компонентов биоценозов при поступлении в них ксенобиотиков (пестициды,