

УДК: 636.1.082.4:576.371

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.328

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БИОХИМИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ И СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ И КРОВИ КОБЫЛ В ВЕСЕННЕМ ПЕРЕХОДНОМ ПЕРИОДЕ И В СЛУЧНОМ СЕЗОНЕ

Калашников В.В. – акад. РАН, д-р с.-х. наук, проф., научный руководитель (ORCID 0000-0001-9845-1691); Лебедева Л.Ф. * – д-р с.-х. наук, доц., зав. лаб. физиологии (ORCID 0000-0001-6960-5233); Солодова Е.В. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-3495-3478); Сакаев В.А. – мл. науч. сотр.; Бородкина Е.Ю. – канд. биол. наук, науч. сотр.; Дубровская А.Б. – канд. с.-х. наук, науч. сотр.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства»

*lebedeva-L18@yandex.ru

Ключевые слова: сыворотка крови, фолликулярная жидкость, ОПУ, биохимический анализ, стероидные гормоны, качество ооцитов.

Key words: blood serum, follicular fluid, OPU, biochemical analysis, steroid hormones, oocyte quality.

Финансирование: Материалы подготовлены в рамках конкурса Российского научного фонда 2022 года «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований отдельными научными группами» (Проект № 23-16-00226).

Поступила: 03.04.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025



РЕФЕРАТ

Фолликулярная жидкость (ФЖ) является естественной средой для созревания ооцитов и может быть использована для этих целей в условиях *in vitro*. Однако в связи с сезонностью размножения лошадей, часть фолликулов в весенний переходный период претерпевает лютеинизацию или регрессию, что при круглогодичном использовании кобыл в программах ВРТ может быть связано с качеством ооцитов. С целью поиска диагностических критериев отбора ФЖ для созревания *in vitro* и прогноза качества ооцитов кобыл проводили сравнение между биохимическим и гормональным составом ФЖ в весеннем переходном периоде (группа I, в т.ч. из нормальных (Ia) и лютеинизирующихся (Iб) фолликулов) и ФЖ из крупных эстральных фолликулов циклирующих кобыл в случном сезоне (группа II), а также в сыворотке крови (группа III). Анализ содержания биохимических компонентов и стероидных гормонов показал отсутствие количественных различий по большинству компонентов в подгруппах Ia и Ib, за исключением общего белка ($p=0,048$) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) ($p=0,013$). Достоверные различия в содержании сывороточного железа ($p=0,019$) и фосфора ($p=0,005$) были выявлены в ФЖ, полученной от кобыл в весенний переходный период и в сезон половой активности. Концентрация тестостерона, дигидротестостерона и прогестерона значительно (в 2-4 раза) увеличивалась в ФЖ эстральных фолликулов в

случном сезоне. Сделано заключение, что критерием выбора ФЖ для созревания ооцитов *in vitro* могут служить концентрации прогестерона, тестостерона и дигидротестостерона, с учётом содержания фосфора и сывороточного железа. Содержание прогестерона, дигидротестостерона, тестостерона должно быть не менее 100 нмоль/л, 1000 пг/мл, и 16 нмоль/л, а фосфора и сывороточного железа в пределах 0,74-1,1 и 46,4-57,0 ммоль/л, соответственно. Использование данных параметров ФЖ в качестве критериев позволит определить целесообразность её применения для созревания ооцитов *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в племенном коневодстве требует совершенствования сред для созревания ооцитов *in vitro*. Установлено, что лучшая компетентность для оплодотворения с помощью ЭКО и ИКСИ, а также дальнейшего развития эмбриона может быть достигнута повышением степени синхронности ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов в преовуляторной фолликулярной жидкости [1]. Поэтому исследование её состава в крупных фолликулах кобыл имеет важное значение для определения возможности использования ФЖ в качестве среды (или добавки к среде) для созревания ооцитов *in vitro*. Изучение концентрации внутрифолликулярных стероидов в естественных циклах позволит лучше понять изменения и патологические нарушения при экзогенной стимуляции развивающегося фолликула и ооцита.

Во время нормального фолликулогенеза состав фолликулярной жидкости динамически изменяется, так как клетки стенки фолликула реагируют на гонадотропные гормоны путем секреции стероидных гормонов, факторов роста и цитокинов, которые, в свою очередь, влияют на развитие и функционирование как соматических клеток, так и ооцита [2]. Многочисленные исследования фолликулярной жидкости у различных видов животных показали, что в созревании, оплодотворении яйцеклеток, пролиферации и дифференцировке гранулёзных клеток, последующей овуляции и лютеинизации участвуют внутрифолликулярные стероидные гормоны, такие как 17β эстрадиол (Е2), прогестерон (Р4), андростендион (А4), тестостерон (Т). Они связаны с метаболической активностью клеток яични-

ков и отражают физиологическое состояние фолликула [3].

Однако лошади – это сезонно-полициклические животные, у которых различают активную (овуляторную) половую фазу, зимний период полового покоя (анэструс) и две переходные фазы между ними – весенний и осенний переходные периоды (фолликулогенез без овуляции). Между тем современные вспомогательные репродуктивные технологии на кобылах предполагают круглогодичное их использование для пунктирования фолликулов и получения ооцитов для оплодотворения *in vitro*. Поскольку в переходные периоды развивающиеся фолликулы не достигают овуляции, и в дальнейшем, как правило, происходит их лютеинизация или регрессия, получение фолликулярной жидкости из таких фолликулов и использование в циклах ВРТ может негативно сказаться на уровне созревания ооцитов.

На протяжении среднего и позднего переходного периода происходит образование и развитие нескольких фолликулярных волн с 10-12 дневными промежутками. Самые большие фолликулы достигают диаметра 30 мм и более [4]. При этом концентрация эстрадиола на протяжении большей части всего переходного периода в периферической плазме остаётся низкой и поднимается всего за несколько дней до первой овуляции в году. Это связано с недостаточным количеством стероидобразующих ферментов в ткани фолликулов первой и второй волны. Хотя в переходный период фолликулы и достигают 30 мм в диаметре, растут они значительно медленнее овуляторных и являются менее васкуляризированными. Уровень лютеинизирующего гормона (ЛГ) остаётся низким на протяжении большей части переходного периода. Таким образом, разви-

тие фолликулов происходит в среде, богатой фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ), но бедной ЛГ. Это приводит к повторному развитию крупных ановуляторных стероидогенно некомпетентных фолликулов и обуславливает длительные беспорядочные периоды проявления охоты [5]. По мере приближения первой в году овуляции происходит снижение секреции ФСГ, вследствие увеличения выработки ингибирующих факторов (эстрадиола и ингибина) крупными фолликулами. Повышение концентраций плазменного и фолликулярного эстрадиола положительно влияет на стимуляцию секреции ЛГ. Однако исследования, проведенные на овариоэктомизированных и интактных кобылах, не подтвердили предположение, что подъём фолликулярных эстрогенов является стимулом для синтеза гипофизарного ЛГ [6].

Развитие фолликулов и овуляторные процессы у млекопитающих сопровождаются локальными биохимическими изменениями, которые происходят в результате существенных сдвигов в клеточном метаболизме. Изучение внутрифолликулярных изменений в ФЖ методом протонно-ядерно-магнитного резонанса (HNMR) показало, что содержание аланина и липопротеидов (группы СНЗ) снижалось в доминантных фолликулах по мере их роста, тогда как концентрации гормонов прогестерона и эстрадиола значительно возрастали. После инъекции гонадотропина для индукции овуляции, фолликулярное созревание характеризовалось уменьшением содержания гликоконъюгатов, триметиламинов и ацетата, также наблюдалось снижение концентрации эстрадиола и дальнейшее увеличение СНЗ-групп липопротеинов и прогестерона. Показана четкая корреляция между внутрифолликулярным содержанием аланина и эстрадиола, отмечена корреляция между прогестероном и гликоконъюгатами [7]. Было также продемонстрировано, что концентрация липопротеинов была выше в сыворотке крови, чем в фолликулярной жидкости [8].

Применение ФЖ для созревания

ооцитов в программах ВРТ предполагает определение её качества. Логично было бы заготавливать и использовать ФЖ из преовуляторного фолликула. Однако по размерам фолликула, его консистенции, особенно в весеннем переходном периоде, не всегда можно прогнозировать будущую овуляцию. Даже первая охота, при всех признаках эструса может закончиться лютеинизацией фолликула или его регрессией. Синдром лютеинизации неовулировавшего фолликула (ЛНФ-синдром) – это преждевременная лютеинизация предовуляторного фолликула без овуляции. При заборе ФЖ из таких фолликулов до начала процесса лютеинизации можно ошибиться в прогнозе ее качества для созревания ооцитов. Поэтому предварительное исследование биохимического и гормонального состава перед применением позволит принять правильное решение по использованию ФЖ кобыл в циклах ВРТ. Однако, определение содержания ФСГ и ЛГ, влияющих на созревание ооцита, в настоящее время в российских медицинских и ветеринарных лабораториях проблематично в связи с их видоспецифичностью. Самыми доступными методами и распространёнными видами исследований являются ИФА (иммуноферментный анализ) и ИХЛА (иммунохемилюминесцентный анализ).

С целью определения оптимальных характеристик ФЖ, предназначенной для созревания ооцитов *in vitro*, и поиска маркеров полноценности эстральных фолликулов в сезон половой цикличности мы поставили перед собой следующие задачи: сравнить значения биохимических компонентов и концентрацию стероидных гормонов в ФЖ из крупных (доминантных) фолликулов, в том числе лютеинизирующихся, в весеннем переходном периоде с соответствующими показателями ФЖ из крупных эстральных фолликулов в нормальных половых циклах кобыл в сезон размножения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследование содержания биохимических и гормональных компонентов ФЖ

проводилось от двух групп фолликулов, аспирированных из яичников кобыл в весенний переходный период (группа I) и в случном сезоне (группа II). Первая группа состояла из двух подгрупп: I а – крупные фолликулы без признаков лютеинизации (n=7); I б – крупные фолликулы с признаками лютеинизации (многочисленные экзогенные вкрапления внутри фолликула, обнаруживаемые во время УЗИ) (n=7). Группа II включала ФЖ из лидирующих фолликулов у нормально циклирующих кобыл в период естественного эструса без предварительных гормональных обработок (n=12). У всех кобыл с переходными фолликулами без признаков лютеинизации взять образцы крови не удалось, поэтому сравнение биохимического и гормонального состава крови было проведено только между Iб подгруппой и II группой.

Забор ФЖ проводили у 11 кобыл помесных верховых, тяжеловозных и вятской пород от 4 до 16 лет в весеннем переходном периоде и в период сезона половой цикличности. Все кобылы принадлежали экспериментальной конюшне ФГБНУ ВНИИ коневодства. Содержание и кормление животных соответствовало принятым зоотехническим и ветеринарным нормам. Развитие фолликулов контролировали с помощью УЗ-сканера Eхago (Франция). ФЖ извлекали из фолликулов диаметром ≥ 35 мм методом трансвагинальной аспирации фолликулярной жидкости под ультразвуковым контролем (OPU). Перед каждой процедурой проводили забор крови у кобыл из яремной вены, отстаивали в течение 30 минут и центрифугировали в режиме 3000 об/мин в течение 15 минут, после чего сыворотку замораживали.

Кобыл к процедуре OPU готовили с помощью седации детомидином гидрохлоридом (0,2 - 0,5 мг, внутривенно, три раза или более в течение процедуры, по мере необходимости) и ксилазина гидрохлорида (7-10 мл на животное). После первой инъекции домоседана проводили эпидуральную анестезию 2% лидокаином (7 мл). За 15 минут до начала процедуры

вводили флюнексин меглумин (300-500 мг). После процедуры - антибиотик ветбицин-3 (10 000 – 15 000 ЕД на 1 кг массы животного) и эмиданол 10% (5-10 мл) и этамзилат (125 мг/мл, 10-20 мл). Опыты с использованием экспериментальных животных (кобыл) были одобрены комиссией по этике, созданной при ФГБНУ ВНИИ коневодства (Протокол № 8-23 от 28.11.2023 г.).

ФЖ извлекали в процессе OPU с помощью вакуумной помпы COOK Medical K-MAR-5200. Фолликулы аспирировали, используя двухпросветные иглы 12G, которые вводили через специальный эндовагинальный зонд ультразвукового аппарата Eхago. ФЖ из каждого фолликула собирали в отдельный флакон объемом 50 мл через индивидуальную иглу с трубкой, после чего ФЖ центрифугировали в режиме 3000 об/мин в течение 20 минут, разделяли на аликвоты в пробирки эпиндорфа по 2-5 мл, замораживали и хранили при -20°C .

Биохимический анализ крови и фолликулярной жидкости проводили на биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+ (Производитель: Awareness technology). Исследования проводились с использованием оборудования ЦКП «Коллекция генетических ресурсов» ФГБНУ «ВНИИ коневодства».

Определение уровней гормонов в ФЖ и сыворотке крови проводили в лаборатории ООО «Центр Здоровья» с помощью автоматизированных иммунохимических анализаторов Immulite 2000XPr (компания Siemens) и Access 2 (компания Beckman Coulter). Определяли концентрацию прогестерона, тестостерона, эстрадиола. Анализ на дигидротестостерон (ДГТ) был выполнен ручным методом с помощью тест-системы для количественного определения дигидротестостерона в сыворотке методом твердофазного иммуноферментного анализа, основанном на принципе конкурентного связывания (производитель «ДРГ-техсистемс»). Результаты получали с помощью полуавтоматического ИФА анализатора «Мультискан» (производитель Thermo

Scientific).

Аналитическая чувствительность методов при определении составляла: прогестерона 0,3 nmol/l, тестостерона - 0,5 нмоль/л, эстрадиола - 55 пмоль/л; дигидротестостерона 6 пг/мл.

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы Statistica 12, с использованием критерия Манна-Уитни и коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Сравнение биохимических показателей ФЖ, полученной от кобыл в разные сезоны половой активности, показало наличие достоверных различий только по содержанию сывороточного железа и фосфора. Значительно и достоверно выше ($p \leq 0,001$) в фолликулярной жидкости эстральных фолликулов в период половой цикличности оказались уровни тестостерона, дигидротестостерона и прогестерона (Таблица 1).

Анализ содержания биохимических показателей в подгруппах Ia и Ib показал отсутствие количественных различий по большинству компонентов. Достоверные различия найдены только по содержанию общего белка и АЛТ, уменьшение концентрации которых в фолликулах, начавшихся лютеинизироваться, может говорить о снижении кровоснабжения такого фолликула и уменьшении проницаемости окружающих его сосудов. Это подтверждается достоверной разницей в содержании АЛТ в ФЖ подгруппы Ib и группы II (Таблица 2).

Тесная положительная корреляция содержания АЛТ в крови и ФЖ во II группе и отсутствие таковой в подгруппе Ib (Рис. 1) подтверждает данный вывод. Однако полученные показатели не могут служить критерием отнесения фолликулов к той или другой группе, так как они могут изменяться при различных патологических процессах в организме животного.

При сравнении Ia и Ib подгрупп со II группой ожидаемо оказалось, что наибольшие и достоверные различия наблюдаются в содержании стероидных

гормонов: тестостерона, дигидротестостерона и прогестерона, которых, в среднем, в 3,25; 1,9 и 4,1 раза, соответственно, больше в эстральных фолликулах II группы, чем первой. Кроме того, ФЖ лютеинизирующихся фолликулов (Ib подгруппа) содержит достоверно больше сывороточного железа и фосфора, меньше АЛТ и липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), чем ФЖ эстральных фолликулов циклирующих кобыл (II группа). Данные различия говорят о большей интенсивности процессов стероидогенеза в гранулёзных клетках стенки овуляторных фолликулов и большей их потребности в таких элементах, как фосфор и железо. Различия в содержании биохимических компонентов между не лютеинизирующимися крупными переходными фолликулами (Ia подгруппа) и крупными лидирующими фолликулами циклирующих кобыл (II группа) найдены только по фосфору и сывороточному железу, которых также меньше во II группе. Однако уровни достоверности достигает разница только по фосфору.

Выяснилось, что в связи с небольшой концентрацией прогестерона, тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови и ограниченным диапазоном их определения методами ИХЛА, определить коэффициенты корреляции между фолликулярной жидкостью и сывороткой крови невозможно. На диаграмме (рис. 1) представлены коэффициенты корреляции биохимических элементов между фолликулярной жидкостью и сывороткой крови в Ib подгруппе и II группе.

Достоверная, очень тесная связь обнаружена в сыворотке крови и ФЖ между 19 из 26 элементов II группы, и лишь между 6 из 26 элементов Ib подгруппы. Наши данные говорят о значительном различии в степени васкуляризации и проницаемости стенки овуляторного и лютеинизирующегося фолликула.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови в Ib подгруппе и II группе показал достоверные различия между калием, фосфором и уровнем аспартатаминотрансферазы (АСТ) (Таблица 3). Так,

в сыворотке крови кобыл с преовуляторным фолликулом в сезон нормальной половой цикличности наблюдается большее содержание калия и меньшее – фосфора и АСТ, чем у кобыл с лютеинизирующими фолликулами в переходный период. Однако в связи с отсутствием достоверной корреляции между концентрацией

калия в сыворотке крови и фолликулярной жидкости, а также высоким коэффициентом вариации уровня фосфора (более 26-27%) в крови судить о содержании данных элементов в фолликулярной жидкости по содержанию их в сыворотке крови не представляется возможным.

Таблица 1 – Значения биохимических и гормональных показателей фолликулярной жидкости, полученной из фолликулов кобыл в весенний переходный период (группа I) и в эстральной фазе нормального полового цикла (группа II)

Показатели	Ед.изм.	Группы фолликулов						p-value
		I			II			
		n	median	Lower - Upper Quartil	n	median	Lower -Upper Quartil	
Сыв.железо	ммоль/л	14	61,3	58,2-64,0	11	51,73	46,4-57,0	0,019*
Фосфор	ммоль/л	14	1,3	1,02-1,46	11	0,9	0,74-1,1	0,005*
Калий	ммоль/л	14	3,74	3,5-4,1	12	3,8	3,5-4,1	0,95
Кальций	ммоль/л	14	2,8	2,6-2,9	12	2,7	2,5-3,1	0,94
Натрий	ммоль/л	14	144,0	142,0-146,0	12	142	142-144	0,2
Магний	ммоль/л	13	0,8	0,77- 0,82	11	0,8	0,73-0,89	0,47
Глюкоза	ммоль/л	13	4,9	4,68-5,19	12	5,12	4,8-5,45	0,58
О.белок	г/л	14	51,5	49-56	12	53,5	47-58	0,86
Мочевина	ммоль/л	10	2,7	2,7-2,8	11	2,7	2,56-2,9	0,67
Моч.кислота	мкмоль/л	11	11,0	10,0-12,0	12	9	8-17,5	0,8
Креатинин	мкмоль/л	14	83,0	78,0-86,0	12	88,5	80-98,5	0,26
Альбумин	г/л	14	27,0	26,0-30,0	12	29,5	27-32,5	0,09
а-амилаза	Е/л	14	4,5	4-6,0	12	2	0-5	0,08
Холестерин	ммоль/л	14	1,25	1,09-1,5	12	1,25	1,06-1,52	0,9
Триглицериды	ммоль/л	13	0,1	0,03-0,16	11	0,07	0,03-0,15	0,66
ХС ЛПВП	ммоль/л	14	1,1	1,0-1,4	12	1,1	1,95-1,3	0,74
ХС ЛПНП	ммоль/л	14	0,06	0,01-0,16	11	0,17	0,06-0,29	0,05
АСТ	Е/л	11	260	210-280	11	190,0	160-270	0,1
КФК	Е/л	14	37	29-60	12	39	29-71	0,92
АЛТ	Е/л	14	5	4-8	12	6	6-7	0,18
ЛДГ	Е/л	14	458	353-530	12	377,5	300,5-553,0	0,38
ГГТП	Е/л	14	8,5	6,0-10,0	11	9	6-12	0,52
ЩФ	Е/л	14	122,5	114-158	12	137	118-161	0,64
Билирубин прям	мкмоль/л	14	2,1	2,01-3,12	12	2,2	2,12-4,2	0,17
Билирубин непр.	мкмоль/л	14	10,4	7,87-18,5	12	8,7	8,29-14,5	0,77
Эстрадиол	пмоль/л	15	14023,2	6897,7-18637,5	12	19856,8	16341,2-19856,8	0,06
Тестостерон	нмоль/л	13	21,15	0,81-6,83	12	18,5	16,5-23,8	0,0002*
Дигидротестостерон	пг/мл	15	945	602-1313	12	1805	1643,5-2194	0,001*
Прогестерон	нмоль/л	15	24,9	9,86-40,7	12	127	111,5-127	0,0001*

Примечание: * разность значений достоверна, при $p < 0,05$.

Таблица 2 – Биохимические и гормональные показатели в фолликулярной жидкости кобыл из трех групп фолликулов (≥ 35 мм), имеющие достоверные

Показатели	Ед.изм.	Группы фолликулов											
		I a ¹			p-value	I б ²			II ³			p-value	
		n	median	Lower - Upper Quartil		n	median	Lower - Upper Quartil	n	median	Lower - Upper Quartil		
О.белок	г/л	7	56	51-59	0,048*	7	50	48-53	53,5	12	0,52	0,33	
Сыв.железо	ммоль/л	7	60,8	52,7-62,7	0,37	7	61,99	58,8-72,2	51,7	11	0,1	0,03*	
Фосфор	ммоль/л	7	1,3	1,02-1,55	1,0	7	1,34	0,92-1,46	0,9	11	0,02*	0,02*	
АЛТ	Е/л	7	8	6-8	0,013*	7	4,0	4-5	6	11	0,25	0,0007*	
ХСЛПНП	ммоль/л	7	0,08	0,01-0,16	0,37	7	0,03	0,01-0,15	0,17	11	0,31	0,04*	
Тестостерон	нмоль/л	7	5,69	1,7-12,6	0,13	6	0,76	0,69-2,82	18,5	12	0,001*	0,004*	
ДГТ	пг/мл	7	945	602-1313	0,95	8	917,5	525-1435,5	1805	12	0,003*	0,015*	
Прогестерон	нмоль/л	7	30,8	14,5-52,2	0,18	8	15,7	8,7-28,6	127	12	0,006*	0,0003*	

Примечание: * разность значений достоверна, при $p < 0,05$, ¹ фолликулы в весенний переходный период без признаков лютеинизации; ² фолликулы в весенний переходный период с признаками лютеинизации; ³ фолликулы у нормально циклирующих

Таблица 3 – Значения биохимических показателей калия, фосфора и АСТ в сыворотке крови кобыл при наличии крупных фолликулов Iб подгруппы и II группы

Показатели	Ед.изм.	Группы фолликулов								p-value
		I б				II				
		Lower - Upper Quartil		n	Lower - Upper Quartil		n	Lower - Upper Quartil		
		median	Upper Quartil		median	Upper Quartil		median	Upper Quartil	
Калий	ммоль/л	7	2,95	2,84-3,33	12	3,47	3,16-3,67	0,038*		
Фосфор	ммоль/л	7	1,21	0,76-1,43	11	0,87	0,47-0,91	0,037*		
АСТ	Е/л	7	360	330-420	10	225	170-290	0,014*		

Примечание: * разность значений достоверна, при $p < 0,05$.

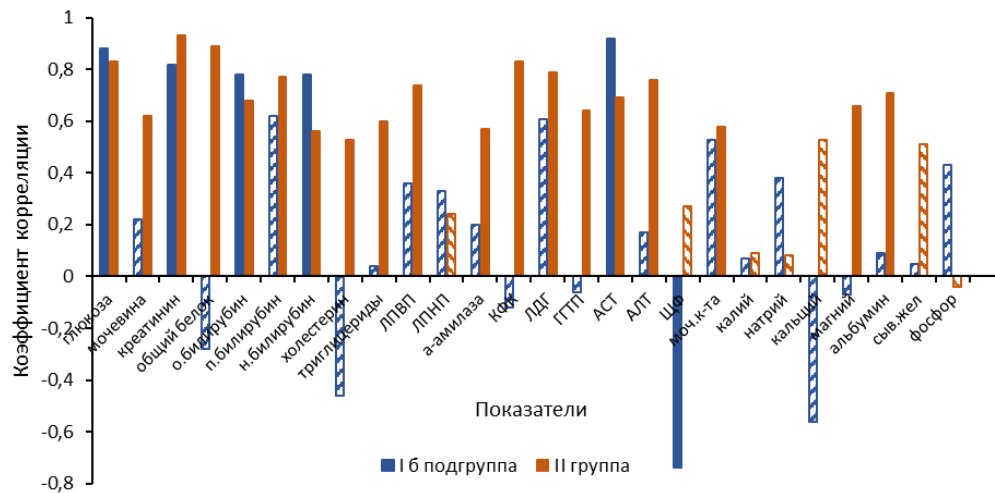


Рисунок 1 – Корреляция между компонентами фолликулярной жидкости и сыворотки крови кобыл в крупных фолликулах весеннего переходного периода с признаками лютеинизации (подгруппа Iб) и овуляторных фолликулах эстральной фазы нормального полового цикла (группа II); столбцы диаграммы со сплошной заливкой - $p < 0,05$.

Повышенный уровень внутриклеточного фермента АСТ в сыворотке крови у кобыл с фолликулами подгруппы Iб и его высокая очень тесная корреляция с содержанием в ФЖ может подтверждать повреждение и лизис клеток стенки лютеинизирующегося фолликула, однако, в связи с неспецифичностью этого фермента диагностическим критерием он являться не может.

Таким образом, наши исследования показали, что достоверные различия между двумя группами фолликулов наблюдаются в концентрации стероидных гормонов – тестостерона, прогестерона и дигидротестостерона. Следует подчеркнуть, что в данном исследовании анализировали ФЖ из фолликулов в естественном цикле, без использования гормональной обработки кобыл.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Критерием выбора фолликулярной жидкости для созревания ооцитов *in vitro* может служить комплекс показателей концентрации прогестерона, тестостерона и дигидротестостерона, с учётом содержания фосфора и сывороточного железа. Содержание прогестерона, дигидротестостерона,

тестостерона в ФЖ должно быть не менее 100 нмоль/л, 1000 пг/мл и 16 нмоль/л, а фосфора и сывороточного железа – в пределах 0,74-1,1 и 46,4-57,0 ммоль/л, соответственно. Данные параметры фолликулярной жидкости позволят определить целесообразность её использования для созревания ооцитов *in vitro*.

COMPARATIVE STUDY OF CONCENTRATION OF BIOCHEMICAL COMPONENTS AND STEROID HORMONES IN FOLLICULAR FLUID AND BLOOD OF MARES IN THE SPRING TRANSITIONAL PERIOD AND IN THE ROUTE SEASON

Kalashnikov V.V. – acad. RAS, Doctor of Agricultural Sciences, prof., Scientific director of the Federal State Institute (ORCID 0000-0001-9845-1691); **Lebedeva L.F.** * – Doctor. Agricultural Sciences, Associate Professor, Head. Of the lab. Physiology (ORCID 0000-0001-6960-5233); **Solodova E.V.** – Candidate of Biol. Sciences, scientific co-workers (ORCID 0000-0003-3495-3478); **Sakaev V.A.** – ml. scientific co-workers; **Borodkina E.Yu.** – Ph.D. biol. sciences, scientific co-workers; **Du-**

brovskaya A.B. – Ph.D. agricultural sciences, scientific co-workers

The All-Russian Research Institute for Horse breeding

*Lebedeva-L18@yandex.ru

Financing: *The materials were prepared within the framework of the 2022 competition of the Russian Science Foundation "Conducting fundamental scientific research and exploratory scientific research by individual scientific groups" (Project No. 23-16-00226).*

ABSTRACT

Follicular fluid (FF) is a natural environment for oocyte maturation and can be used for these purposes in vitro. However, due to the seasonality of equine breeding, some follicles undergo luteinization or regression during the spring transition period, which can be directly related to oocyte quality in year-round use of mares in ART programs. In order to find diagnostic criteria for selecting FF for in vitro maturation and predicting the quality of mares' oocytes, a comparison was made between the biochemical and hormonal composition of FF in the spring transition period (group I, including normal (Ia) and luteinizing (Ib) follicles) and FF from large estrous follicles of cycling mares in the breeding season (group II), as well as in the blood serum (group III). Analysis of the content of biochemical components and steroid hormones in the FF showed no quantitative differences in most components in subgroups Ia and Ib, except for total protein ($p=0.048$) and alanine aminotransferase (ALT) ($p=0.013$). Significant differences in the content of serum iron ($p=0.019$) and phosphorus ($p=0.005$) were found in the FF obtained from mares in the spring transition period and in the season of sexual activity. The concentration of testosterone, dihydrotestosterone and progesterone significantly (2-4 times) increased in the FF of estrous follicles in the mating season. It was concluded that the concentrations of progesterone, testosterone and dihydrotestosterone, taking into account the content of phospho-

rus and serum iron, can serve as a criterion for selecting FF for oocyte maturation in vitro. The content of progesterone, dihydrotestosterone, testosterone should be at least 100 nmol/l, 1000 pg/ml, and 16 nmol/l, and phosphorus and serum iron content within 0.74-1.1 and 46.4-57.0 mmol/l, respectively. Using these parameters of follicular fluid as criteria will determine the feasibility of its use for oocyte maturation in vitro.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Bøgh, I.B. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes/ I. B. Bøgh, J. Bézard, G. Duchamp, M. Baltsen, N. Gérard, P. Daels, T. Greve// *Theriogenology*, 2002. -V.57(7).-P.1765-1779. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00650-7.
2. Revelli, A. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics/ A. Revelli, L. Delle Piane, S. Casano, E. Molinari, M. Massobrio, P. Rinaudo// *J. Reprod Biol. Endocrinol.*, 2009. -V.7(40) doi: 10.1186/1477-7827-7-40.
3. Satué, K. Can the Presence of Ovarian Corpus Luteum Modify the Hormonal Composition of Follicular Fluid in Mares? / K. Satué, E. Fazio, P. Medica// *J. Animals*. -2020. -V.10(4), P.646 <https://doi.org/10.3390/ani10040646>
4. Watson, E.D. Concentrations of inhibin, progesterone and oestradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring transition and the breeding season. / E.D. Watson, R. Thomassen, M. Steele, M. Heald, R. Leask, N.P. Groome, S.C. Riley// *J. Anim. Reprod. Sci.* -2002. -Vol.74(1-2). -P.55-67. DOI:10.1016/s0378-4320(02)00170-7
5. Tucker, K.E. Does resumption of follicular estradiol synthesis during vernal transition in mares involve a shift in steroidogenic pathways./ K.E. Tucker, B.D. Cleaver, D.C. Sharp// *J. Biol. Reprod.* -1993. -Suppl.1. -P.519.
6. Sharp, D.C. Effects of steroid administration on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in ovariectomized pony mares in the springtime: pituitary respon-

siveness to gonadotropin releasing hormone (GnRH), circulating gonadotropin concentrations, and pituitary gonadotropin content/ D.C.Sharp, W.R.Grubaugh, S.D.Davis, J.Weithenauer, C.J.Wilcox//J.Biol.Reprod.-1991.-Vol.44.-P.983–990. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.6.983>

7.Gérard N., Loiseau S., Duchamp G. and Seguin F. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1H NMR) / N. Gérard, S. Loiseau, G. Duchamp and F. Seguin//Reproduction (2002) 124, 241–248. DOI: 10.1530/rep.0.1240241

8.Le Goff D. Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid / D Goff // Acta Biochimica et Biophysica Sinica . -1994.-P.1210 226–232. DOI: 10.1016/0005-2760(94)90125-2

REFERENCES

1. Bøgh, I.B. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes/ I. B. Bøgh, J. Bézard, G. Duchamp, M. Baltsen, N. Gérard, P. Daels, T. Greve// Theriogenology, 2002 .-V.57(7).-P.1765-1779. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00650-7.

2. Revelli, A. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics/ A. Revelli, L. Delle Piane, S. Casano, E. Molinari, M. Massobrio, P. Rinaudo//J.Reprod Biol. Endocrinol, 2009.-V.7(40) doi: 10.1186/1477-7827-7-40.

3. Satué, K. Can the Presence of Ovarian Corpus Luteum Modify the Hormonal Composition of Follicular Fluid in Mares? / K.Satué, E. Fazio, P.Medica// J.Animals.-2020.-V.10(4), P.646 <https://doi.org/10.3390/ani10040646>

4. 4. Watson, E.D. Concentrations of inhibin, progesterone and oestradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring transition and the breeding season. / E.D.Watson, R.Thomassen, M.Steele, M.Heald, R.Leask, N.P.Groome, S.C. Riley// J.Anim. Reprod. Sci.-2002.-Vol.74(1–2).-P.55–67. DOI:10.1016/s0378-4320(02)00170-7

5. 5.Tucker, K.E. Does resumption of follicular estradiol synthesis during vernal transition in mares involve a shift in steroidogenic pathways./K.E.Tucker, B.D. Cleaver, D.C.Sharp//J.Biol. Reprod. -1993.-Suppl.1.-P.519.

6. 6.Sharp, D.C. Effects of steroid administration on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in ovariectomized pony mares in the springtime: pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone (GnRH), circulating gonadotropin concentrations, and pituitary gonadotropin content/ D.C.Sharp, W.R.Grubaugh, S.D.Davis, J.Weithenauer, C.J.Wilcox//J.Biol.Reprod.-1991.-Vol.44.-P.983–990. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.6.983>

7. 7.Gérard N., Loiseau S., Duchamp G. and Seguin F. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1H NMR) / N. Gérard, S. Loiseau, G. Duchamp and F. Seguin//Reproduction (2002) 124, 241–248. DOI: 10.1530/rep.0.1240241

8. 8.Le Goff D. Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid / D Goff // Acta Biochimica et Biophysica Sinica . -1994.-P.1210 226–232. DOI: 10.1016/0005-2760(94)90125-2