



УДК 577.29:612.621:636.2.034

АСТ, ТРИГЛИЦЕРИДЫ И ХОЛЕСТЕРИН В ЖИДКОСТИ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ, И ИХ СВЯЗЬ С МОРФОЛОГИЕЙ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ

Ротарь Л.Н.-аспирант (ФГБНУ ВО СПбГАУ, кафедра генетики, разведения и биотехнологии животных), Шапиев И.Ш. - доктор с-х наук, кафедра акушерства и оперативной хирургии, (ФГБОУ ВО СПбГАВМ)

Ключевые слова: фолликулярная жидкость, ооциты коров, АСТ, холестерин, триглицериды

Keywords: follicular fluid, bovine oocytes, AST, cholesterol, triglycerides



РЕФЕРАТ

Селекция ооцитов является начальным, и принципиально важным этапом в технологии получения эмбрионов высокого качества, *in vitro*. Одним из перспективных подходов в поиске предикторов качества ооцитов является исследование связи биохимического состава фолликулярной жидкости крупного рогатого скота с морфофункциональным состоянием ооцитов. Объектом исследования служили: яичники коров черно-пестрой голштинизированной породы, жидкость овариальных фолликулов (ФЖ) и ооцит-кумуляные комплексы (ОКК). Учитывали: состояние кумулюса - количество слоев и компактность, признаки дегенерации кумулюсных клеток (пикнотические ядра и ослизненный кумулюс), гомогенность и цвет ооцитоплазмы ооцита, его размер, тургор и наличие включений. Согласно указанным критериям ооцит-кумуляные комплексы определяли как морфологически полноценные (жизнеспособные) и не жизнеспособные. Животные были разделены на 2 группы в соответствии с количеством жизнеспособных ОКК $< 50 \%$ от общего числа выделенных ОКК. Размер выборки 21 голова или 42 яичника. В пробах фолликулярной жидкости определяли концентрацию холестерина и триглицеридов, а так же активность фермента аспартатаминотрансферазы (АСТ). Биохимический анализ показал, что уровень триглицеридов и уровень холестерина в фолликулярной жидкости выше в группе с большим выходом жизнеспособных ооцитов ($P < 0,05$). В то же время, концентрация АСТ выше в группе животных с меньшим количеством жизнеспособных ОКК ($P > 0,05$). В результате исследования выявлена корреляция между морфологически интактными ОКК и концентрацией а) триглицеридов составил $r = 0,46$ при коэффициенте достоверности $p = 0,10$; б) холестерина $r = 0,69$ коэффициент достоверности $p = 0,01$ и в) АСТ $r = - 0,40$ коэффициент достоверности $p = 0,15$.

ВВЕДЕНИЕ

Метод трансплантации эмбрионов стал важным инструментом в повышении эффективного использования генетического потенциала высокопродуктивных самок крупного рогатого скота. Получение *in vitro* эмбрионов высокого качества и повышение эффективности их использования начинается с ранжирования морфологически полноценных (жизнеспособных) ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК). Таким образом, оценка качества ооцитов при производстве эмбрионов *in vitro* привлекает все большее внимание эмбриологов. Наиболее распространенной является морфологическая оценка методом микроскопии. [4]. Ряд авторов с целью выявления специфических молекулярных маркеров качества ооцитов исследовали экспрессию генов в клетках гранулезы и в ооците [11]. Однако, такого рода исследования довольно сложны и трудоемки, а поэтому, не могут применяться в рутинной эмбриологической практике области животноводства. Развивающийся ооцит располагается в окружении фолликулярной жидкости (ФЖ), которая является продуктом переноса компонентов плазмы крови, через фолликулярный барьер и секреторной деятельности клеток теки и клеток гранулезы. Она создает уникальную среду для ооцит-кумулюсного комплекса, обеспечивая защиту от процессов гидролиза белков, а так же участвует в процессе экстружии во время овуляции [13], действуя как буфер против неблагоприятного влияния компонентов крови [8]. Компетентность ооцитов к мейотическому созреванию и оплодотворению неразрывно связана с составом фолликулярной жидкости. Предполагается, что некоторые биохимические показатели ФЖ могут указывать на качество ооцит-кумулюсных комплексов. В этой связи наблюдается вполне определенная тенденция по исследованию компонентов в жидкости овариальных фолликулов с целью выявления биохимических предикторов качества ооцитов крупного рогатого скота [12]. Влияние отрицательного энергетического ба-

ланса на стельность высокопродуктивных молочных коров связано с повышением концентрации неэстерифицированных жирных кислот (NEFA) в ФЖ, которые оказывают негативное влияние на качество ооцитов [9]. В частности показано, что у крупного рогатого скота, пальмитиновая и стеариновая кислоты оказывают неблагоприятное воздействие на созревание ооцитов, *in vitro*, и на скорость образования бластоцист [5]. Изучение биохимического состава жидкости овариальных фолликулов разного диаметра выявило, что концентрации стероидных гормонов в фолликулярной жидкости коров связаны с размером и ростом фолликула, стадией эстрального цикла, функциональным статусом ооцита [3], а так же с уровнем апоптоза соматических фолликулярных клеток [1,6,14]. Однако в целом, четкого соответствия между измеряемыми конкретными биохимическими характеристиками ФЖ и качеством ооцитов до настоящего времени не установлено [12]. В различных исследованиях отмечались более низкий уровень триглицеридов в жидкости преовуляторных фолликулов по сравнению с таковым в антральных фолликулах. Это отражает быстрое и непрерывное использование триглицеридов в процессе фолликулярного роста. Триглицериды являются формой хранения липидов, и в результате их гидролиза образуется молекула глицерина и три молекулы жирных кислот. Поэтому, эти вещества могут быть альтернативным источником энергии для развития фолликулов [9]. Так же известно, что источником яичниковых гормонов является созревающий фолликул, где клетки гранулезы вырабатывают эстрогены, предшественником которых является холестерин. Исходя из этого, целью работы явилось исследование содержания триглицеридов, холестерина, а так же активность фермента аспаратаминотрансферазы (АСТ) в жидкости овариальных фолликулов коров, ооцит-кумулюсные комплексы которых морфологически полноценны (жизнеспособны), и в ФЖ с

ОКК имеющих признаки дегенерации (не жизнеспособные).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили яичники коров черно-пестрой голштинизированной породы, жидкость овариальных фолликулов, ооцит-кумуляные комплексы. После оварэктомии теплой туши, промаркированные яичники доставляли в лабораторию в течение 1 часа, при температуре 36-37°C. В лаборатории яичники освобождали от остатков яйцеводов, трижды промывали в 0,9% NaCl, после чего проводили аспирацию жидкости из овариальных фолликулов разного диаметра. ФЖ собирали в маркированные пробирки объемом 2,0 мл для проведения биохимического исследования. В пробах фолликулярной жидкости определяли концентрацию холестерина и триглицеридов, а так же активность фермента аспаратамино-трансферазы (АСТ). Исследование проводилось с использованием биохимического анализатора ARCHITECT - С8000. Выделение ооцит-кумуляных комплексов, для их морфологической оценки производили путем резекции яичников. Визуализировали ОКК с использованием стереоскопического микроскопа МСП 1. При оценке ОКК, учитывали: состояние кумулюса - количество слоев и компактность, признаки дегенерации кумулюсных клеток (пикнотические ядра и ослизненный кумулюс), гомогенность и цвет ооплазмы ооцита, равномерность *zona pellucida* (ZP) его размер, тургор и наличие включений. Ооцит-кумуляные комплексы, имеющие 1 и более слоев кумулюса, серую, гомогенную ооплазму равномерную по ширине ZP, нормальный размер (110-120µм), оценивали как морфологически интактные (жизнеспособные). Денудированные ооциты или ОКК, имеющие кумулюс с признаками дегенерации, ооциты с темной ооплазмой, расширенной ZP, размером менее 110µм, с плохим тургором считались не жизнеспособными.

Животные были разделены на 2 группы в соответствии с количеством жизнеспособных ОКК < 50 % от общего числа выделенных ОКК. Размер выборки 21

голова или 42 яичника. Информацию о животном (возраст первого осеменения, продуктивность, содержание жира и белка в молоке) получали из карточки племенной коровы. Размер выборки 21 голова или 42 яичника. Возраст коров в обеих группах варьировал от 2 до 6 лет. Для сравнения результатов в группах использовали критерий Стьюдента, статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel и Atte Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные таблицы 1 показывают, что животные, при идентичных показателях жира и белка в молоке, при одном и том же возрасте первого осеменения, имеют одинаковый выход ооцит-кумуляных комплексов на голову, однако количество жизнеспособных ооцитов в 1-й группе в 3,2 раза меньше, чем во 2-й.

Виду того, что ФЖ является интрафолликулярной средой для ооцитов, можно предположить, что ее компоненты определяют качество ооцит-кумуляных комплексов и их дальнейший потенциал к развитию.

Результаты биохимического исследования, представленные в таблице 2 показывают, что в группе животных с большим выходом жизнеспособных ооцитов уровень триглицеридов на 38 %, а уровень холестерина более чем в 2,5 раза достоверно превышают ($P < 0,05$) их содержание в группе с меньшим выходом жизнеспособных ооцитов, что согласуется с результатами других исследований [8,13].

В то же время в группе животных с меньшим количеством по сравнению с большим количеством жизнеспособных ОКК концентрация АСТ на 38% превышает ($P < 0,05$). АСТ является ключевым ферментом из группы трансфераз, который участвует в метаболизме клеток. АСТ синтезируется внутри клетки, поэтому повышенные концентрации этого фермента в окружающей среде свидетельствует о повреждении клеток. Можно предпо-

Таблица 1

Выход жизнеспособных ооцит-кумулясных комплексов и показатели молочного жира, молочного белка, возраста первого осеменения

Группа	Всего коров	Молочный жир	Молочный белок	Возраст при первом осеменении	ОКК, всего на 1 голову	ОКК, жизнеспособные
1	11	3,86 ± 0,080	3,08 ± 0,051	15,85 ± 0,69	17,2 ± 3,15	3,3 ± 0,078
2	10	3,95 ± 0,122	3,1 ± 0,07	15,6 ± 0,56	17,6 ± 2,65	10,6 ± 1,73
	21					P < 0,01

Таблица 2

Биохимические показатели жидкости овариальных фолликулов коров в группах с разным количеством жизнеспособных ооцитов

Группа	ОКК, Всего	ОКК, жизнеспособные		АСТ, U/L	Холестерин (mmol/L)	Триглицериды (mmol/L)
		М на одну голову	%			
1	172	3,3 ± 0,078	21,9 ± 4,37	2760 ± 370,4	0,49 ± 0,090	1,38 ± 0,098
2	158	10,6 ± 1,73	62,7 ± 5,77	1698 ± 329,7	1,37 ± 0,302	1,93 ± 0,173
		P < 0,01		P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05

ложить, что более высокий уровень АСТ в фолликулярной жидкости является следствием нарушения функциональной активности соматических клеток (теки, гранулезы и кумулюса) овариальных фолликулов, что может влиять на полноценное развитие ооцитов.

Корреляционный анализ между предполагаемыми жизнеспособными ОКК и концентрацией: а) триглицеридов составил $r = 0,46$ при коэффициенте достоверности $r = 0,10$; б) холестерина $r = 0,69$ коэффициенте достоверности $p = 0,01$; в) АСТ $r = -0,40$ коэффициент достоверности $p = 0,15$.

ВЫВОДЫ

Достоверные различия в концентрациях триглицеридов и АСТ и при 50% отборе морфологически жизнеспособных и нежизнеспособных ОКК не могут считаться единичными показателями опреде-

ляющими качество ооцитов, поскольку уровень достоверности и коэффициент корреляции для этих показателей, полученный для 50 %-ного отбора ОКК не достаточен для уверенного определения качества ооцитов. При этом холестерин может рассматриваться как потенциальный показатель качества ОКК. Проведение дальнейших исследований позволит скорректировать предположение авторов.

AST, TRIGLYCERIDES AND CHOLESTEROL IN THE FLUID OF OVARIAN FOLLICLES AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE MORPHOLOGY OF THE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES IN BOVINE

Rotar L.N. –PhD - Department of animal genetics, breeding and biotechnology, FSBI VO “ShBGU”; Shapiev I. Sh.-doctor of agric.sci, cher of urgent surgery

and obstetrics (FGBOU HE
"SpBGAV")
ABSTRACT

Oocyte selection is an initial and fundamentally important stage in the technology of producing high quality embryos in vitro. One of the promising approaches in the search for predictors of oocyte quality is the study of the relationship of the biochemical composition of the follicular fluid of cattle with the morphological and functional state of oocytes. The object of the study were: bovine ovaries of black-and-white Holstein breed, fluid of ovarian follicles (FF) and oocyte-cumulus complexes (OCC). Into account were taken: the status of the cumulus - compactness and number of layers, signs degeneration of cumulus cells (sliming cumulus and pyknotic nucleus), homogeneity and color of the oocytes ooplasm, its size, turgor and presence of inclusions. According to these criteria, the oocyte-cumulus complexes were defined as morphologically complete (viable) and not viable. The animals were divided into 2 groups according to the number of viable OCC < 50% of the total number of isolated OCC. The sample size of 21 cows or 42 ovaries. The concentration of cholesterol and triglycerides, as well as the activity of the enzyme aspartate aminotransferase (AST) were determined in the follicular fluid. Biochemical analysis showed that the level of triglycerides and cholesterol in the follicular fluid was higher in the group with a large yield of viable oocytes ($P < 0.05$). At the same time, the AST concentration is higher in the group of animals with less viable OCC ($P > 0.05$). The study revealed a correlation between morphologically intact OCC and the concentration of a) triglycerides was $r = 0.46$ with a confidence factor $p = 0.10$; b) cholesterol $r = 0.69$ confidence factor $p = 0.01$ and c) AST $r = - 0.40$ confidence factor $p = 0.15$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ротарь, Л.Н. Апоптоз соматических клеток фолликулов в яичниках коров и его взаимосвязь с уровнем стероидных гормонов в фолликулярной жидкости и ВСВ-диагностикой ооцитов / Л. Н. Ротарь, В. П. Поли-

тов // Изв. СПб ГАУ. - 2017. - № 2 (47). - С.100-104.

2. Ovarian activity and oocyte quality associated with the biochemical profile of serum and follicular fluid from Girolando dairy cows postpartum / B. G. Alves, K. A. Alves, A. C. Lúcio, M. C. Martins, T. H. Silva, B. G. Alves, L. S. Braga, T. V. Silva, M. A. Viu, M. E. Beletti, J. O. Jacomini, R. M. Santos, M. L. Gambarrini // *Animal Reproduction Science*. - 2014. - Vol.146, № 3/4.- P.117-125.
3. Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes / H. M. Arshad, N. Ahmad, Zia-ur-Rahman, N. A. Samad, N. Akhtar, S. Ali // *Pakistan Veterinarian J.* - 2005. - Vol.25, № 4. - P. 189-193.
4. Balaban, B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation / Balaban B., Urman B. // *Reproductive Biomedicine Online*.- 2006.- Vol. 12.- P. 608-615.
5. Bender, K. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows / K. Bender, S. Walsh, A. C. O. Evans, T. Fair, L. Brennan // *Reproduction*. - 2010.- Vol. 139. - P.1047-1055.
6. Biochemical and hormonal alterations during different stages of follicular development in livestock / N. Dalai, S. Shekhar, A. P. K. Mahapatra, A. K. Kundu, G. R. Jena, D. Kumar // *International J. of Livestock Research*. - 2017. - Vol.10, № 7. - P. 233- 237 .
7. Fortune, J. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle / Fortune J, Rivera G, Yang M. // *Animal Reproduction Science*. - 2004. - Vol. 82. - P.109-126.
8. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid / R. Gosden, R. Hunter, E. Telfer, C. Torrance, N. Brown // *Reproduction, Fertility and Development*. - 1988. - Vol. 82, № 2. - P. 813-825.
9. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on

- developmental capacity of bovine oocytes in vitro / J. L. Leroy, T. Vanholder, B. Mateusen, A. Christophe, G. Opsomer, A. de Kruif, G. Genicot, A. Van Soom // *Reproduction*. - 2005. - Vol. 130, № 4. - P. 485-495.
10. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential / S. Matoba, K. Bender, A. G. Fahey, S. Mamo, L. Brennan, P. Lonergan, T. Fair // *Reproduction, Fertility and Development*. - 2014. - Vol. 26, № 2. - P. 37-45.
11. Molecular methods for selection of the ideal oocyte / P. Patrizio, E. Fragouli, V. Bianchi, A. Borini, D. Wells // *Reproductive Biomedicine Online*. - 2007. - Vol. 15. - P. 346-353.
12. 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 // *Reproductive Biology and Endocrinology*. - 2009. - № 7(1). - P. 340-344.
13. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization / J. S. Richards, D. L. Russell, R. L. Robker, M. Dajee, T. N. Alliston // *Molecular Cellular Endocrinology*. - 1998. - Vol. 145, № 1. - P. 47-54.
14. Lipid and protein metabolism along with oxidative status of follicular fluid throughout the estrous cycle in Anatolian water buffalo / O. Yilmaz, J. J. Jaroszewski, A. Bblbl, M. Uzar // *Turkish J. of Veterinary and Animal Sciences*. - 2016. - Vol. 40. - P. 181-188.

УДК 636.03.033.636.2.034.575.162

ОЦЕНКА КОРОВ ГОЛШТИНИЗИРОВАННОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА FSHR

Позовникова М. В. (ВНИИГРЖ филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, лаборатория молекулярной генетики), Ротарь Л.Н. (ФГБНУ ВО СПбГАУ, кафедра генетики, разведения и биотехнологии животных)

Ключевые слова: Молочный скот, молочная продуктивности, ген FSHR, ооцит-кумулюсный комплекс, морфология ооцитов

Keywords: Dairy cattle, milk yield, FSHR gene, cumulus-oocyte complex, oocytes morphology.



РЕФЕРАТ

Фертильность коров – это полигенный признак, развитие которого определяется сложным взаимодействием различных генов и факторов внешней среды. Целью нашей работы было изучить у коров полиморфизм гена FSHR в 10-м экзоне и проанализировать связь его аллельных вариантов с продуктивными и репродуктивными показателями, а также с качеством и количеством ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), полученных postmortem. В данном исследовании было проанализировано 69 коров черно-пестрой голштинизированной породы и 138 яичников полученных postmortem от данных животных. Биологический материал был собран в период 2017-2018 гг.

Показатель плодовитости коров является одним из важнейших, определяющих уровень селекционно-племенной и хозяйственной деятельности сельхозпредприятий. Так как признаки молочной продуктивности и фертильность коров находятся в отрицательной корреляции, в нашей работе мы проанализи-