

ЖИВЁЛАГАДОЎЛЯ І ВЕТЭРЫНАРНАЯ МЕДЫЦЫНА

ANIMAL HUSBANDRY AND VETERINARY MEDICINE

УДК 636.22/.28.082.4(476)
<https://doi.org/10.29235/1817-7204-2019-57-2-192-203>

Поступила в редакцию 17.01.2019
Received 17.01.2019

В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко

Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, Беларусь

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВОСПРОИЗВОДСТВЕ И СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Аннотация: Сегодня технология *in vitro* – один из наиболее динамично развивающихся и занимающих все более прочное положение биотехнологических методов, способствующих ускорению темпов селекции, интенсификации использования репродуктивного и генетического потенциала племенных животных, позволяющего повысить выход племенного молодняка от одной коровы-рекордистки до 5–10 телят в год, сократить генерационный интервал и значительно ускорить процесс обновления и качественного улучшения стада. Однако получение компетентных к развитию в культуре *in vitro* ооцитов является одним из критических факторов, обуславливающих успех метода; они зависят от целого ряда причин биологического и технического характера. В настоящей работе представлены впервые проведенные в Республике Беларусь результаты исследований по изучению воздействия биологических факторов прямого и опосредованного влияния на эффективность получения ооцитов в системе трансвагинальной аспирации. Выход ооцитов отличного и хорошего качества повышался при аспирации в лютеиновую фазу полового цикла и оставался практически без изменений при проведении аспираций в фолликулярную фазу. Наличие в яичниках на момент аспирации фолликулов диаметром свыше 8 мм снижало выход ооцитов отличного и хорошего качества в среднем на 9,4 п.п. Удаление доминантного фолликула за 72 ч до начала аспирации позволило увеличить количество аспирированных фолликулов на 41 %, а выход ооцитов – на 22,9 %. Микростимуляция яичников перед аспирацией фолликуло-стимулирующим гормонами ФСГ-супер и Плюсет повышала эффективность аспирации по основным показателям на 19,2–45,9 %. Наличие в одном из яичников фолликулярной кисты либо персистентного желтого тела снижало как количественные, так и качественные показатели аспирации. Полученные данные имеют практическую значимость для разработки технологии получения эмбрионов *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов, использование которой будет способствовать ускорению селекционного процесса и повышению эффективности селекционно-племенной работы в скотоводстве в целом. **Благодарности.** Исследования проведены в рамках двух государственных программ научных исследований: «Биотехнология», подпрограмма «Развитие биологической науки, биологического образования и биологической промышленности на 2007–2011 годы и на период до 2020 года», «Научные технологии и техника на 2016–2020 годы», подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии – 2020».

Ключевые слова: крупный рогатый скот, донор, ооцит, *in vitro*, трансвагинальная аспирация ооцитов (ТАО), фолликул, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), воспроизводство животных, генетический потенциал (эффект), персистентное желтое тело, фолликулярная киста, микростимуляция, трансплантация эмбрионов

Для цитирования: Пестис, В. К. Вспомогательные репродуктивные технологии в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2019. – Т. 57, №2. – С. 192–203. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2019-57-2-192-203>

V.K. Pestis, L.V. Golubets, A.S. Deshko

Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus

ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES IN CATTLE REPRODUCTION AND SELECTION

Abstract: *In vitro* technology is one of the most dynamically developing and more and more stable biotechnological methods today accelerating selection, intensifying reproductive and genetic potential of breeding animals, allowing to increase breeding young animals production by one champion cow up to 5–10 calves per year, reduce generation interval and

significantly accelerate process of updating and qualitative improvement of livestock. However, obtaining oocytes competent for in vitro development is one of the critical factors determining success of the method and depending on a number of biological and technical factors. This paper presents results of studies on effect of biological factors of direct and indirect impact on efficiency of obtaining oocytes in the system of transvaginal aspiration for the first time conducted in the Republic of Belarus. Yield of excellent and good quality oocytes increased during aspiration during the luteal phase of estrous cycle and remained almost unchanged during aspiration into the follicular phase. Presence of follicles with diameter over 8 mm in the ovaries during aspiration reduced yield of excellent and good quality oocytes averagely by 9.4 percentage points. Removing the dominant follicle 72 hours prior to aspiration allowed increasing the number of aspirated follicles by 41 %, and yield of oocytes – by 22.9 %. Microstimulation of ovaries prior to aspiration by follicle-stimulating hormones FSG-super and Plusset increased efficiency of aspiration in terms of the main indicators by 19.2–45.9 %. Follicular cyst or persistent corpus luteum in one of the ovaries reduced both quantitative and qualitative indicators of aspiration. The data obtained are of practical importance for development of technology for in vitro embryo production in the system of transvaginal aspiration of oocytes which will help to accelerate breeding process and increase efficiency of breeding work in livestock production in general. **Acknowledgments.** The research was conducted within the two state research programs: “Biotechnology”, subprogram “Development of biological science, biological education and biological industry for 2007–2011 and for the period up to 2020”, “High technologies and equipment for 2016-2020”, subprogram 1 “Innovative biotechnologies–2020”.

Keywords: cattle, donor, oocyte, in vitro, transvaginal oocyte aspiration (TOA), follicle, in vitro fertilization (IVF), animal reproduction, genetic potential (effect), persistent corpus luteum, follicular cyst, microstimulation, embryo transplantation

For citation: Pestis V. K., Golubets L. V., Dshko A. S. Assisted reproductive technologies in cattle reproduction and selection. *Vesti Natsyonal'nyay akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2019, vol. 57, no 2, pp. 192–203 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2019-57-2-192-203>

Введение. С разработкой технологии искусственного осеменения, позволившей получать от одного производителя десятки тысяч потомков, роль быков в совершенствовании стада резко возросла, при этом роль маток осталась на прежнем уровне. В условиях промышленной технологии за всю продуктивную жизнь каждая из них может произвести от 3 до 6 телят, в то время как в яичниках коров насчитывается десятки тысяч потенциальных яйцеклеток.

Использование новейших достижений в биологии размножения крупного рогатого скота воплотилось в такую передовую технологию ускоренного воспроизводства животных, как трансплантация эмбрионов – она позволяет повысить выход племенного молодняка от одной коровы до 5–10 телят в год, сократить генерационный интервал и значительно ускорить процесс качественного улучшения популяции крупного рогатого скота. Сегодня более 95 % быков-производителей, используемых для искусственного осеменения в странах с развитым животноводством, таких как Северная Америка и Западная Европа, получают методом трансплантации эмбрионов [1].

Маточное поголовье через своих сыновей оказывает значительное влияние на крупные популяции скота, однако, при искусственном осеменении 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.

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 увеличиться в 9 раз.

В последнее время открылись новые возможности интенсификации процессов воспроизведения высокоценных генотипов животных. Так, в результате научного поиска было установлено, что ооциты, извлеченные из фолликулов, при создании соответствующих условий способны возобновлять мейоз и созревать до стадии оплодотворения. Оплодотворение созревших вне организма яйцеклеток позволят получать эмбрионы на нужных стадиях развития, а их пересадка реципиентам – возможность получать племенной молодняк [1–3].

Выполняя ту же самую роль, что и традиционная технология трансплантации эмбрионов, технология получения эмбрионов в культуре *in vitro* имеет целый ряд преимуществ. В первую очередь она не требует гормональной обработки и не удлиняет сервис-период, а использование метода трансвагинальной аспирации ооцитов (ТАО), по международной классификации Ovum Pick-up (OPU), позволяет получать эмбрионы без гормонального вмешательства независимо от полового цикла до двух раз в неделю без ущерба для здоровья животного даже при 3-месячной его стельности. Извлекать ооциты можно у молодых животных, кроме этого ооциты можно получать из яичников после убоя животного. Все это открывает новые возможности для массового производства эмбрионов с целью быстрого и качественного обновления или создания нового племенного ядра или высокопродуктивного стада [2–5].

Технология *in vitro* позволяет получать фактически неограниченное количество ооцитов, оплодотворять их в культуре *in vitro* и в любой момент времени иметь необходимое количество эмбрионов на нужной стадии, что обуславливает незаменимую роль такой технологии в получении трансгенных животных-продуцентов, дешевых и экологически безопасных биологически активных веществ и различных лекарственных препаратов.

С внедрением данных биотехнологий в практику животноводства появилась возможность определения пола животного на ранних стадиях развития эмбриона, что очень важно в процессе селекции и разведении крупного рогатого скота. Кроме того, данные технологии создают более благоприятные условия для использования мировых генетических ресурсов путем импорта глубоко замороженных эмбрионов вместо закупок живого скота.

В отношении пользовательных животных трансплантация эмбрионов дает возможность получения до 40 % телят-двоен у мясного скота и производства необходимого поголовья мясного направления в стадах молочных коров.

При интенсивном использовании коров на крупных фермах 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 принести неоценимую пользу, так как позволяет от таких генетически ценных животных, сформированных в группу постоянных доноров, дополнительно получать племенную продукцию. При использовании таких коров до 4–5 раз в год можно иметь около 10–12 телят от одного животного [1, 6].

Несложные расчеты показывают, что отбор 50 таких коров и использование их только в качестве доноров позволяет ежегодно получать около 1000 полноценных эмбрионов, а при их 50%-ной приживляемости после пересадки от этой группы коров можно иметь 500 телят в год.

Установлено, что за очень короткий период времени при помощи метода трансплантации эмбрионов можно создать высокопродуктивное селекционное молочное стадо, а племпредприятия пополнить высококлассным ремонтным молодняком бычков. Животные, полученные биотехнологическим путем и имеющие общую наследственность (особенно монозиготные близнецы), представляют исключительную ценность, так как 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 [7–9].

Таким образом, к настоящему времени трансвагинальная аспирация ооцитов превратилась в хорошо зарекомендовавший себя метод получения высокоценного генетического материала в виде ооцитов и эмбрионов. Однако, несмотря на имеющиеся успехи и множество исследований, проведенных с целью повышения эффективности метода, количество получаемых ооцитов по-прежнему остается ограниченным и не превышает в среднем 5–7 на одну аспирацию, при этом значительное число клеток повреждается и теряется как в процессе самой аспирации, так и во время прохождения по системе «игла–трубка». Небольшое количество получаемых ооцитов (а иногда и единичные) оставляют открытыми для изучения многие вопросы, связанные с условиями их созревания, поскольку достоверно установлено, что культивирование ооцитов в группах проходит значительно эффективней, а выход эмбрионов на предимплантационных стадиях после оплодотворения достоверно выше. Поэтому исследования, направленные на повышение эффективности такого метода и его еще более широкого внедрения в производство, продолжают [1, 10–17].

Устаноўлена, што выкарыстанне тэхналогіі экстракорпоральнага апладотворення выключае гармональную апрацоўку жывотных, не парушае палавой цыкл донора, не павялічвае працягласць сервіс-перыода, скарачае затраты. Трансплантцыя атрыманых такім чынам эмбрыонаў дазваляе атрымліваць племенная моладзь для паставкі на элэверы і продажы племпрадпрыям. Такім чынам, пералічаныя вышэй біятэхналагічныя напраўленні інтэнсіфікацыі выкарыстання генетычнага рэсурса высокапрадуктыўнага скота, дапаўняючы і расшыраючы адзін аднаго, павінны стаць неад'емным звяном павышэння эфектыўнасці селекцыі, расшырэння магчымасцей выкарыстання рэпрадуктыўнага і генетычнага патэнцыяла не толькі быкоў-прадзвіцеляў, але і матэрнскага стада.

Савершэнстваванне схем індукцыі росту фолікулаў у яечніках у кароў-донораў усё часцей патрабуе зыскавання новых падходаў да вырашэння данай праблемы, паколькі не выключае абразавання ў яечніках фолікулярных і лютеіновых кіст, персідэнтнага жоўтага цела, што прыводзіць да парушэнняў гармональнага статусу кароў-донораў ооцытаў [16, 18–21].

Зарубежныя ўвучыя В. А. Foster, J. S. Merton, R. De Roover і R. S. Bisinotto [16, 22, 23] з мэтай атрымання максімальнага колькасця ооцыт-кумулюсных камплексаў выкарыстоўвалі дапаўняльную апрацоўку кароў-донораў фолікулаў стымулюючым гармонам у пачатку лютеіновай фазы палавога цыкла, што дазволіла стымуляваць развіццё паверхневых фолікулаў (антральных), даступных для пункцыі, і тым самым павысіць колькасць ізвлечаных ооцытаў на адно жывотнае – ад $4,0 \pm 0,5$ да $6,8 \pm 0,7$ (на адну працэдуру).

У другіх іследаваннях [24–28] было даказана, што суперстымуляцыя у кароў-донораў павялічвае выхад ооцыт-кумулюсных камплексаў, але па параўнанню з сазреваннем *in vivo* сазреванне *in vitro* дае толькі ўдвое менш бластоцыстаў пасля культывіравання *in vitro*. Быў выкарыстан пратокіл суперстымуляцыі чатырыма дозамі ФСГ і ін'екцыяй ЛГ за 6 ч да збору яйцэклэткаў (OPU), што дазволіла да 15–20 ОКК кампетэнтных для стандартнай працэдуры прадзвіцця эмбрыонаў *in vitro*.

Правадэнне далейшых навучных іследаванняў можа быць напраўлена на іслучэнне ўплыву фазы палавога цыкла, колькасця і памера фолікулаў у яечніку, кратнасці і частаты аспірацыі, удаалення дамінантнага фолікула, а такжэ ўплыву фолікулярнай кісты і персідэнтнага жоўтага цела на выхад і якасць ооцыт-кумулюсных камплексаў з мэтай болей глыбокага іх панаімання і тым самым павышэння эфектыўнасці тэхналогіі трансплантцыі эмбрыонаў крупнага рогатага скота.

Цэль настаячай рабаты – іслучэнне ўплыву біялагічных фактараў прамого ўплыву і апаередаванага ўплыву на эфектыўнасць атрымання ооцытаў у сістэме трансваінальнай аспірацыі ооцытаў.

Матэрыялы і мэтады іследавання. Іследавання па разрабаткэ мэтадаў впамагалельных рэпрадуктыўных тэхналогіяў правадзілі на базе біятэхналагічнага цэнтра па рэпрадукцыі сельскагаспадарствяных жывотных Гродненскага дасадарствянага аграрнага ўніверсітэта, а такжэ ў ўчэбна-практычэскаму цэнтру біятэхналогіяў ОАО «Почапава» Пінскага раёна Брэстскага абласці ў 2013–2018 гг.

У якасць донораў ооцыт-кумулюсных камплексаў (ОКК) выкарыстоўвалі кароў-донораў жывой масай 650–800 кг ў ўзраста 4–8 лет з удоем па наівысшэй лактатыі 10–13,5 тыс. кг молака жырнасцю 3,8 % і болей.

Пункцыю фолікулаў правадзілі з іслучаваннем ультразвуковай сістэмы Aloka SSD 500, ўключаючай у сабя ультразвуківаму сканер Aloka Prosound 2, ультразвуківаму іслучатэль з частотай 7,5 MHz, вакуумную пампу Craft suction unit, дэражатэль ультразвуківаму іслучатэля, іглы даўжыні 55 см і дыяметрам 17G (1,473 мм), 18 G (1,27 мм) і 20G (0,91 мм). У якасць прамывнаму жідкасці іслучавалі фосфатна-салаваму буфер Дюльбекка з давааленнем 100 ад/мл гентаміцына і 1 % BSA. Локалізацыю ооцыт-кумулюсных камплексаў правадзілі з памагалельным эмбрыональнаму фільтра EMCON, паіск і ацэнку якасця атрыманых ооцытаў асащэствлялі паду мікраскапам Olympus пры 16- і 90-кратным павялічэннем саотвэтствянаму. Дазреванне ооцытаў, капацытатыя спермы, апладотворэнне і культывіраванне ранніх зародышэй праходзіла па раней разрабатаным намі мэтадыкам з некаторымі мадыфікацыямі. У якасць асноваму срады сазревання іслучавалі TCM-199 з давааленнем 10 мкг/мл ФСГ, 5 мкг/мл эстрадыола

и 5 мкг/мл ЛН, а также 5 % эстральной сыворотки. Капацитацию спермы проводили в среде SpermTalp, оплодотворение – в среде FertTalp. Совместное инкубирование продолжалось в течение 18–20 ч. Культивирование ранних зародышей проходило на монослое клеток кумулюса в течение 7–9 дней. Качество ооцит-кумулюсных комплексов оценивали по 4-балльной шкале, при этом основным критерием являлось наличие кумулюса и его качество: ооциты отличного качества имели более трех слоев кумулюса, хорошего – 2–3 слоя, удовлетворительного – 1 слой кумулюса или его фрагменты на отдельных участках зоны пеллюцида, неудовлетворительные ооциты – это ооциты без кумулюса.

Аспирацию проводили в такой последовательности: один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю после недельного перерыва, два раза в неделю после недельного перерыва, а также через 3 и 7 дней. В качестве фолликулостимулирующего гормона для микростимуляции яичников использовали ФСГ-супер в дозе 12,5, 25 и 50 арм.ед. и Плюсет в дозе 250, 500 и 1000 ИЕ. Удаление доминантного фолликула проводили за 72 ч до аспирации.

Материалы исследований обработаны статистически по стандартным методикам (по П. Ф. Рокитскому (1973) и Н. А. Плохинскому (1969)) на персональном компьютере с использованием пакета программ Microsoft Office Excel. Достоверность разницы определяли по критерию Стьюдента при трех уровнях значимости: $*P \leq 0,05$; $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$ ¹.

Результаты и их обсуждение. Известно что, фолликулярный эстрадиол вызывает лизис желтого тела. Следовательно, ожидается, что рост фолликулов и стероидогенез будет моделировать лютеиновую функцию и может быть использован в качестве антилютеолитической стратегии. Трансвагинальная аспирация ооцитов используется для извлечения ооцит-кумулюсных комплексов (ЭКО), а также для синхронизации фаз фолликулярных волн. Хотя предполагается, что аспирированные фолликулы подвергаются немедленной атрезии, однако существуют признаки того, что они могут оставаться активными. В результате наших исследований по изучению влияния фолликулярной фазы полового цикла на количество и качество полученных ОКК видно, что при аспирации ооцитов в фолликулярную фазу полового цикла извлекаемость клеток составила 73,7 %, выход клеток хорошего и отличного качества – 21,1 %. Всего выход пригодных для постановки на созревание ооцитов составил 87,3 %.

Следует отметить, что после трансвагинальной аспирации ооцитов часто остаются остаточные фолликулы (диаметром меньше 3 мм), которые выделяют стероидные гормоны.

Иные результаты исследований получены при аспирации ооцитов в лютеиновую фазу. Так, при использовании доноров в лютеиновую фазу (табл. 1) количество ооцитов отличного и хорошего качества увеличивалось по сравнению с контролем на 8,4 п.п. при уменьшении выхода удовлетворительных и условно-годных на 3,6 п.п., не пригодных для дальнейшей работы – на 3,7 п.п. Таким образом, фаза полового цикла оказывает влияние на эффективность аспирации ооцитов и их качество.

В каждый конкретный отрезок времени в яичниках находится определенный пул фолликулов. Анализ результатов исследований (табл. 2) показал, что количественные и качественные показатели находились примерно на одном и том же уровне независимо от количества фолликулов на яичнике в момент аспирации и колебались в следующих пределах: по выходу ооцитов – 76,8–83,9 %, а по выходу ооцитов отличного и хорошего качества – 19,2–25,2 %.

Т а б л и ц а 1. Эффективность аспирации ооцитов в лютеиновую фазу полового цикла, ОАО «Почапово», 2013–2015 гг., *n* (%)

T a b l e 1. Efficiency of oocyte aspiration in the luteal phase of estrous cycle, Pochapovo OJSC, 2013–2015, *n* (%)

Вариант опыта	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
		всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
Контрольная группа	103	90 (87,4)	29 (32,2)	45 (48,9)	74 (82,2)	16 (17,8)
Опытная группа, лютеиновая фаза	78	64 (82,0)	26 (40,6)	29 (45,3)	55 (85,9)	9 (14,1)

¹ Меркурьева Е. К. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных. – М. : Колос, 1970. – 424 с.

Таблица 2. Влияние количества фолликулов в яичнике на эффективность получения ооцитов и их качество, ОАО «Почапово», 2013–2015 гг., n (%)

Table 2. Effect of the number of follicles in the ovary on efficiency of oocyte production and quality, Pochapovo OJSC, 2013–2015, n (%)

Количество фолликулов на яичнике	Количество яичников	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
			всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
До 10	20	163	130 (79,7)	25 (19,2)	91 (70,0)	116 (89,2)	14 (10,8)
11–20	10	155	119 (76,8)	30 (25,2)	75 (63,0)	105 (88,2)	14 (11,8)
Более 20	10	243	204 (83,9)	47 (23,0)	140 (68,6)	187(91,7)	17 (8,3)

Как правило, находящиеся в яичниках фолликулы различаются между собой, так как находятся на разных стадиях созревания, поэтому крупные, доминирующие фолликулы тормозят и подавляют развитие остальных более мелких. Например, изучение влияния величины фолликулов на эффективность аспирации ооцитов (табл. 3) показало, что присутствие в яичниках фолликулов диаметром выше 8 мм снижает выход ооцитов отличного и хорошего качества на 4,3–19,4 п.п., увеличивая при этом выход клеток удовлетворительного качества и условно годных на 5,8–18,5 п.п.

Таблица 3. Влияние диаметра фолликулов на эффективность аспирации ооцитов, Гродненский государственный аграрный университет, 2013–2018 гг., n (%)

Table 3. Effect of follicle diameter on oocyte aspiration efficiency, Grodno State Agrarian University, 2013–2018, n (%)

Диаметр фолликулов	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
		всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
До 3,0 мм	153	107 (69,9)	31 (34,4)	58 (54,2)	89 (83,2)	18 (16,8)
3,1–6,0 мм	123	99 (80,5)	49 (49,5)	40 (40,4)	89 (89,9)	10 (10,1)
6,1–8,0 мм	112	90 (80,3)	37 (41,1)	42 (46,7)	79 (87,8)	11 (12,2)
Более 8 мм	87	73 (83,9)	22 (30,1)	43 (58,9)	65 (89,0)	8 (10,9)

Также установлено, что удаление доминантного фолликула инициирует начало новой фолликулярной волны и способствует росту новой популяции фолликулов. Анализ результатов, полученных при изучении влияния удаления доминантного фолликула (табл. 4), показывает, что данная процедура, проведенная за 72 ч до начала аспирации, позволила увеличить в расчете на одну аспирацию по сравнению с контролем количество аспирированных фолликулов на 41 %, выход ооцитов – на 22, %, в том числе ооцитов, пригодных для культивирования – на 30,8 %, из них отличного и хорошего качества практически в два раза.

Таблица 4. Эффективность аспирации ооцитов при удалении доминантного фолликула, ОАО «Почапово», 2016–2017 гг., n (%)

Table 4. Efficiency of oocyte aspiration during removal of dominant follicle, Pochapovo OJSC, 2016–2017, n (%)

Вариант опыта, показатель	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
		всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
Опытная группа	103	71 (68,9)	30 (42,2)	31 (43,7)	61(85,9)	8 (11,3)
В т.ч. на аспирацию	8,6±2,3	5,9±2,77	2,5±1,93	2,6±1,88	5,1±2,84	0,7±0,65
Контрольная группа	86	67 (77,9)	19 (28,3)	36 (53,7)	55 (82,1)	12–17,9
В т.ч. на аспирацию	6,1±1,61	4,8±1,19	1,3±0,56	2,6±1,01	3,9±1,32	0,9±0,54

В результате наших исследований также установлено, что удаление фолликулов диаметром свыше 6 мм заметного влияния на эффективность аспирации не оказало (табл. 5). Все показатели опытной группы (как количественные, так и качественные) практически не отличались от показателей контрольной группы. Так, уровень извлекаемости ооцитов составлял 85,1 и 84,7 %, выход эмбрионов, пригодных для постановки на дозревание, – 76,4 и 74,5 %, в том числе отличного и хорошего качества – 24,5 и 23,4 % в опытной и контрольной группах соответственно.

Т а б л и ц а 5. Эффективность аспирации в связи с удалением фолликулов диаметром свыше 6 мм, ОАО «Почапово», 2016–2017 гг., *n* (%)

Table 5. Aspiration efficiency related to removal of follicles over 6 mm in diameter, Pochapovo OJSC, 2016–2017, *n* (%)

Вариант опыта	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
		всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
Опытная группа	249	212 (85,1)	52 (24,5)	110 (51,9)	162 (76,4)	50 (23,6)
Контрольная группа	333	282 (84,7)	66 (23,4)	144 (51,1)	210 (74,5)	72 (25,5)

Известно, что режим использования доноров является одним из факторов, способных повлиять на эффективность аспираций. Анализируя данные, представленные в табл. 6, можно сделать вывод, что по уровню извлечения более эффективным оказался режим использования доноров с частотой два раза в неделю.

Т а б л и ц а 6. Влияние кратности аспираций на их эффективность, ОАО «Почапово», 2013–2018 гг., *n* (%)

Table 6. Effect of aspiration rate on their efficiency, Pochapovo OJSC, 2013–2017, *n* (%)

Кратность аспираций	Количество аспираций	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
			всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
1 раз в неделю	8	311	233 (74,9)	75 (24,1)	105 (33,7)	180 (57,9)	53 (17,0)
2 раза в неделю	8	310	252 (81,3)	59 (19,0)	139 (44,8)	198 (63,9)	54 (17,4)
1 раз через неделю	8	287	212 (73,9)	60 (20,9)	120 (41,8)	180 (62,7)	32 (11,1)
2 раза в неделю через неделю	8	284	223 (78,5)	52 (18,3)	109 (38,4)	161 (56,7)	62 (21,8)

Уровень извлекаемости ооцитов при этом составил 81,3 %, что на 2,8–81,3 п.п. выше по сравнению с другими режимами. В то же время наибольшее количество ооцитов отличного и хорошего качества было отмечено у группы животных, аспирация у которых проводилась раз в неделю – 24,1 % против 19,0 % при аспирации два раза в неделю, 20,9 % при аспирации один раз в неделю с интервалом через неделю и против 18,3 % при аспирации два раза в неделю с интервалом через неделю.

С целью изучения влияния частоты аспираций на их качество процедуру проводили каждые 3 или 7 дней по 12 (26 гол.) и 16 (26 гол.) аспираций подряд соответственно (табл. 7).

Т а б л и ц а 7. Влияние частоты аспираций на их эффективность, ОАО «Почапово», 2013–2018 гг., *n* (%)

Table 7. Effect of aspiration frequency on their efficiency, Pochapovo OJSC, 2013–2018, *n* (%)

Частота аспираций	Количество аспираций	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
			всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
Через 7 дней	180	1214	1106 (91,1)	275 (24,9)	540 (48,8)	815 (73,7)	291 (26,3)
Через 3 дня	138	1003	814 (81,1)	239 (29,4)	385 (47,3)	624 (76,6)	190 (23,3)

Как показывает анализ данных, приведенных в табл. 7, уровень извлекаемости ооцитов с частотой извлечения каждые 7 дней снижался по сравнению с частотой извлечения в 3 дня на 10,0 п.п. Вместе с тем выход ооцитов отличного и хорошего качества увеличивался незначительно (на 4,5 п.п., так же как и выход пригодных клеток в целом, – на 2,9 п.п.) и находился в пределах погрешности.

По количеству извлеченных ооцитов 78 % животных показали более высокий результат через 7 дней, однако такое превосходство колебалось в зависимости от донора в пределах 2,3–35,6 п.п. По выходу ооцитов отличного и хорошего качества у 56,5 % доноров их количество снижалось при аспирации через 7 дней на 5,3–22,8 п.п., а у 30,4 % увеличивалось на 2,2–14,6 п.п., у 13,0 % животных этот показатель оставался на прежнем уровне.

Одним из наиболее спорных до настоящего времени остается вопрос стимуляции яичников перед аспирацией с целью увеличения количества фолликулов.

В своих опытах в качестве стимулятора мы использовали фолликулостимулирующий гормон ФСГ–Супер в количестве 12,5, 25,0 и 50,0 ед. Арморовского стандарта и Плюсет в дозе 250, 500 и 1000 ИЕ.

Как показали результаты исследований, стимуляция яичников гормоном ФСГ–Супер увеличивала количество аспирированных на донора фолликулов на 19,2–39,8 %, выход ооцитов на донора в целом – на 32,8–45,9 %, в том числе пригодных для постановки дозревания – на 39,6–43,7 %. Доза введенного препарата достоверного влияния на количественные и качественные показатели аспирации не оказала. Количество аспирированных на 1 донора фолликулов колебалось в пределах 9,3–10,9, количество полученных ооцитов – в пределах 8,1–8,9, в том числе пригодных для культивирования – в пределах 6,7–6,9.

Микростимуляция фолликулярного роста фолликулостимулирующим гормоном Плюсет позволила повысить в целом по сравнению с контролем в расчете на 1 донора количество аспирированных фолликулов на 35,9 %, выход ооцитов – на 35,3 %, в том числе пригодных – на 43,9 %. При анализе результатов микростимуляции в зависимости от дозы введенного гормона установлена более высокая ответная реакция яичников при использовании 1000 ИЕ Плюсет. При этом количество аспирированных фолликулов на 1 донора увеличивалось по сравнению с дозой 250 и 500 ИЕ на 59,7 и 21,6 %, выход ооцитов в целом на 1 донора – на 70,6 и 19,2 %, а выход ооцитов, пригодных для культивирования, – на 60,0 и 18,0 % соответственно.

Одним наиболее распространенных нарушений воспроизводительных функций у крупного рогатого скота является наличие в одном из яичников персистентного желтого тела (ПЖТ) и фолликулярной кисты блокирующих половой цикл животного, в связи с чем возникает закономерный вопрос о целесообразности использования таких животных в качестве доноров ооцитов.

Анализ результатов, полученных при аспирации ооцитов у доноров, имеющих в одном из яичников фолликулярную кисту (табл. 8), показал, что уровень извлекаемости ооцитов у доноров с данной патологией снижался по сравнению с контролем на 12,2 п.п., выход ооцитов отличного и хорошего качества – на 16,6 п.п., а выход непригодных клеток увеличивался на 23,7 п.п.

Т а б л и ц а 8. Влияние фолликулярной кисты на эффективность аспирации ооцитов, ОАО «Почапово», 2017–2018 гг., *n* (%)

Table 8. Effect of follicular cyst on oocyte aspiration efficiency, Pochapovo OJSC, 2017–2018, *n* (%)

Вариант опыта	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
		всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
Опытная группа	53	35 (66,0)	6 (17,1)	15 (42,8)	21 (60,0)	14 (40,0)
Контрольная группа	110	86 (78,2)	29 (33,7)	43 (50,0)	72 (83,7)	14 (16,3)

Результаты, полученные при аспирации ооцитов у животных с персистентным желтым телом, указали (табл. 9) на снижение количества аспирированных фолликулов с $8,4 \pm 2,17$ в контроле до $7,3 \pm 2,24$ в опыте (13,1 %), выход ооцитов в целом на донора – с $7,6 \pm 2,17$ до $5,6 \pm 1,77$ (26,6 %) и выход ооцитов на донора пригодных для постановки на дозревание – с $6,6 \pm 2,24$ до $4,5 \pm 1,57$ (31,8 %).

Т а б л и ц а 9. Влияние персистентного желтого тела на эффективность аспирации ооцитов, ОАО «Почапово», 2017–2018 гг., *n* (%)Table 9. Effect of persistent corpus luteum on oocyte aspiration efficiency, Pochapovo OJSC, 2017–2018, *n* (%)

Вариант опыта, показатель	Аспирировано фолликулов	Получено ооцитов				
		всего	отличных, хороших	удовлетворительных, условно-годных	всего пригодных	непригодных
Контрольная группа	118	106 (89,8)	32 (30,2)	60 (56,6)	92 (86,8)	14 (13,2)
В т.ч. на аспирацию	8,4±2,17	7,6±2,17	2,3±1,68	4,3±2,30	6,6±2,24	1,0±1,04
Опытная группа	80	62 (77,5)	14 (22,6)	36 (58,1)	50 (80,6)	12 (19,3)
В т.ч. на аспирацию	7,3±2,24	5,6±1,77	1,3±0,75	3,3±1,27	4,5±1,57	1,1±0,54

Однако учитывая тот факт, что в качестве доноров используются высококлассные животные, наличие кисты или персистентного желтого тела не может служить критерием выбраковки животного из числа доноров. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что от таких животных всегда есть шанс получить жизнеспособные клетки, а следовательно, и эмбрионы.

Заключение. Таким образом, по результатам исследований не установлено достоверных различий по влиянию кратности использования доноров и частоты аспираций, а также количества фолликулов в яичнике на эффективность аспирации ооцитов. Выход ооцитов отличного и хорошего качества повышался при аспирации в лютеиновую фазу полового цикла по сравнению с контролем на 8,4 п.п. и оставался практически без изменений при проведении аспираций в фолликулярную фазу. Наличие в яичниках на момент аспирации фолликулов диаметром свыше 8 мм снижало выход ооцитов отличного и хорошего качества в среднем на 9,4 п.п. Удаление доминантного фолликула за 72 ч до начала аспирации позволило увеличить количество аспирированных фолликулов – на 41 %, выход ооцитов – на 22,9 %, в том числе ооцитов, пригодных для культивирования – на 30,8 %, из них отличного и хорошего качества практически в два раза. Общие результаты показывают, что микростимуляция яичников перед аспирацией фолликулостимулирующими гормонами ФСГ-супер и Плюсет не оказывает негативного влияния на компетентность яйцеклеток, но повышала эффективность аспирации по основным показателям на 19,2–45,9 %. Наличие в одном из яичников фолликулярной кисты снижало как количественные, так и качественные показатели аспирации на 12,2–23,7 п.п., персистентного желтого тела – на 13,1–31,8 %.

Полученные данные имеют практическую значимость для разработки технологии получения эмбрионов *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов, использование которой будет способствовать ускорению селекционного процесса и повышению эффективности селекционно-племенной работы в скотоводстве в целом.

Благодарности. Исследования проведены в рамках двух государственных программ научных исследований: «Биотехнология», подпрограмма «Развитие биологической науки, биологического образования и биологической промышленности на 2007–2011 годы и на период до 2020 года», «Наукоёмкие технологии и техника на 2016–2020 годы», подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии–2020».

Список использованных источников

1. Boni, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 year retrospective analysis / R. Boni // Animal Reprod. Science. – 2012. – Vol. 9, N 3. – P. 362–369.
2. Эффективность получения ооцитов методом трансвагинальной аспирации у коров-доноров / В.К. Пестис [и др.] // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. / Гродн. гос. аграр. ун-т. – Гродно, 2014. – Т. 26 : Зоотехния. – С. 218–225.
3. Использование биотехнологических методов в решении современных проблем репродукции сельскохозяйственных животных, как стратегия инновационного развития животноводства в Республике Беларусь / Л.В. Голубец [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : материалы XV Междунар. науч.-практ. конф. / Белорус. гос. с.-х. акад. ; ред.: А.П. Курдеко [и др.]. – Горки, 2012. – С. 321–326.
4. Первый опыт получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов (ТАО) / В.К. Пестис [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2015. – № 1. – С. 86–91.

5. Получение ооцитов коров путем трансвагинальной пункции фолликулов / В.К. Пестис [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, №1. – С. 123–128.
6. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production / R. De Roover [et al.] // *Reprod. in Domestic Animals*. – 2008. – Vol. 43, iss. 2. – P. 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x>
7. Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos / L.J. Ding [et al.] // *Molecular Reprod. a. Development*. – 2008. – Vol. 75, iss. 12. – P. 1710–1715. <https://doi.org/10.1002/mrd.20922>
8. *Cebrian-Serrano, A.* Beneficial effect of two culture systems with small groups of embryos on the development and quality of in vitro-produced bovine embryos / A. Cebrian-Serrano, I. Salvador, M. A. Silvestre // *Anatomia, Histologia, Embryologia*. – 2014. – Vol. 43, N 1. – P. 22–30. <https://doi.org/10.1111/ahe.12043>
9. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors / J.H. F. Pontes [et al.] // *Theriogenology*. – 2011. – Vol. 75, iss. 9. – P. 1640–1646. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>
10. Holding bovine oocytes in the absence of maturation inhibitors: kinetics of in vitro maturation and effect on blastocyst development after in vitro fertilization / H. Alm [et al.] // *Theriogenology*. – 2008. – Vol. 70, iss. 7. – P. 1024–1029. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.062>
11. *Bilodeau-Goeseels, S.* Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodi-esterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes / S. Bilodeau-Goeseels // *Molecular Reprod. a. Development*. – 2011. – Vol. 78, iss. 10/11. – P. 734–743. <https://doi.org/10.1002/mrd.21337>
12. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I / P. Lonergan [et al.] // *Molecular Reprod. a. Development*. – 2000. – Vol. 57, iss. 2. – P. 204–209. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2<204::aid-mrd12>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200010)57:2<204::aid-mrd12>3.0.co;2-n)
13. Nuclear maturation kinetics and in vitro embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine / P.R. Adona [et al.] // *Animal Reprod. Science*. – 2008. – Vol. 104, iss. 2–4. – P. 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.013>
14. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology / F.A. Ward [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 54, iss. 3. – P. 433–446. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00360-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00360-5)
15. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes / P. Bols [et al.] // *Theriogenology*. – 1996. – Vol. 45, iss. 5. – P. 1001–1014. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00028-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00028-3)
16. Luteal function and follicular growth following follicular aspiration during the peri-luteolysis period in *Bos indicus* and crossbred cattle / R. S. Bisinotto [et al.] // *Reprod. in Domestic Animals*. – 2012. – Vol. 47, iss. 2. – P. 319–327. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01875.x>
17. Occurrence and characteristics of residual follicles formed after transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in cattle / J.H. M. Viana [et al.] // *Theriogenology*. – 2013. – Vol. 79, iss. 2. – P. 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.015>
18. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up / J.H. Viana [et al.] // *Theriogenology*. – 2010. – Vol. 73, iss. 7. – P. 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.025>
19. Efficacy of induction of luteolysis in superovulated cows is dependent on time of prostaglandin F2alpha analog treatment: effects on plasma progesterone and luteinizing hormone profiles / J.H. M. Viana [et al.] // *Theriogenology*. – 2016. – Vol. 86, iss. 4. – P. 934–939. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.016>
20. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle / L.C. Smith [et al.] // *J. of Reprod. a. Fertility*. – 1996. – Vol. 106, iss. 2. – P. 193–199. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060193>
21. *Foster, B. A.* 15 the effect of different bovine oocyte recovery methods on oocyte ultrastructure pre- and post- in vitro maturation / B. A. Foster, E. J. Gutierrez, K. R. Bondioli // *Reprod., Fertility a. Development*. – 2018. – Vol. 31, N 1. – P. 133–134. <https://doi.org/10.1071/rdv31n1ab15>
22. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry / J.S. Merton [et al.] // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 59, iss. 2. – P. 651–674. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01246-3)
23. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows / R. De Roover [et al.] // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 63, iss. 7. – P. 1902–1913. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.011>
24. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes / P. Blondin [et al.] // *Biology of Reprod.* – 2002. – Vol. 66, iss. 1. – P. 38–43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.38>
25. *Liang, X. W.* Ovum pick-up in vivo and in-vitro embryo production in water buffaloes / X. W. Liang // *Chin. J. of Veterinary Science*. – 2008. – Vol. 28, iss. 10. – P. 1229–1232.
26. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status / R. Vassena [et al.] // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 60, iss. 5. – P. 923–932. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00101-8)
27. Effect of follicular wave synchronization method on an ovum pick-up program / J.M. Garcia [et al.] // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53, iss. 1. – P. 354. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00253-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00253-8)
28. *Manik, R. S.* Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle / R. S. Manik, S. K. Singla, P. Palta // *Animal Reprod. Science*. – 2003. – Vol. 76, iss. 3–4. – P. 155–161. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(02\)00241-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00241-5)

References

1. Boni R. Ovum pick-up in cattle: a 25 year retrospective analysis. *Animal Reproduction Science*, 2012, vol. 9, no. 3, pp. 362–369.
2. Pestis V. K., Golubets L. V., Deshko A. S., Starovoitova M. P., Stetskevich E. K., Kyssa I. S., Yakubets Yu. A., Popov M. V. Efficiency of oocytes production by the method of transvaginal aspiration in donor cows. *Sel'skoe khozyaistvo – problemy i perspektivy: sbornik nauchnykh trudov. Vol. 26. Zootekhnika* [Agriculture – problems and prospects: a collection of scientific papers. Vol. 26. Zootechnics]. Grodno, 2014, pp. 218–225 (in Russian).
3. Golubets L. V., Deshko A. S., Starovoitova M. P., Stetskevich E. K. The use of biotechnological methods in solving modern problems of reproduction of farm animals as a strategy for the innovative development of animal husbandry in the Republic of Belarus. *Aktual'nye problemy intensivnogo razvitiya zhivotnovodstva: materialy XV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii* [Actual problems of intensive development of animal husbandry: proceedings of the XV International scientific and practical conference]. Gorki, 2012, pp. 321–326 (in Russian).
4. Pestis V. K., Golubets L. V., Deshko A. S., Kyssa I. S., Popov M. V., Yakubets Yu. A. The first experience of in vitro cattle embryo production in the system of transvaginal oocyte aspiration (toa). *Vestsi Natsyyanal'nay akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2015, no. 1, pp. 86–91 (in Russian).
5. Pestis V. K., Golubets L. V., Deshko A. S., Kyssa I. S., Popov M. V. Cow oocyte pick-up by the transvaginal puncture of follicles. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no. 1, pp. 123–128 (in Russian).
6. De Roover R., Feugang J. M., Bols P. E., Genicot G., Hanzen Ch. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, vol. 43, iss. 2, pp. 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x>
7. Ding L. J., Tian H.B., Wang J. J., Chen J., Sha H. Y., Chen J. Q., Cheng G. X. Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, vol. 75, iss. 12, pp. 1710–1715. <https://doi.org/10.1002/mrd.20922>
8. Cebrian-Serrano A., Salvador I., Silvestre M. A. Beneficial effect of two culture systems with small groups of embryos on the development and quality of in vitro-produced bovine embryos. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2014, vol. 43, no. 1, pp. 22–30. <https://doi.org/10.1111/ahc.12043>
9. Pontes J. H. F., Melo Sterza F. A., Basso A. C., Ferreira C. R., Sanches B. V., Rubin K. C., Seneda M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 2011, vol. 75, iss. 9, pp. 1640–1646. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>
10. Alm H., Choi Y. H., Love L., Heleil B., Torner H., Hinrichs K. Holding bovine oocytes in the absence of maturation inhibitors: kinetics of in vitro maturation and effect on blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*, 2008, vol. 70, iss. 7, pp. 1024–1029. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.062>
11. Bilodeau-Goeseels S. Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodi-esterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 2011, vol. 78, iss. 10/11, pp. 734–743. <https://doi.org/10.1002/mrd.21337>
12. Lonergan P., Dinnyes A., Fair T., Yang X., Boland M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, vol. 57, iss. 2, pp. 204–209. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2<204::aid-mrd12>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200010)57:2<204::aid-mrd12>3.0.co;2-n)
13. Adona P. R., Pires P. R., Quetglas M. D., Schwarz K. R., Leal C. L. Nuclear maturation kinetics and in vitro embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. *Animal Reproduction Science*, 2008, vol. 104, iss. 2–4, pp. 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.013>
14. Ward F. A., Lonergan P., Boland M. P., Enright B. P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, 2000, vol. 54, iss. 3, pp. 433–446. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00360-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00360-5)
15. Bols P., Van Soom A., Ysebaert M. T., Vandenhede J. M., de Kruif A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, 1996, vol. 45, iss. 5, pp. 1001–1014. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00028-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00028-3)
16. Bisinotto R. S., Ibiapina B. T., Pontes E. O., Bertan C. M., Satrapa R., Barros C. M., Binelli M. Luteal function and follicular growth following follicular aspiration during the peri-luteolysis period in *Bos indicus* and crossbred cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 2012, vol. 47, iss. 2, pp. 319–327. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01875.x>
17. Viana J. H. M., Dorea M. D., Siqueira L. G., Arashiro E. K., Camargo L. S., Fernandes C. A., Palhao M. P. Occurrence and characteristics of residual follicles formed after transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in cattle. *Theriogenology*, 2013, vol. 79, iss. 2, pp. 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.015>
18. Viana J. H., Palhao M. P., Siqueira L. G., Fonseca J. F., Camargo L. S. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, 2010, vol. 73, iss. 7, pp. 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.025>
19. Viana J. H. M., Vargas M. S. B., Siqueira L. G. B., Camargo L. S. A., Figueiredo A. C. S., Fernandes C. A. C., Palhao M. P. Efficacy of induction of luteolysis in superovulated cows is dependent on time of prostaglandin F2alpha analog treatment: effects on plasma progesterone and luteinizing hormone profiles. *Theriogenology*, 2016, vol. 86, iss. 4, pp. 934–939. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.016>
20. Smith L. C., Olivera-Angel M., Groome N. P., Bhatia B., Price C. A. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1996, vol. 106, iss. 2, pp. 193–199. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060193>

21. Foster B. A., Gutierrez E. J., Bondioli K. R. 15 the effect of different bovine oocyte recovery methods on oocyte ultrastructure pre- and post- in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, 2018, vol. 31, no. 1, pp. 133–134. <https://doi.org/10.1071/rdv31n1ab15>

22. Merton J. S., De Roos A. P., Mullaart E., De Ruigh L., Kaal L., Vos P. L., Dieleman S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 2003, vol. 59, iss. 2, pp. 651–674. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01246-3)

23. De Roover R., Bols P. E. J., Genicot G., Hanzen Ch. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. *Theriogenology*, 2005, vol. 63, iss. 7, pp. 1902–1913. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.011>

24. Blondin P., Bousquet D., Twagiramungu H., Barnes F., Sirard M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 2002, vol. 66, iss. 1, pp. 38–43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.38>

25. Liang X. W. Ovum pick-up in vivo and in-vitro embryo production in water buffaloes. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2008, vol. 28, iss. 10, pp. 1229–1232 (in Chinese).

26. Vassena R., Singh J., Adams P., Allodi S. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, 2003, vol. 60, iss. 5, pp. 923–932. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00101-8)

27. Garcia J. M., Puelker R. Z., Avelino K. B., Vantini R., Rodrigues C. F. M., Esper C. R. Effect of follicular wave synchronization method on an ovum pick-up program. *Theriogenology*, 2000, vol. 53, iss. 1, p. 354. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00253-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00253-8)

28. Manik R. S., Singla S. K., Palta P. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. *Animal Reproduction Science*, 2003, vol. 76, iss. 3–4, pp. 155–161. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(02\)00241-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00241-5)

Информация об авторах

Пестис Витольд Казимирович – член-корреспондент, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, ректор, Гродненский государственный аграрный университет (ул. Терешковой, 28, 230008, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: ggau@ggau.by

Голубец Леонид Викторович – доктор сельскохозяйственных наук, доцент, главный научный сотрудник, заведующий биотехнологическим центром по репродукции сельскохозяйственных животных, Гродненский государственный аграрный университет (ул. Терешковой, 28, 230008, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: ggaubio@mail.ru

Дешко Александр Станиславович – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, старший научный сотрудник биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных, Гродненский государственный аграрный университет (ул. Терешковой, 28, 230008, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: deshkoas@mail.ru

Information about authors

Pestis Vitold K. – Corresponding Member, D.Sc. (Agriculture), Professor. Grodno State Agrarian University (28 Tereshkovoi Str., Grodno 230008, Republic of Belarus). E-mail: ggau@ggau.by

Golubets Leonid V. – D.Sc. (Agriculture), Associate Professor. Grodno State Agrarian University (28 Tereshkovoi Str., Grodno 230008, Republic of Belarus). E-mail: ggaubio@mail.ru

Deshko Alexander S. – Ph.D. (Agricultural), Associate Professor. Grodno State Agrarian University (28 Tereshkovoi Str., Grodno 230008, Republic of Belarus). E-mail: deshkoas@mail.ru