

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Ротарь Любовь Николаевна

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАН-
НЫЕ С КОЛИЧЕСТВЕННОЙ И КАЧЕСТВЕННОЙ ХАРАКТЕРИСТИКОЙ
ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА**

06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор
Шапиев Исмаил Шапиевич

СОДЕРЖАНИЕ

1 ВВЕДЕНИЕ	4
2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	10
2.1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1.1 Технология получения эмбрионов крупного рогатого скота, преимущества, перспективы развития.....	10
2.1.2 Генетические и физиологические особенности <i>Bos Indicus</i> и <i>Bos Taurus</i>	16
2.1.3 Влияние возраста на качество ооцит-кумулюсных комплексов	18
2.1.4 Связь морфофункционального состояния яичников с выходом ооцит–кумулюсных комплексов	19
2.1.5.1 Полиморфизм гена <i>GN</i> и частота встречаемости в популяции.....	24
2.1.5.2 Полиморфизм гена <i>PRL</i> и распространение в популяции	25
2.1.5.3 Полиморфизм гена <i>Pit-1</i> и частота встречаемости в популяции.....	26
2.1.5.4 Полиморфизм гена <i>FSHR</i>	27
2.1.6 Роль интрафолликулярных факторов в гаметогенезе самок крупного рогатого скота	27
2.1.6.1 Биохимический состав жидкости овариальных фолликулов коров	28
2.1.6.2 Роль соматических фолликулярных клеток, апоптоз клеток гранулезы.....	30
2.1.7 Связь уровня молочной продуктивности коров и качества ооцитов.....	31
2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	34
2.2.1.Объекты и материалы исследований	34
2.2.2. Методы исследований	35
2.2.2.1. Прижизненное получение ооцит–кумулюсных комплексов.....	35
2.2.2.2 Выделение ОКК из яичников животных после убоя (<i>post mortem</i>).....	37
2.2.2.3 Аспирация жидкости овариальных фолликулов и ее биохимический анализ	39
2.2.2.4 Овариальная резекция	39
2.2.2.5 Морфологическая оценка ооцит-кумулюсных комплексов крупного рогатого скота	40
2.2.2.6 Выделение ДНК из ткани яичника	42
2.2.2.7 ПЦР-ПДРФ анализ	44

2.2.2.8 Оценка племенной ценности (ПЦ) по молочной продуктивности.....	45
2.2.2.9 Определение функционального статуса ооцитов и уровня стероидных гормонов в ФЖ.....	45
2.2.2.10 Приготовление препарата клеток гранулезы и определение уровня апоптоза соматических фолликулярных клеток.....	47
2.2.2.11 Статистический анализ	48
2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	50
2.3.2 Влияние возраста самок крупного рогатого скота на количество и качество ОКК.	52
2.3.3 Влияние морфофункционального состояния яичников молочного скота на выход ооцит-кумулюсных комплексов	55
2.3.4 Распределение генотипов в исследуемой популяции самок голштинизированного черно-пестрого скота.....	56
2.3.5 Ассоциация полиморфизма генов <i>GH</i> , <i>PRL</i> , <i>Pit-1</i> и <i>FSHR</i> с морфологической полноценностью ОКК.....	60
2.3.6 Племенная ценность молочной продуктивности коров разных генотипов по генам <i>GH</i> , <i>PRL</i> , <i>Pit-1</i> , <i>FSHR</i> и ассоциация с ОКК	64
2.3.7 Биохимический профиль фолликулярной жидкости и интактность ооцит – кумулюсных комплексов	72
2.3.8 Апоптоз клеток гранулезы, и его взаимосвязь с функциональным статусом ооцита и уровнем стероидов в фолликулярной жидкости	74
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	76
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	78
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	79
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	81

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Стратегия национальной безопасности Российской Федерации до 2020 года, утвержденная Указом Президента Российской Федерации от 12 мая 2009 года № 537 <http://docs.cntd.ru/document/902156214>] предусматривает повышение конкурентоспособности национальной экономики, и превращение Российской Федерации в мировую державу, деятельность которой направлена на поддержание стратегической стабильности и взаимовыгодных партнерских отношений в условиях многополярного мира. Одной из приоритетных задач является обеспечение продовольственной безопасности за счет развития биотехнологий и импортозамещения по основным продуктам питания. Предполагается преодоление технологических рисков, которые вызваны отставанием развития отечественной производственной базы, различиями в требованиях к безопасности пищевых продуктов и организации системы контроля их соблюдения. Биотехнологии, применяемые в животноводстве, позволяют получать скот, имеющий улучшенный генотип и заданные хозяйственно полезные признаки, в том числе резистентность к заболеваниям. Быстрое увеличение поголовья ценного, высокопродуктивного скота, в рамках существующей популяции, является важной народнохозяйственной задачей, позволяющей снижать зависимость от импорта поголовья крупного рогатого скота. На этапе отбора самок-доноров с высокой продуктивностью, для ускоренного размножения, практический интерес представляет, получение достаточного количества морфологически полноценных, жизнеспособных гамет, пригодных к дальнейшим этапам производства эмбрионов. Эмбрионы, полученные от высокопродуктивных животных, имеющих значительную племенную ценность (ПЦ), можно рассматривать, как дополнительный вид продуктивности, наряду с молоком и мясом. Разработка систем сохранения и рационального использования генофонда локальных и исчезающих пород сельскохозяйственных животных с применением технологии получения эмбрионов скота *in vitro* создает дополнительные возможности для животноводческого производства. В отличие от технологии получения эмбрионов *in vivo*, при производстве эмбрионов *in vitro* не требуется применение гормональных препаратов для стимуляции суперовуляции, что

уменьшает экономические затраты, не снижая качество животноводческой продукции. Прижизненные предикторы качества ооцитов исходной популяции, при отборе самок-доноров для аспирации фолликулов, позволят снизить затраты на пункции ооцит-кумулюсных комплексов и тем самым повысить эффективность применения эмбриотехнологий в условиях производства. Селекция животных с использованием маркеров репродуктивных процессов позволит оздоровить поголовье, не снижая его продуктивности. В связи с этим интенсификация технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* и стабильность ее результатов приобретают особую актуальность.

Степень разработанности темы. Трансплантация эмбрионов рассматривается как основа антикризисных программ в животноводстве [Никитин В.Я. и др., 1998]. Последние десятилетия продолжаются исследования по совершенствованию уже существующих методик производства эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. Это касается модификации условий культивирования эмбрионов, поиска предикторов качества гамет, а также выявления факторов влияющих на воспроизводительную функцию коров [Gordon I., 2003; Varuselli P.S. et al., 2016]. Применение современных методов расшифровки геномов позволяет увеличить эффективность определения и степень влияния полиморфизма ДНК на хозяйственно полезные признаки [Яковлев А.Ф. и др., 2011; Зиновьева Н.А. и др., 2010, Калашникова Л.А. и др., 2010]. Особое внимание уделяется взаимосвязи между метаболизмом гормонов [Лейбова В.Б. и др. 2011] и энергетическим балансом в организме самок крупного рогатого скота [Djoković R. et al., 2015], а также, роли соматических фолликулярных клеток [Лебедева И.Ю. и др., 2000]. Важным аспектом при оценке и повышении показателей воспроизводства является уровень молочной продуктивности [Никиткина Е.В., 2012]. Опираясь на имеющийся опыт необходимы дальнейшие исследования в данной сфере и использование полученных результатов в практике для улучшения показателей воспроизводства поголовья молочного скота с высоким уровнем продуктивности. Это повысит конкурентоспособность животноводческих предприятий в условиях рынка.

Научная проблема заключается в определении методов, позволяющих на этапе подготовки коров к инвазивной процедуре получения гамет выявить из общего поголовья перспективных самок-доноров ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК).

Цель настоящей работы – определение прижизненных фенотипических и генетических маркеров качества ооцит-кумулюсных комплексов при отборе коров-доноров в программах получения эмбрионов *in vitro*

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ качества гамет самок *Bos taurus indicus* и *Bos taurus taurus* мясного и молочного направления продуктивности
2. Определить влияние возраста самок, на количество и качество ОКК
3. Оценить связь между морфологией яичников и качеством ооцит-кумулюсных комплексов крупного рогатого скота молочного направления продуктивности
4. Исследовать взаимосвязь полиморфных вариантов генов *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR* с количеством и морфологией ооцит-кумулюсных комплексов
5. Исследовать взаимосвязь комплексных генотипов по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* с количеством и морфологией ооцит-кумулюсных комплексов
6. Проанализировать связь племенной ценности и уровня молочной продуктивности с качеством и количеством ооцит-кумулюсных комплексов
7. Исследовать биохимический профиль жидкости овариальных фолликулов коров и оценить качество ооцит-кумулюсных комплексов
8. Исследовать уровень апоптоза клеток гранулезы в зависимости от функционального состояния ооцита и уровня стероидных гормонов в жидкости овариальных фолликулов

Научная новизна работы. Впервые проведено многостороннее исследование фенотипических и генетических параметров популяции крупного рогатого скота ассоциированных с качеством гамет. Определены маркеры, позволяющие проводить селекцию самок, имеющих более высокий потенциал к воспроизводству.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведен генетический скрининг коров и телок черно-пестрой голштинизированной породы, по ряду генов, связанных с признаками молочной продуктивности и фертильности. Получены новые данные о полиморфизме генов *PRL*, *GH*, *Pit-1* и *FSHR* в популяции голштинизированной черно-пестрой породы, разводимой в Северо-Западном регионе РФ. Установлена ассоциация отдельных генотипов исследуемых генов с анализируемыми количественными и качественными характеристиками ооцит-кумулюсных комплексов. Результаты проведенных исследований могут учитываться в племенной работе, при отборе самок для процедуры получения эмбрионов *in vitro*.

Методология и методы исследования. Исследования проводились в период с 2016 по 2019 годы. В работе были использованы: прижизненный метод получения ооцит-кумулюсных комплексов - OPU, и выделение ОКК из яичников животных после убоя (*post mortem*), фенольный метод выделения ДНК, анализ однонуклеотидного полиморфизма в генах *PRL*, *GH*, *Pit-1* и *FSHR* проводили методом ПЦР-ПДРФ, биохимический метод исследования фолликулярной жидкости, ВСВ диагностика ооцитов. Оценка племенной ценности проведена с использованием метода BLUP, решение уравнения смешанной модели проводилось с помощью программного обеспечения MiX99. Для статистического анализа данных использовали метод вариационной статистики (критерий Стьюдента). Обработку результатов проводили с использованием программ ANOVA, Microsoft Excel и Atte Stat.

Положения, выносимые на защиту:

1. Количество и качество ооцит-кумулюсных комплексов ассоциировано с возрастом самок и направлением продуктивности

2. Выявлена связь полиморфных вариантов генов *GH*, *PRL* с количеством и морфологией ооцит-кумулюсных комплексов коров черно-пестрой голштинизированной породы
3. Рассмотрена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов в генах *Pit-1*, *FSHR* с количеством и морфологией ооцит-кумулюсных комплексов коров черно-пестрой голштинизированной породы
4. Определение связи племенной ценности коров черно-пестрой голштинизированной породы по признакам удой, молочный жир, молочный белок с качеством и количеством ооцит-кумулюсных комплексов
5. Рассмотрена связь биохимического состава фолликулярной жидкости, уровня тестостерона и эстрадиола в ФЖ, апоптоз клеток гранулезы, в зависимости от морфофункционального состояния ооцита.

Апробация работы. Результаты проведенных исследований были представлены на следующих конференциях:

- Международная научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава «Научное обеспечение развития сельского хозяйства и снижение технологических рисков в продовольственной сфере», ФГБОУ ВО СПбГАУ, 2017 г.
- Международная научно-практическая конференция «Роль молодых ученых в решении актуальных задач АПК», ФГБОУ ВО СПбГАУ, 2017
- Международная научно-практическая конференция «Роль молодых ученых в решении актуальных задач АПК», ФГБОУ ВО СПбГАУ, 2018 г.
- XXVII Международная агропромышленная выставка-ярмарка «АГРОРУСЬ-2018», СПб, 2018 г.
- Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2018 г.
- Международная научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава «Развитие агропромышленного комплекса на основе современных научных достижений и цифровых технологий», ФГБОУ ВО СПбГАУ, 2019 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, 4 из которых опубликованы в рецензируемых научных изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 105 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, предложений, списка литературы. Иллюстрирована 18 таблицами, 17 рисунками. Список литературы включает 203 источника, в том числе 160 на иностранных языках.

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1.1 Технология получения эмбрионов крупного рогатого скота, преимущества, перспективы развития.

Вспомогательные репродуктивные технологии в животноводстве открывают широкие возможности для бизнеса. Коммерциализация искусственного осеменения для крупного рогатого скота началась с 1970-х годов, однако проведенное экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) крупного рогатого скота сопровождалось отсутствием результатов вплоть до 1977 года, когда японские исследователи провели оплодотворение *in vitro* яйцеклетки крупного рогатого скота, созревшей в искусственных условиях. В 1986 году в Японии родились первые телята ЭКО [I. Gordon, 1994]. Искусственно созревшие ооциты крупного рогатого скота оплодотворяли в лабораторных условиях, затем культивировали в яйцеводе кролика до стадии бластоцисты, после чего подвергали замораживанию-оттаиванию с последующим переносом в организм самки-реципиента. Используя IVM – дозревание ооцит-кумулясных комплексов, IVF – оплодотворение ооцитов и IVC – культивирование эмбрионов, [Lu et al., 1987] были успешно произведены эмбрионы из незрелых ооцитов, выделенных из яичников коров *post mortem*. Эти эмбрионы были перенесены в полость матки коровы - реципиента, после чего родились телята - близнецы. В настоящее время IVM, IVF и IVC стали рутинной работой эмбриологических лабораторий. Для достижения такого прогресса потребовалось тридцать лет упорного труда научных и исследовательских коллективов всего мира. В настоящее время в мире отмечается активное применение эмбриотехнологий в животноводстве. По данным Европейской Ассоциации Трансплантации Эмбрионов (АЕТЕ) коммерческая активность в Европе и России в 2017 году составила 181922 пересадки эмбрионов крупного рогатого скота, в том числе полученных *in vivo u in vitro*, как с применением прижизненной аспирации, так и полученных из яичников *post mortem*. Доля российских эмбрионов составила 22,9% (41670 шт.) [Mikkola M., 2018].

Существует два основных, эффективных метода получения эмбрионов – *in vivo* (вымывание) [Свиридов Б.Е. и др., 2012; Никитин В.Я., 1998], *in vitro* (*post mortem* и прижизненная аспирация) [Gordon I., 2003; Пестис В.К., 2014].

Преимущества эмбриотехнологий для отрасли животноводства:

- Ускоренное размножение ценных, высокопродуктивных самок за счет получения большого количества потомков (эмбрионов).
- Наилучшее сочетание генотипов ценных родителей (в одном цикле ЭКО возможно оплодотворение ооцитов спермой двух (*может* и более) быков).
- Регулирование пола эмбрионов за счет использования сексированного семени при оплодотворении *in vitro*.
- Создание криобанка гамет и эмбрионов ценных самок позволит быстро распространить ценное поголовье, а также восстановить его в случае чрезвычайных ситуаций.
- Экономическая выгода и инфекционная безопасность при отказе от ввоза импортных животных «живьем».
- Эмбрионы можно рассматривать как дополнительный вид продуктивности.

Перспективы развития эмбриотехнологий в животноводстве

- Геномная селекция эмбрионов (биопсия бластомера или трофэктодермы) с целью выявления носительства нежелательных аномалий, позволит улучшить качественный состав поголовья.
- В качестве реципиента может быть использована самка другой породы, что создает дополнительные возможности для хозяйств, при создании стада из животных разного направления продуктивности.
- Быстрое увеличение поголовья за счет двойневых отелов, при переносе реципиенту 2-х эмбрионов (данный пункт требует дополнительного обсуждения, т.к. двойневые стельности ведут к тяжелым, преждевременным отелам и другим осложнениям).

Однако, все еще много аспектов можно и нужно оптимизировать для того, чтобы получить более высокую эффективность технологии получения эмбрионов коров *in vitro*. Чтобы гарантировать высокий показатель качества и количества эмбрионов крупного рогатого скота при ЭКО, обычно проводится предварительный отбор и ранжирование ооцит-кумулюсных комплексов. Установлены классификационные критерии качества ОКК у крупного рогатого скота. Например, морфология кумулюсных клеток, окружающих ооцита, может быть использована для прогнозирования развития ооцитов [Blondin P. et al., 2002]. Также для оценки качества ооцитов, используется состояние перивителлинового пространства, полярного тела, цитоплазматического включения, толщина зоны пиллюцида (*zona pellucida*) и другие морфологические параметры [Xia et al., 1997; Hassan-Ali et al., 1998]. Сообщалось, что на ооцит-кумулюсные комплексы непосредственно действуют условия культивирования, оказывая влияние на экспрессию генов и белковую активность [Lonergan et al., 2003].

Отбор гамет по морфологической полноценности значительно улучшает конечную продукцию эмбрионов *in vitro*, но, все еще недостаточно объяснены механизмы регуляции развития ооцитов и влияние факторов, определяющих их качество. Свидетельства аномалий у домашних животных, получаемых с применением вспомогательных репродуктивных технологий, говорит о том, что эти методы имеют неблагоприятные ограничения и недостатки. В программах получения эмбрионов возможна только морфологическая селекция гамет и зародышей, но надежность такой оценки иногда ставится под сомнение [Viuff et al., 1999; Voerjan et al., 2000; van Wagtendonk-de Leeuw et al., 2000; Galli et al., 2003]. Это подразумевает необходимость использования более убедительного параметра или маркера для оценки качества ооцитов.

В настоящее время разработано 3 метода прижизненного получения ооцитов: хирургический, лапароскопический и ультразвуковой метод аспирации фолликулов (*Ovum Pick Up - OPU*). Наиболее перспективным и наименее травматичным методом прижизненного получения ооцит-кумулюсных комплексов признан *OPU*.

Процедура ОРУ имеет низкую инвазивность, так как проводится под УЗИ контролем, трансвагинальным доступом, с последующим получением эмбрионов *in vitro*. В отличие от ооцитов, полученных из яичников после убоя животного, ооциты от живых коров и телок имеют оцененный генетический потенциал и известное состояние здоровья животного-донора на момент пункции. Аспирация может проводиться с применением индукции суперовуляции и без нее, 1–2 раза в неделю. ФСГ стимуляция позволяет получить большее количество фолликулов и ооцитов [Bonì R., 2012]. Для исследования, количественных и морфологических характеристик ОКК, в технологии получения эмбрионов *in vitro*, оправдано и использование яичников *post mortem*, так как возможна индивидуальная оценка овариального резерва, учитывая, что только 5-10% ооцитов могут пройти через IVM, IVF и IVC, и в конечном итоге привести к рождению телят [Boerjan et al., 2000; van Wagendonk-de Leeuw et al., 2000; Galli et al., 2003].

Генотип, физиологическое состояние (возраст, способность к деторождению, лактация и пр.), внешние воздействия (условия кормления, температурный стресс и т.д.) оказывают влияние на эффективность процесса воспроизводства. Установлено, что 10-20 % искусственных осеменений, не завершившихся зачатием или рождением плода, объясняются неспособностью ооцита к оплодотворению или ранней эмбриональной смертностью. Однако, при осеменении коров обычно оплодотворяется более 80% яйцеклеток. Следовательно, ранние эмбриональные потери могут быть связаны с низким потенциалом ооцитов к дальнейшему эмбриональному развитию вследствие неблагоприятных микроусловий в фолликуле, с отсутствием способности репродуктивного тракта обеспечить оптимальное развитие эмбриона, а также вследствие неадекватной взаимосвязи между организмом матери и эмбрионом [Lonergan et al., 2016].

Важно отметить, что независимо от метода получения эмбрионов - это сложный многоступенчатый процесс профессионального взаимодействия ветеринарной службы, эмбриологической лаборатории и всех подразделений хозяйства. На эффективность технологии влияет совокупность следующих факторов:

- Исходное качество гамет (ооциты и сперматозоиды)
- Соматическое здоровье животного - донора и животного – реципиента
- Кормление (сбалансированность рациона, состав и качество корма, режим кормления и поения, качество воды)
- Система содержания, параметры микроклимата, доение, технологические стрессы
- Направление и уровень продуктивности
- Биологические факторы (возраст, соответствие анатомического и функционального развития)
- Генетические факторы, в том числе носительство нежелательных мутаций
- Квалификация работающего персонала

Известно, что качество яйцеклеток является одним из определяющих факторов успешного оплодотворения и последующего развития эмбрионов. Этот факт стимулирует поиск надежных предикторов компетентности развития яйцеклеток. Возможные критерии, которые могут быть использованы для оценки качества ооцитов, классифицируются как морфологические, клеточные и молекулярные предикторы. Традиционные методы оценки качества ооцитов основаны на морфологической классификации фолликула, ооцит - кумулюсного комплекса, полярного тела и/или мейотического веретена. Хотя использование морфологических характеристик в качестве предикторов качества ооцитов является спорным, все же такая система классификации может дать ценную информацию при массовом производстве эмбрионов, в процессе предварительного отбора ооцитов с более высоким потенциалом к развитию и, следовательно, может максимизировать результат развития бластоцист. Внутриклеточные показатели, такие как состояние митохондрий, активность глюкозы-6-фосфат-дегидрогеназы, апоптоз фолликулярных клеток и уровень преобразовывающих факторов роста в фолликулярной жидкости отмечены как полезные индикаторы компетентности ооцитов и качества эмбрионов [Torner H. et al., 2008; Zhang Z. et al., 2019]. По сравнению с морфологическими параметрами,

эти клеточные и молекулярные предикторы качества ооцитов могут оказаться более точными и объективными. Необходимы также дальнейшие исследования и совершенствование технологий для применения в практике производства [Qiang Wang et al., 2006].

Ооцит-кумулясные комплексы крупного рогатого скота, используемые для созревания и оплодотворения *in vitro*, могут быть классифицированы по различным категориям с помощью световой микроскопии. De Loos et al., в 1989 году выделили четыре категории, основанные на компактности кумулюсных слоев и однородности, и прозрачности ооплазмы. Все категории ОКК были изучены на предмет их морфологических характеристик на ультраструктурном уровне и способности к развитию в системе созревания *in vitro*. В ооцитах 1 и 2 категорий органеллы распределены равномерно. В категориях 3 и 4 органеллы ооцитов были кластеризованы, и распределение органелл имитировало характеристики ооцитов во время окончательного созревания. Окончания кумулюсных клеток посредством щелевых контактов проникали в оболочку ооцита или располагались поверхностно к оболочке ооцита. Только ОКК с признаками дегенерации (категория-4) показали значительное снижение способности к созреванию *in vitro*. Категории 1–3 ооцитов показали равную развивающуюся способность в системе созревания *in vitro* [Vliet S. et al., 1989]. ОКК выделенные из яичников представляют кумулятивный результат роста и развития фолликулов, в зависимости от динамики фолликулярных волн [Boni R., 2012].

Значительные успехи в области производства эмбрионов крупного рогатого скота достигнуты бразильскими специалистами. Их опыт показал, что практическая трансплантация эмбрионов скота выходит на новый уровень за счет использования технологии получения эмбрионов *in vitro* [Мадисон В., 2018]. Очевидно, что передовой опыт бразильских специалистов по нетрадиционной технике получения телят требует внимательного изучения при экстраполяции в хозяйства Российской Федерации. Для этого необходимо изучение качественного состава российского поголовья крупного рогатого скота, и совершенствование методов манипуляций с

гаметами и эмбрионами сельскохозяйственных животных. Благодаря промышленному использованию эмбриотехнологий отечественное животноводство расширит свои возможности на мировом рынке, в том числе и в вопросе реализации племенного материала от высокопродуктивных самок, масштабная селекция которого проводилась несколько последних десятилетий [Сакса Е.И. и др., 2015; Племяшов К.В. и др., 2016; Прохоренко П.Н., 2012].

2.1.2 Генетические и физиологические особенности *Bos Indicus* и *Bos Taurus*

В мире насчитывается более 1000 пород крупного рогатого скота, происхождение которых идет от безгорбого (*Bos taurus taurus*) и горбатого (*Bos taurus indicus*) скота. Геномы этих подвидов имеют различия в митохондриальной ДНК и Y- хромосоме. Породы, произошедшие от *Bos taurus taurus*, лучше приспособлены к умеренному и холодному климату, а от *Bos taurus indicus* — к жаре [Ларкин Д.М., 2016]. Известно, что каждая порода имеет свои характерные особенности, в том числе репродуктивные. Показано, что качество и количество ооцитов, выделяемых из яичников коров различно в зависимости от породной принадлежности животных [Ротарь Л.Н., Souza J.F., 2018]. Разница в происхождении *Bos taurus* и *Bos indicus* подтверждена анализом нуклеотидных последовательностей мтДНК. Результаты свидетельствуют, что их дикие предки разошлись 200–1000 тыс. лет назад, т.е. за долго до доместикации, которая произошла 8–10 тыс. лет назад [Loftus R.T. et al., 1994]. Анализ полиморфизма полилокусных спектров ISSR-маркеров привел к выделению групп фрагментов, которые могут использоваться для маркирования видов *Bos taurus* и *Bos indicus* [Столповский Ю.А. и др., 2011]. Было показано, что даже при сходных экологических параметрах и условиях кормления, имеются существенные различия в физиологии яичников и в гормональном статусе между *Bos indicus* и *Bos Taurus*. Установлено, что зебувидный скот характеризуется более многочисленной когортой антральных фолликулов [Alvarez P. et al., 2000; Sartori R. et al., 2016; Varuselli P.S. et al., 2016; Sartori R., et al., 2013]. Это может быть связано с более высокой концентрацией инсулина и инсулиноподобного фактора роста-1

(IGF-1) у крупного рогатого скота *Bos indicus*, а также с метаболизмом стероидных гормонов [Sartori R. et al., 2013]. Проведены исследования, результаты которых показывают, что самки *Bos indicus* имеют больше фолликулярных волн в течение эстрального цикла [Viana J.H.M., 2000], и большее число фолликулов на волну чем у самок *Bos taurus* [Carvalho J.B.P. et al., 2008]. Так же было отмечено, что у зебувидного скота более многочисленная популяция антральных овариальных фолликулов диаметром 5 мм, чем у самок *Bos taurus* [Segerson E.C. et al., 1984]. Однако, у *Bos indicus* доминантные фолликулы и желтые тела (CL) меньше, а эструс короче по сравнению с самками *Bos taurus* [Sartorelli E.S. et al., 2005; Rhodes F.M. et al., 1995]. Среднее количество ооцит-кумулясных комплексов, полученных от коров Nelore за одну прижизненную аспирацию OPU, варьирует от 18 до 25 ОКК, что в три-четыре раза выше, чем среднее значение описанное для самок *Bos taurus* [Machado S.A. et al., 2006; Rubin K.C.P. et al., 2005; Martins A. et al., 2007]. Существует мнение, что в программах прижизненного забора яйцеклеток большее количество ооцитов получают от *Bos indicus* по сравнению с самками *Bos taurus*, но это лишь косвенно связано с количеством преантральных фолликулов в фетальной и постнатальной стадии развития зебувидного скота [Silva-Santosa K.C. et al., 2011]. Сравнительное исследование динамики фолликулярного развития у самок голштинской породы и телок Гур, при содержании в одинаковых условиях окружающей среды и питания, не выявило различий в длительности интеровуляторного промежутка. У телок голштинской породы, по отношению к телкам Гур в течение эстрального цикла наблюдается:

- меньшее количество фолликулярных волн ($2,8 \pm 0,2$ против $3,4 \pm 0,24$);
- меньшее количество антральных фолликулов ($27,7 \pm 2,2$ против $64,2 \pm 17,1$ фолликулов);
- больший диаметр овуляторных фолликулов ($15,0 \pm 0,4$ против $13,7 \pm 0,7$ мм); больший максимальный диаметр желтого тела ($26,9 \pm 0,5$ против $22,4 \pm 0,8$ мм).

Однако голштинские телки имели более крупные доминантные овариальные фолликулы ($7,9 \pm 0,3$ против $6,7 \pm 0,3$ мм) при сравнении с телками Gyr. [Baldrighi J.M. et al., 2014].

Характерные отличия между *Bos taurus* и *Bos indicus* могут оказывать влияние на результативность репродуктивных биотехнологий, таких как получение эмбрионов *in vitro*. В связи с выше изложенным, изучение репродуктивного потенциала коров *Bos Taurus* и *Bos indicus* с разной продуктивностью на основе исследования качества и количества ооцитов, представляет определенный научный и практический интерес.

2.1.3 Влияние возраста на качество ооцит-кумулюсных комплексов

Возраст донора ооцитов является значимым фактором, влияющим на компетентность развития ооцитов. Возрастные аномалии яйцеклеток включают:

- а) мейотическую некомпетентность, что приводит к неспособности яйцеклеток к оплодотворению;
- б) нарушения в мейозе, которые могут быть совместимы с оплодотворением, но приводят к генетическим аномалиям, которые ставят под угрозу жизнеспособность эмбриона;
- с) цитоплазматические дефекты, которые отражаются на стадиях развития до или после оплодотворения.

Современные системы производства эмбрионов *in vitro* позволяют яйцеклеткам очень молодых животных оплодотворяться и формировать эмбрионы, хотя и с несколько меньшей эффективностью по сравнению с яйцеклетками взрослых самок. Ооциты ювенильных доноров и эмбрионы, полученные из них, менее устойчивы к неоптимальным условиям культивирования *in vitro*, чем яйцеклетки более взрослых особей. Использование яйцеклеток коров-доноров старшего возраста может применяться для продления репродуктивной жизни отдельных возрастных самок, чье потомство имеет высокую коммерческую ценность, а также для сохранения генетических ресурсов редких пород скота и исчезающих видов. Снижение

компетентности ооцитов является основной причиной ухудшения фертильности с возрастом, также как и недостаточная функция эндометрия. [Armstrong T.D. et al., 2001]. Было изучено влияние возраста самки на количество копий митохондриальной ДНК (мтДНК), содержание АТФ и исход ЭКО с использованием ооцитов коров. Ооциты получали от коров в возрасте 20-204 мес, количество мтДНК определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Как количество мтДНК, так и содержание АТФ увеличивались в процессе созревания ооцитов. Возраст самки положительно коррелировал с уровнем аномального оплодотворения (24,3% - молодые коровы против 37,8% у коров старшего возраста, $P < 0,01$). [Iwata H. et al., 2011]. Изучены особенности и возрастные профили экспрессии генов в ооцитах и эмбрионах коров. Проведены комплексные исследования экспрессии генов ооцитов на стадии метафазы II, зародышевых пузырьков и эмбрионов 8-16 - клеточной стадии. У коров старшего возраста определена более высокая экспрессия генов, связанных с окислительным фосфорилированием, а также большее число бластоцист с низким общим числом клеток [Takeo S. et al., 2013]. Результаты исследования влияния возраста доноров Мюррей Грей × Брахман, на компетентность развития ооцитов и стероидные профили, при проведении ОРУ показали, что у молодых коров показатели дробления и образования бластоцисты были выше, чем у коров среднего и старшего возраста ($p < 0,05$). Концентрация эстрадиола была выше, а плазменная концентрация прогестерона была ниже у молодых коров по сравнению с аналогичными параметрами, в тот же период у коров среднего и старшего возраста ($P < 0,01$) [Su L. et al., 2009].

2.1.4 Связь морфофункционального состояния яичников с выходом ооцит–кумулюсных комплексов

В течение эстрального цикла в яичниках самок происходят морфофункциональные изменения, которые регулируются гормонами. В стадии фолликулярного роста, под действием ФСГ (фолликулостимулирующий гормон) индуцируется рост

антральных фолликулов и образование доминантного фолликула, а в период пика лютеинизирующего гормона – овуляция. Затем на месте проовулировавшего фолликула образуется желтое тело, основной функцией которого является синтез прогестерона (лютеиновая фаза). Прогестерон ослабляет пульсообразные выбросы ГнРГ (гонадотропин–релизинг гормон) и, тем самым, ингибирует новую овуляцию [Пташинская М., 2009; Gordon I., 2003]. В технологии получения эмбрионов крупного рогатого скота, *in vitro*, ОКК извлекаются из яичников на разной стадии эстрального цикла, из фолликулов разной категории, вследствие чего популяция полученных ооцитов мейотически гетерогенна. Процесс созревания морфологически интактных ооцитов - важнейший этап в технологии получения эмбрионов *in vitro*. Оценка жизнеспособности исходной популяции ооцит-кумулюсных комплексов на начальном этапе производства эмбрионов, является ключевым этапом для успешной реализации репродуктивного потенциала самок.

Выделение достаточного количества прогестерона желтым телом является определяющим фактором для наступления беременности. Установлено, что определение уровня стероидов в фолликулярной жидкости может быть перспективным для выявления коров, которые будут иметь хорошо развитое желтое тело и высокие уровни прогестерона (P4) в плазме в посттрансферном периоде. Характеристика ЖТ после аспирации фолликула может также использоваться в качестве ретроспективного показателя качества доминантных фолликулов. Эти результаты помогут выявить подходящих животных - реципиентов для переноса эмбрионов [Vernunft A. et al., 2013]. Изучена роль экзогенного прогестерона в администрировании концентрации прогестерона в плазме и его связь с частотой наступления беременности после переноса эмбрионов кроссбредным телкам *Bos taurus x Bos indicus* [Marques M.O. et al., 2012].

Локальное влияние желтого тела на метаболический состав фолликулярной жидкости (ФЖ) предполагает опосредованное действие на развитие овариальных фолликулов и качество ооцитов у самок молочного скота [Shabankareh H. K. et al., 2013]. Изучено влияние наличия или отсутствия желтого тела в постмортальных яичниках буйволов на компетентность ооцитов к последующему созреванию и

оплодотворению *in vitro*. Достоверная разница наблюдалась в скорости созревания между ооцитами хорошего (74%) и удовлетворительного (37%) качества. Однако существенной разницы в скорости дробления эмбрионов между этими группами не было [Singh S. et al., 2001].

Наличие ЖТ отрицательно влияет на концентрацию эстрадиола, а также на количество и качество фолликулов [Filho P. et al., 2014]. Некоторые авторы [Hajarian H. et al., 2016] указывают на отрицательный эффект присутствия ЖТ, что отражается на компетентности ооцитов к дозреванию, оплодотворению и доле эмбрионов, образующих бластоцисты, по сравнению с ооцитами из яичников без ЖТ. Присутствие ЖТ или его отсутствие в яичниках коров *post mortem*, на момент аспирации ооцит-кумулясных комплексов не влияло на процесс дозревания ОКК *in vitro* [Queiroz Neta L.V. et al., 2017].

Несмотря на то, что развитие фолликулов крупного рогатого скота хорошо изучено, особенно гонадотропин зависимой фазы, знания о влиянии фазы эстрального цикла (фолликулярной или лютеиновой), на качество ооцитов могут в значительной степени способствовать повышению эффективности ЭКО. В физиологических условиях ооцит, компетентный к оплодотворению образуется в интактных фолликулах на определенном этапе эстрального цикла. Однако ОКК, собранные для ЭКО, получают из фолликулов без учета фолликулярной фазы; следовательно, они могут подвергаться воздействию различных уровней эстрадиола, прогестерона, ФСГ и ЛГ. Кроме того, наличие функционального желтого тела в яичнике может влиять на количество и качество яйцеклеток. ЖТ связано с высокой васкуляризацией яичника, что может способствовать созданию оптимальной гормональной и питательной среды для развития фолликулов. На компетентность ооцитов из мелких фолликулов, также может влиять наличие доминантного фолликула [Penitente-Filho J. M. et al., 2015]. Предварительный отбор донорских яйцеклеток из яичников, содержащих ЖТ или на стадии фолликулярного роста, может быть использован как возможный неинвазивный критерий для получения наиболее компетентных яйцеклеток, способных к оплодотворению и дальнейшему развитию до стадии бластоцисты [Nasr-Esfahani M.H.H. et al., 2011].

2.1.5 SNP - ассоциированные маркеры воспроизводства крупного рогатого скота

Животноводы, в том числе производители племенного материала нуждаются в разработке эффективных и бюджетных программ тестирования потомства. Изменения в селекционных стратегиях и использовании репродуктивных методов, связанных с потребностями геномной селекции стимулируют разработку маркеров уровня продуктивности и воспроизводства крупного рогатого скота. Высокая фенотипическая изменчивость между самками – донорами (для производства эмбрионов *in vivo* и *in vitro*) не отражает их генетический потенциал, который может также быть использован для оптимизации результатов [Guyader J. C. et al., 2008; Merton J.S. et al., 2009]. Кроме того, потенциальная ценность генотипа животных, вероятно, приведет к необходимости разработки стратегий, позволяющих контролировать геном отобранных животных. Как только генотипирование будет повсеместным, ввиду ценовой доступности, фермеры смогут получать доступ к соответствующей информации о самке, что, вероятно, стимулирует спрос на эмбриотрансфер и трансвагинальный способ получения ооцитов - OPU (ovum pick up) [Humblot P. et al., 2010]. Получение компетентных к развитию ооцитов – один из главных факторов, обуславливающих успех метода получения эмбрионов. Прижизненная оценка коров-доноров в этом случае имеет большое значение [Пестис В.К. и др., 2015; Дешко А. С. и др., 2014]. Для улучшения хозяйственно полезных признаков, с применением геномной селекции, необходимо понимание взаимосвязи между геномной информацией и фенотипическими данными особи [Adjaye J. et al., 2005; Adjaye J. et al 2007; Evans A.C. et al, 2007; Ko M. S. H. et al.,2004].

Технологии секвенирования ДНК и анализа РНК становятся все более доступными и в настоящее время используются в исследовательских программах, направленных на изучение связи между генотипом и фенотипом. Целесообразно

проведение исследований, которые лучше характеризуют репродуктивную функцию. Например, взаимосвязь, между ростом, созреванием ооцитов и последующим эмбриональным развитием [Humblot P. et al., 2009]. С открытием технологии определения последовательности нуклеотидов ДНК всего генома появилась возможность анализа связи полиморфизма одиночных нуклеотидов – SNP (Single Nucleotide Polimorphism) с хозяйственно полезными признаками животных [Яковлев А.Ф., 2014].

Проведен анализ маркирования признаков воспроизводства молочного скота в связи с разработкой и внедрением геномной селекции. Поиск причинных мутаций расширяет очевидные возможности в повышении воспроизводительных качеств сельскохозяйственных животных. Включение в селекцию маркеров ассоциаций SNP с показателями воспроизводства, окажется весьма полезным для животноводства. В настоящее время заметный эффект на улучшение воспроизводства оказывают использование в селекции гаплотипов и генетических дефектов, отвечающих за эмбриональную гибель. Гаплотипы представляет собой комбинацию аллелей в разных местах хромосом, которые передаются как сцепленная группа [Племяшов К.В., Яковлев А.Ф., 2017]. Генетический фактор определяет качество и количество ооцитов в фолликулах наряду с кормлением, содержанием и интактностью репродуктивной системы КРС. Отбор доноров осуществляется, как правило, только после оценки качества полученных ооцитов. Определение одиночных нуклеотидных полиморфизмов в генах крупного рогатого скота, связанных с репродуктивным статусом, и оценка связи между SNP и количеством и качеством ооцитов позволит дополнить критерии селекции коров-доноров. Отбор животных с использованием ДНК-маркеров может значительно повысить точность оценки донора. Критериями выбора гена-кандидата является влияние гена на физиологические процессы, место в метаболических путях и локализацию вблизи уже описанных локусов количественных признаков (QTL – Quantitative Trait Loci) [Юдин Н.С. и др., 2015]. Meuwissen Т.Н. с соавторами разработали методологию аналитической оценки племенной ценности на основе ДНК-маркеров, которые охватывают весь геном живот-

ного. Метод заключается в использовании генетико-статистического анализа (линейный несмещенный прогноз или BLUP – best linear unbiased prediction) для каждого SNP-маркера. Определяются значение и его доля в общей племенной ценности (Total Breeding Value, TBV). Таким образом, геномная оценка (Total Genomic Breeding Value, TGBV) животного складывается из суммирования показателей общего индекса племенной ценности с учетом коэффициентов значимости каждого SNP – маркера [Селионова М.И. и др., 2014]. Идентификация полиморфизма SNP, для конкретных генов участвующих в воспроизводстве, повысит надежность геномных оценок, для репродуктивных признаков с низкой наследуемостью [Cochran S. D. et al., 2013]. Главными регуляторами овариальной функции у млекопитающих являются гормоны гипофиза и гипоталамуса. В передней доле гипофиза вырабатываются гормоны соматотропин и пролактин, играющие важную роль в организме млекопитающих [Грин Н. и др., 1990]. В период эмбрионального развития аденогипофизом вначале экспрессируется ген, ответственный за синтез белка гипофизарного фактора транскрипции-1 (*Pit-1*), являющегося активатором гена пролактина (*PRL*), соматотропина (*GH*) и тиреотропного гормона. Мутация этого гена сопровождается недостаточностью пролактина, соматотропина и тиреотропного гормона [Лычкова, А. Э. и др., 2014]. Поэтому изучение полиморфизма генов *GH*, *PRL*, *Pit-1* у молочного скота представляет научный и практический интерес.

2.1.5.1 Полиморфизм гена *GH* и частота встречаемости в популяции

В организме млекопитающих соматотропный гормон играет важную роль в аспектах контроля репродукции, которые связаны с делением клеток, фолликулогенезом яичников, оогенезом и секреторной активностью [Gong J.G. et al., 2000; Hull K.L. et al., 2002; Ola S.I. et al., 2008; Schams D. et al., 1999]. Действуя через специфические рецепторы в яичнике, соматотропин контролирует синтез ДНК, пролиферацию и апоптоз фолликулярных клеток, созревание ооцитов, а также экспрессию и синтез рецепторов к гормонам и родственным веществам [Лебедева И.Ю. и др. 2000; Hull K.L. et al., 2002; Schams D. et al., 1999; Sirotkin A.V. et al., 2003]. Обнаружено, что добавление бычьего соматотропина в среду для созревания

ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*, индуцирует экспансию кумулюса и ускоряет ядерное созревание, способствуя последующему оплодотворению, дроблению и раннему эмбриональному развитию, и в итоге увеличению количества бластоцист [Izadyar F. et al., 1996; Izadyar F. et al., 1998; Joudrey E.M. et al., 2003; Pers-Kamczyc E. et al., 2010]. Показано, что эффект соматотропина на функцию яичников в основном определен за счет индуцирования развития малых антральных фолликулов (на стадиях, связанных с гонадотропином) и стимулирования созревания ооцитов [Silva J.R.V. et al., 2009]. Ген гормона роста (*GH*) локализован в области q26 хромосомы 19, и состоит из 5-ти экзонов и 4-х интронов [Hediger R. et al., 1990]. В гене *GH* идентифицировано несколько мутаций. Наиболее изучена мутация в пятом экзоне, которая представляет собой C→G трансверсию приводящую к замене аминокислоты лейцин (Leu) на валин (Val) [Lucy M.C. et al., 1993]. В исследованиях на голштино-фризских коровах отмечена высокая частота аллеля L – 0,93 [Kovacs K. et al., 2006] и 0,94 [Misrianti R. et al., 2012]. Hadi Z. и соавторы установили в группе голштинских коров частоту аллеля L 0,69 [Hadi Z. et al., 2015].

2.1.5.2 Полиморфизм гена *PRL* и распространение в популяции

Пролактин – белковый полипептидный гормон, который синтезируется в передней доле гипофиза клетками – лактотрофами [Freeman M.E. et al., 2000] а также другими тканями, такими как молочная железа, плацента, центральная нервная система и иммунная система (лейкоциты, лимфоциты) [Gala R.R., et al., 1994]. Пролактин активно участвует в процессах, связанных с размножением, регуляции поведения, иммуномодуляции, осмомодуляции, регуляции роста и обмена веществ в организме. Он избирательно действует на молочные железы, стимулирует их развитие, а также стимулирует синтез компонентов молока (белка и лактозы) во время лактации [Максимов В.Н., 2013; Sinha Y.N. et al., 1995]. Показано положительное влияние пролактина на компетентность ооцитов к оплодотворению [Nivet A.L. et al., 2013]. Ранее было отмечено, что более высокая концентрация пролактина в фолликулярной жидкости положительно коррелирует с ранней атрезией. Более низкая

концентрация пролактина связана с наличием пикнотических ядер в клетках гранулезы, что является показателем поздней стадии гибели клеток и фолликулярной атрезии [Heleil B. et al., 2010; Lebedeva I.Y. et al., 1998]. Обработки пролактином крыс *in vivo* приводили к увеличению числа атретических фолликулов [Besnard N. et al., 2001]. Ген *PRL* крупного рогатого скота локализован на 23 хромосоме и состоит из 4-х интронов и 5-ти экзонов. В третьем экзоне изучена синонимичная А→G-транзиция, приводящая к появлению полиморфного RsaI-сайта [Cooke N.E. et al., 1981]. В группе черно-пестрых коров частота аллеля А составила 0,74 [Часовщикова М.А., 2012] у польских коров голштино-фризской породы – 0,58 [Katarzyna W.M. et al., 2008].

2.1.5.3 Полиморфизм гена *Pit-1* и частота встречаемости в популяции

Ген *Pit-1* крупного рогатого скота расположен в цетромерной зоне первой хромосомы между локусами TGLA57 и RM95 [Moody D.E. et al., 1995] и является членом POU-домена, в который входит группа транскрипционных регуляторов, играющих важную роль в дифференциации и пролиферации клеток [Mangalam H.J. et al., 1989]. В шестом экзоне определяется точечная мутация А→G, которая приводит к замене аденина на гуанин [Woollard J., et al., 1994].

Фактор транскрипции *Pit-1* осуществляет контроль транскрипции гена пролактина, соматотропина, рецептора соматотропин-рилизин гормона, бета-субъединицы тиреотропного гормона и бета-субъединицы рецептора тиреоидного гормона [Naugen B.R. et al., 1993]. В настоящее время активно изучается полиморфизм гена *Pit-1* и его влиянию на хозяйственно полезные признаки животных. Но при этом недостаточно изучена ассоциация данного гена с качеством гамет самок крупного рогатого скота молочного направления продуктивности. Известно, что при полиморфизме гена *Pit-1* среди различных пород скота молочного направления наблюдается преобладание аллеля В, например, в исследованиях Дроздова Е.В. и др., 2011 показано, что у черно-пестрых коров частота аллеля В составила 0,88, а среди

айрширских – 0,77. Некоторыми авторами установлено положительное влияние гена *Pit-1* на рост и развитие животных [Xue K. et al., 2006; Renaville R. et al., 1997].

2.1.5.4 Полиморфизм гена *FSHR*

Одним из потенциальных генов-кандидатов репродуктивного здоровья коров может являться ген рецептора фолликулостимулирующего гормона (*FSHR*) [Simoni M. J. et al., 1999]. Рецепторы *FSHR* расположенные в половых железах, играют важную роль в репродуктивной физиологии [Chan W. et al., 1998]. Сигнальные факторы между ооцитом и соматическими клетками овариального фолликула регулируют дифференцирование фолликулярного развития, а, следовательно, развитие ооцита компетентного к оплодотворению и последующему эмбриогенезу [van den Hurk R. et al., 2000]. Изменения в молекулярной структуре гена *FSHR* вызывают десенсибилизацию рецептора фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в клеточной мембране, что приводит к менее эффективной передаче гормонального сигнала [Huhtaniemi et al., 1998]. В гене *FSHR* было обнаружено несколько полиморфных сайтов, и у молочного скота были описаны значительные ассоциации между вариантами *FSHR* с параметрами продуктивности и фертильности [Yang W. et al., 2010; Sosa A.S.A. et al., 2015]. Также в работе авторов Caixeta E. S. et al., 2009 показано, что ген *FSHR* можно рассматривать как маркер компетентности к оплодотворению ооцит-кумулясных комплексов коров. Ген *FSHR* расположен в 11 хромосоме крупного рогатого скота, и его структура определяется 10 экзонами и 11 интронами [Houde A. et al., 1994].

2.1.6 Роль интрафолликулярных факторов в гаметогенезе самок крупного рогатого скота

Потенциал развития ооцитов в значительной степени зависит от ионного состава фолликулярной жидкости, уровня метаболитов и гормонального профиля.

Фолликулярный антрум заполнен жидкостью, которая омывает ооцит – кумулюсный комплекс и является источником питательных веществ, а также влияет на физиологические, биохимические и метаболические аспекты ядерного и цитоплазматического созревания яйцеклетки и процесс овуляции. Механизмы накопления жидкости в антральной полости овариальных фолликулов пока окончательно не выяснены, однако предполагается, что фолликулярная жидкость (ФЖ) выводится из крови. Фолликулярная жидкость является показателем обмена веществ между ооцитом и соматическими клетками фолликула и их секреторной деятельности. Хотя есть видовые отличия в составе жидкости овариальных фолликулов по концентрации глюкозы, холестерина, кальция, фосфора, натрия, общего белка, мочевины, триглицеридов, хлорида калия и магния, щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы. Помимо этого присутствуют различия в уровне гормонов ФСГ, ЛГ, эстрадиола, тестостерона, прогестерона, гормонов щитовидной железы. Однако, множество факторов роста и местных факторов присутствующих в фолликулярной жидкости могут оказывать влияние на качество ооцита и последующее развитие эмбриона [Tripathi S.K. et al., 2015].

2.1.6.1 Биохимический состав жидкости овариальных фолликулов коров

Развивающийся ооцит располагается в окружении фолликулярной жидкости, которая является продуктом переноса компонентов плазмы крови, через фолликулярный барьер и секреторной деятельности клеток теки и клеток гранулезы. Она создает уникальную среду, которая обеспечивает защиту ооцит-кумулюсного комплекса от процессов гидролиза белков, а так же участвует в процессе экструзии во время овуляции [Richards J.S. et al., 1998], действуя как буфер против неблагоприятного влияния компонентов крови [Gosden R. et al., 1988]. 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 [Revelli A. et al., 2009]. 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 [Arshad H.M. et al., 2005], а также с уровнем апоптоза соматических фолликулярных клеток [Ротарь, Л.Н. и др., 2017; Dalai, N. et al., 2017; Yilmaz, O. et al., 2016]. Однако в целом, четкого соответствия между измеряемыми конкретными биохимическими характеристиками ФЖ и качеством ооцитов до настоящего времени не установлено [Revelli A. et al., 2009]. 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, поскольку они являются формой хранения липидов, и источником энергии для развития фолликулов [Leroy J.L. et al., 2005]. Так же известно, что источником яичниковых гормонов является созревающий фолликул, где клетки гранулезы вырабатывают эстрогены, предшественником которых является холестерин. В яичниках большинство ооцитов покоятся в виде первичных гамет в примордиальных фолликулах, которые содержат несколько клеток гранулезы. Как только фолликулы активируются, морфология клеток гранулезы изменяется, и происходит их митотическое деление, в результате которого образуется многослойное окружение ооцита. На стадии преантрального фолликула образуется антральная полость, которая заполнена фолликулярной жидкостью. Взаимодействия между ооцитом, фолликулярными соматическими клетками и фолликулярной жидкостью, имеют решающее значение для роста и завершения мейотического созревания гаметы [Dumesic D.A. et al., 2015]. Во время роста ооцитов, повышается степень ацетилирования гистонов при конденсации хроматина. Энергообеспечение осуществляется в результате высокого потребления АТФ, так же за счет ацетилирования протеина в клетках [Morrish F. et al., 2010; Ghanta S. et al., 2013]. Количество клеток гранулезы, которые создают микроокружение ооцита, является определяющим фактором для

его энергетического состояния [Hisataka I. et al., 2016]. Было установлено, что количество клеток гранулезы положительно коррелирует с увеличением липидов, АТФ и гистонов, а также уровнем их ацетилирования в ооцитах, прокультивированных *in vitro* [Sugiyama M. et al., 2016; Munakata Y. et al., 2016; Itami N. et al., 2017]. В жидкости овариальных фолликулов так же содержатся протеины, пептиды, аминокислоты, и молекулы с антиоксидантными и антиапоптотическими свойствами [Revelli A. et al., 2009]. Дисбаланс в прооксидантной и антиоксидантной способности фолликулярной жидкости некоторыми авторами рассматриваются, как причина низкого качества ооцитов [Dumesic D.A. et al., 2015].

2.1.6.2 Роль соматических фолликулярных клеток, апоптоз клеток гранулезы

В последние годы у исследователей повысился интерес к процессу апоптоза, протекающему в репродуктивных органах самок, в частности тканях матки и яичников. Интересна роль апоптоза в развитии фолликулов и их атрезии, какова его интенсивность в течение полового цикла, и какое влияние на него оказывают гормоны. Однако имеющиеся в научной литературе сведения малочисленны, выполнены на разных видах животных и нередко носят противоречивый характер. Более всего подверженными апоптозу, связанному с атрезией фолликулов, являются клетки гранулезы [Зенкина В.Г. и др., 2010]. Позднее апоптоз обнаруживается в клетках теки [Tilly et al., 2004], хотя некоторые авторы считают, что апоптоз характерен, как правило, для клеток гранулезы, но не для клеток теки [Sato E. et al., 2006]. Вероятно, клетки теки оказывают антиапоптотическое действие на клетки гранулезы. В подтверждение этой гипотезы клетки гранулезы коров при совместном культивировании с тека-клетками дольше не подвергались апоптозу, индуцированному дефицитом питательных веществ. Множественные исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что апоптоз в клетках гранулезы может быть ингибирован различными факторами роста, прогестероном, эстрогенами и гонадотропинами. И наоборот, проапоптотическим действием обладают различные цитокины, андрогены и

ГнРГ [Tilly J.L. et al., 2004]. Установлено, что в жидкости преантральных фолликулов коров по мере увеличения размеров и развития фолликула до преовуляторной стадии уровень эстрадиола возрастает. В преовуляторных фолликулах эстрадиол перестает синтезироваться клетками гранулезы и заменяется прогестероном только перед овуляцией. Это показывает, что эстрадиол играет важную роль в процессе фолликулогенеза и овуляции. Стероиды синтезируются клетками гранулезы. Антральные фолликулы отбираются для овуляции или для атрезии. В процессе фолликулярного роста уровень тестостерона в фолликулярной жидкости снижается. Андрогены синтезируются клетками теки и являются обязательным субстратом для биосинтеза эстрогенов, а также могут играть роль в фолликулярной атрезии. Критерием, определяющим атрезию фолликула, является уровень стероидов в фолликулярной жидкости [Gordon I., 2003]. Высокие концентрации прогестерона, тестостерона и андростендиона, по сравнению с более низкой концентрацией эстрадиола, соответствуют большей доле ооцитов, достигших метафазы II и компетентности к оплодотворению *in vitro* [Bousquet D. et al., 1988]. Популяция донорских ооцитов, выделяемых из яичников животных, гетерогенна как по морфологическим параметрам (количество слоев окружающих ооцит клеток кумулюса, структура ооплазмы, степень экспансии клеток кумулюса), так и по функциональному состоянию. Применение в качестве зонда для прижизненного тестирования ооцитов красителя бриллиантового кристаллического голубого (BCB) – индикатора активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, позволяет оценивать функциональный статус донорских ооцитов животных: растущие или завершившие фазу роста [Oriola J. et al., 2013].

2. 1.7 Связь уровня молочной продуктивности коров и качества ооцитов

Молочная продуктивность коров неуклонно растет благодаря сочетанию улучшенного управления, лучшего питания и интенсивного генетического отбора. Установлено, что коровы с наибольшей молочной продуктивностью имеют самую

высокую частоту бесплодия, однако исследования показывают, что, помимо производства молока, другие факторы, так же, снижают репродуктивную эффективность молочных стад. Репродуктивная физиология молочных коров и ее адаптация к высокой молочной продуктивности может частично объяснить снижение фертильности [Lucy M.C. et al., 2001]. Интенсивный генетический отбор привел к появлению современных молочных коров с очень высокими надоями молока, но сниженной фертильностью, в основном из-за увеличения репродуктивных нарушений. Проводились исследования с целью оценки доли репродуктивных нарушений среди молочного скота. Результаты показали, что частота нарушений репродуктивной функции у высокопродуктивных молочных коров была преобладающей, что проявлялось более длительными интервалами от отела до плодотворного осеменения и наличием кист яичников [Hyun-Joo Lim et al., 2015]. У молочного скота наблюдается антагонистическая связь между производством молока и фертильностью, что соответствует эволюционной гипотезе адаптивного компромисса. Большая часть этой ассоциации генетически обусловлена. Достижения в геномике и связанные с ней знания, а также введение персонафицированного управления поголовьем, предполагают, что проблемы антагонистических отношений между производством молока и воспроизводством у крупного рогатого скота могут поддаваться коррекции [Berry D.P. et al., 2016]. Появляется все больше свидетельств того, что качество яйцеклеток и эмбрионов является основными факторами в сложном патогенезе репродуктивных нарушений высокопродуктивного скота влияющими на фертильность высокопродуктивных молочных коров. Проведены исследования возможных механизмов, показывающие влияние отрицательного энергетического баланса (NEB) на развитие яйцеклеток и эмбрионов, в частности, у высокопродуктивных молочных коров. В период фолликулярного роста NEB может косвенно повлиять на качество ооцита. Эндокринные и биохимические изменения, которые связаны с NEB, отражаются на микроокружении растущей и созревающей женской гаметы и, вероятно, приводят к овуляции некомпетентного к оплодотворению ооцита. Помимо исследования влияния отрицательного энергетического баланса и

связанных с ним эндокринных и метаболических изменений на воспроизводительную функцию, большое внимание уделяется влиянию кормовых рационов богатых энергией и белком, которые могут повысить концентрацию аммиака и мочевины в крови, что приводит к изменению внутрифолликулярной, овидуктальной и маточной сред [Leroy J.L.M.R. et al., 2008]. Изучено влияние удоя, физического состояния животного по BCS и количества лактаций на количество ОКК и сформированных бластоцист, после созревания *in vitro*, оплодотворения и культивирования ооцитов, собранных у молочных коров высокой и средней генетической ценности, в первую и третью лактацию. Из ооцитов коров с высокой генетической ценностью образуется меньше бластоцист, чем у животных средней генетической ценности. Эффект молочной продуктивности проверяли путем группирования коров в третьей лактации в высокопродуктивные и низкопродуктивные группы. Не было никакой разницы в количестве полученных ооцитов и последующего развития бластоцист между группами коров с высокой молочной продуктивностью (4559 до 5114 кг, $n = 20$) и коров с низкой продуктивностью (3162 в 3972 кг, $n = 20$), 6.9 ± 1.34 против 8.9 ± 1.32 , соответственно. Таким образом, плохое качество яйцеклеток является причиной снижения фертильности, что часто проявляется у молочных коров с высокой генетической ценностью [Snijers S.E.M. et al., 2000]. Интенсивный генетический отбор привел к появлению современных молочных коров с очень высокими надоями молока, но сниженной плодовитостью, в основном из-за увеличения репродуктивных нарушений. Исследование Hyun-Joo Lim et al., 2015 проводилось с целью оценки доли репродуктивных нарушений у молочного скота. Результаты показали, что частота нарушений репродуктивной функции у высокопродуктивных молочных коров была преобладающей.

2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Объекты и материалы исследований

Исследования проводились в период 2016-2019 гг. на кафедре генетики, разведения и биотехнологий ФГБОУ ВО Санкт-Петербургского государственного аграрного университета и во Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и разведения сельскохозяйственных животных - филиала федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л. К. Эрнста». В экспериментах использовали коров и телок 4 пород: абердин-ангус (n=324), черно-пестрые голштинизированные (n=131), nelore (n=92), gir (n=63).

Выборки формировались по методу сбалансированных групп с учетом даты рождения. Данные о молочной продуктивности получены из племенных карточек (форма 2-МОЛ).

Материалом для исследований послужили:

1. гаметы и соматические клетки овариальных фолликулов коров и телок черно-пестрой голштинизированной породы, *post mortem*;
2. ооцит-кумулюсные комплексы коров и телок породы абердин-ангус и зебувидного скота, полученные в результате прижизненной пункции овариальных фолликулов;
3. эмбрионы коров и телок абердин-ангусской породы на доимплантационной стадии, полученные путем культивирования *in vitro*;
4. образцы ткани яичника для выделения ДНК и последующего генетического анализа. В экспериментах использовали яичники коров и телок черно-пестрой, голштинизированной породы *post mortem*;
5. фолликулярная жидкость для биохимического анализа.

Исследования проводили в соответствии со структурно-логической схемой экспериментов, представленной на рисунке 1.

2.2.2. Методы исследований

В работе были использованы: прижизненный метод получения ооцит-кумулясных комплексов - ОКУ, и выделение ОКК из яичников животных после убоя (*post mortem*).

2.2.2.1. Прижизненное получение ооцит–кумулясных комплексов

Животное во время проведения манипуляции забора ОКК фиксируется в станке. Затем проводится каудальная анестезия с целью снижения болевых ощущений и уменьшения перистальтики. Из прямой кишки удаляются каловые массы и проводится гигиеническая обработка наружных половых органов. Оператор фиксирует яичник во время аспирации через прямую кишку. Пункция фолликулов проводится с использованием ультразвукового сканера, ультразвукового излучателя с частотой 7,5 MHz, вакуумной помпы, пункционной насадки, иглы диаметром 18G. Давление в аспирационной системе при заборе ооцитов не превышало 50 мм рт.ст., т.к. более высокое давление ухудшает качество ОКК, травмируя кумулюс и разрушая щелевые контакты [Ward F.A. et al., 2000]. В качестве промывной жидкости используют фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 100 ед/мл гентамицина и 1% BSA. Локализацию ооцит-кумулясных комплексов проводят с помощью сетчатого фильтра, визуализацию и оценку качества полученных ооцитов осуществляют под оптической лупой.

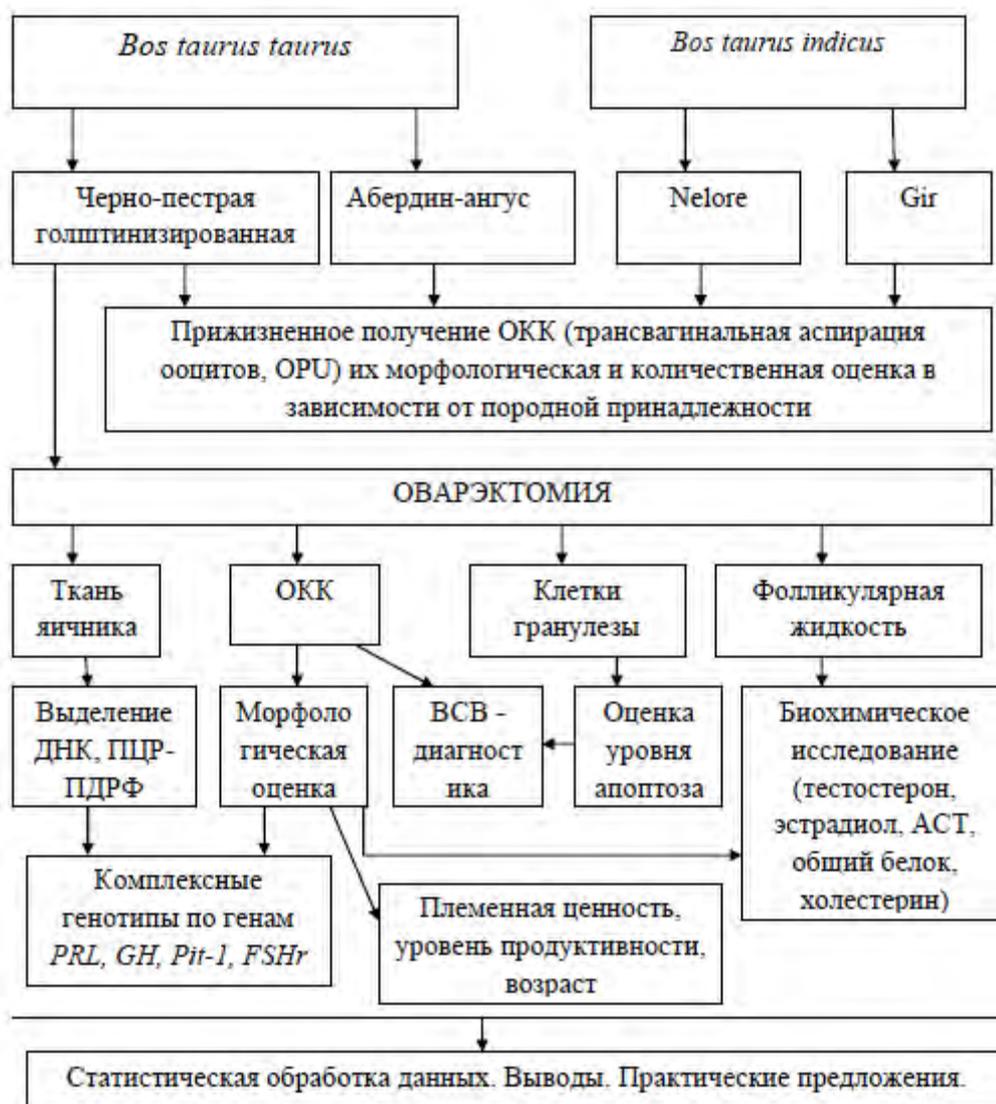


Рисунок 1. Структурно-логическая схема экспериментов

С целью изучения влияния породной принадлежности на качество и количество гамет, нами были сформированы следующие группы самок: *Bos Taurus taurus*, мясное направление продуктивности, абердин-ангусская порода $n=82$ (Российская Федерация); *Bos Taurus taurus*, молочное направление продуктивности черно-пестрая голштинизированная порода $n=62$ (Российская Федерация); *Bos Taurus indicus*, мясное направление продуктивности Nelore $n=149$ (Бразилия), *Bos Taurus indicus*, молочное направление продуктивности Gir $n=63$ (Бразилия). Процедуры забора ооцитов методом OPU проводили в период с декабря 2017 по февраль 2018 года.

Исследование ассоциации возраста мясного скота с характеристикой ОКК и последующим выходом предимплантационных эмбрионов, полученных *in vitro*, проводили на базе хозяйства в Брянской области, осуществляющее чистопородное разведение крупного рогатого скота абердин-ангусской породы, с использованием группового подбора, с целью повышения мясных и откормочных качеств. В качестве доноров ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) использовалось 153 коровы-донора в возрасте 2-2,5 года и 171 телка 12 месячного возраста. Забор ооцит - кумулюсных комплексов осуществлялся с применением ОРУ. Дозревание ооцитов, капацитацию сперматозоидов, оплодотворение и культивирование ранних зародышей проводили в каплях, под минеральным маслом в чашке Петри диаметром 35 мм, с использованием коммерческих сред, методом культивирования, общепринятым в ЭКО [Элдер К., 2008]. Культивирование ранних зародышей проходило в течение 7-10 дней с использованием планшетного лабораторного инкубатора «Эмбриоплан» при 38,5°C, в присутствии трехкомпонентной газовой смеси 6% - CO₂, 5% - O₂, 89% - N₂.

2.2.2.2 Выделение ОКК из яичников животных после убоя (*post mortem*)

Сразу после убоя животного из теплой туши, проводили извлечение яичников (оварэктомия). Яичники доставляли в лабораторию при температуре 36-37°C в течение 1 часа. Доставка биологического материала в лабораторию является важной составляющей в получении ооцитов, пригодных к этапам технологии получения эмбрионов *in vitro*. В лаборатории проводилась идентификация и маркировка биологического материала. Яичники освобождали от остатков яйцеводов и троекратно промывали в стерильном, теплом 0,9% растворе NaCl, после чего помещали в чашку Петри, в небольшом количестве среды TC-199. При морфологической оценке отбирали яичники на стадии фолликулярного роста и лютеиновой стадии (наличие желтого тела), без видимой патологии (рис.2). Яичники с признаками истощения (отсутствие видимых фолликулов) исключали из исследования. Из пост-

мортальных яичников ОКК выделяют, применяя как аспирацию овариальных фолликулов, так и резекцию самого яичника. Иногда эти методы применяют последовательно.

При определении, влияния возраста самок крупного рогатого скота молочного направления на ОКК использовали коров и телок черно-пестрой голштинизированной породы из хозяйств Ленинградской области (n=81). Ооцит кумулюсные комплексы были получены в результате овариальной резекции.

В экспериментах по характеристике ОКК выделенных из яичников с различным морфофункциональным состоянием было исследовано 75 яичников самок черно-пестрой голштинизированной породы *post mortem*.



Рисунок 2. Интактные яичники коров и телок черно-пестрой голштинизированной породы, отобранные для экспериментов

Исследование распределения генотипов проводилось в период 2017-2018 года в лабораториях ФГБОУ ВО СПбГАУ и ВНИИГРЖ ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Выборку составили животные (n=69) голштинизированной черно-пестрой породы, из трех хозяйств Ленинградской области (21 голова, 39 голов и 9 голов), выбракованных по причине заболеваний вымени и конечностей. Биологические образцы получены в период с декабря 2017 года по февраль 2018 года в результате резекции 138 яичников *post mortem*.

2.2.2.3 Аспирация жидкости овариальных фолликулов и ее биохимический анализ

Аспирация жидкости из овариальных фолликулов разного диаметра с хорошим тургором и обширной васкуляризацией осуществлялась при помощи шприца, объемом 2,0 мл с иглой диаметром 0,18 мм. После аспирации ФЖ, с предположительно содержащимся в ней ОКК, помещали в 6-луночный планшет, в центр лунки (1 лунка – 1 капля ФЖ). После окончания аспирации каждую порцию ФЖ исследовали на наличие ОКК проводя его морфологическую оценку. Затем фолликулярную жидкость собирали в маркированные пробирки объемом 2,0 мл для проведения биохимического исследования, которое проводилось с использованием биохимического анализатора ARCHITECT - C8000. В пробах фолликулярной жидкости определяли концентрацию холестерина и триглицеридов, а также активность фермента аспаратаминотрансферазы (АСТ). Последующее выделение ОКК с целью их морфологической оценки (жизнеспособности) производили путем резекции яичников.

При исследовании биохимического профиля жидкости овариальных фолликулов, самки черно-пестрой голштиinizированной породы были разделены на 2 группы в соответствии с количеством жизнеспособных ОКК $< 50\% >$ от общего числа выделенных ОКК. Исследовали 42 яичника от 21 животного. Возраст коров в обеих группах варьировал от 2 до 6 лет. Для сбора биологического материала использовали метод аспирации фолликулярной жидкости с последующей овариальной резекцией для выделения ОКК.

2.2.2.4 Овариальная резекция

Выделение ооцит-кумулясных комплексов, с целью морфологической оценки, производили путем овариальной резекции [Голубец Л.В. и др., 2010]. Для этого яичник помещали в чашку Петри в среду ТС-199 и разрезали его многолезвенной бритвой на сегменты толщиной 1-2 мм. (рис.3). Затем, фрагменты яичника

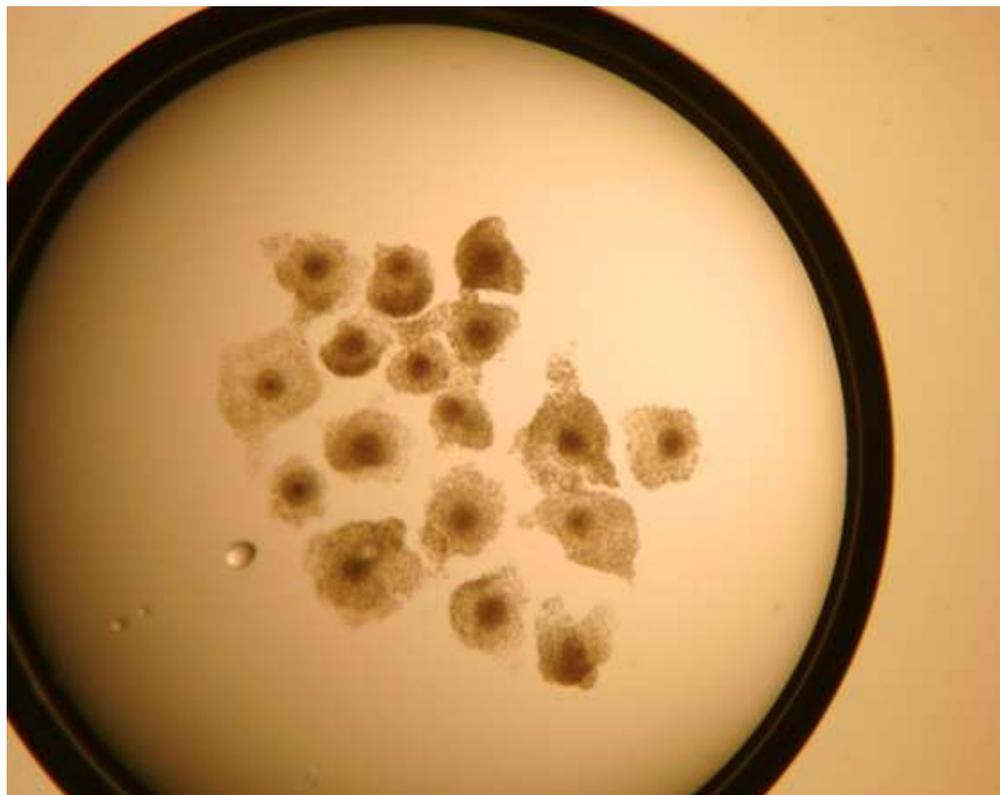
промывались в среде, после чего она исследовалась на наличие гамет. Визуализацию ОКК осуществляли с использованием стереоскопического микроскопа МСП-1 или МБС-10.



Рисунок 3. Резекция яичника при выделении ооцит-кумулюсных комплексов

2.2.2.5 Морфологическая оценка ооцит-кумулюсных комплексов крупного рогатого скота

Принимая во внимание ранее описанные критерии, ОКК были разделены на две категории: жизнеспособные (морфологически-полноценные) и не жизнеспособные. Ооцит-кумулюсные комплексы, имеющие 1 и более слоев компактного кумулюса, серую, гомогенную ооплазму, равномерную по ширине ZP, нормальный размер (110-120мкм) и тургор, были определены как морфологически полноценные (жизнеспособные) (рис.4). Денудированные ооциты или ОКК, имеющие кумулюс с признаками дегенерации, ооциты с черной или прозрачной ооплазмой, расширенной ZP размером менее 110мкм, плохим тургором и деформированные, считались не жизнеспособными (рис.5). Учитывались следующие показатели: общее количество ОКК, ОКК среднее на один яичник, количество жизнеспособных ОКК, среднее количество жизнеспособных ОКК на один яичник.



**Рисунок 4. Жизнеспособные (морфологически-полноценные)
ооцит-кумулюсные комплексы крупного рогатого скота**

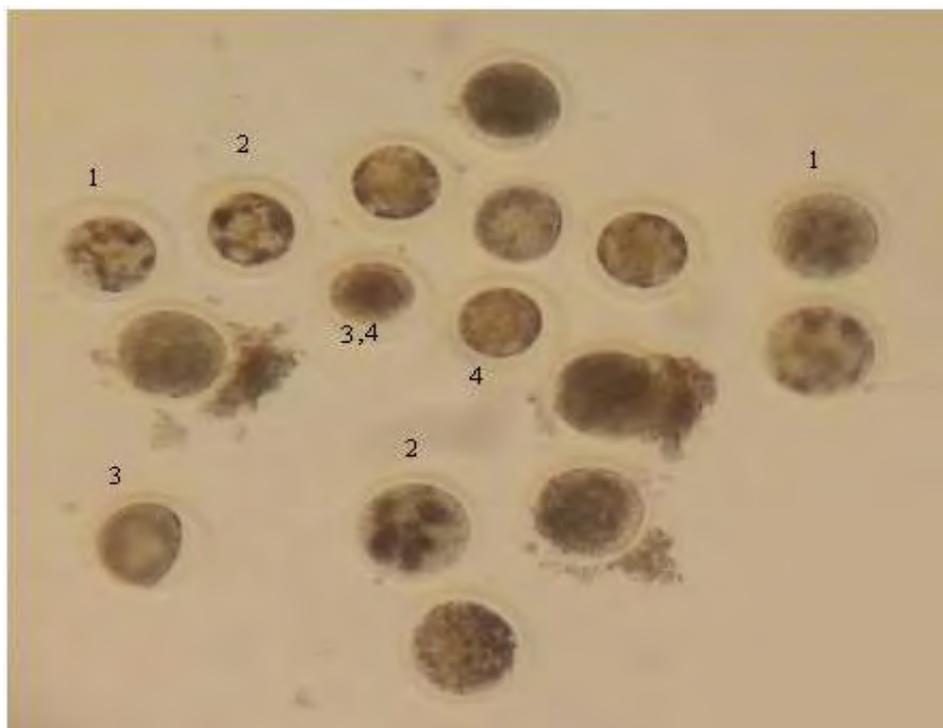


Рисунок 5. Не жизнеспособные ооциты крупного рогатого скота (1-денудированные, 2- с признаками дегенерации, 3- деформированные, 4-имеющие расширенную зону пиллюцида)

2.2.2.6 Выделение ДНК из ткани яичника

В процессе резекции яичников делался небольшой срез овариальной ткани, который помещался в пробирку объемом 2 мл. и покрывался 96% этиловым спиртом. Пробирка с биологическим образцом подлежала маркировке (рис.6). Ткань яичников являлась материалом для выделения ДНК фенольным методом [Терлецкий и др., 2014], который включает в себя этапы: лизис клеток, лизис клеточного ядра, удаление ингибиторов, инактивация клеточных нуклеаз, отделение ДНК от клеточной массы, очистка и растворение ДНК



Рисунок 6. Овариальная ткань для выделения ДНК

Протокол выделения ДНК:

1. В пробирку объемом 2 мл помещали образец овариальной ткани с добавлением 1000 мкл буфера (10мМ трис HCl – 10мМ NaCl – 10мМ ЭДТА).
2. Центрифугировали 2 мин. при 12000 об/мин. Супернатант удаляли.
3. Затем, к образцу добавляли 500 мкл буфера, протеиназу К (20мг/мл до конечной концентрации 100 мкг/мл) и 10% SDS.
4. Инкубировали смесь при 56°C 2 часа.
5. В пробирку добавляли равный объем водного раствора фенола (pH=8,0), перемешивали 10 мин с использованием прибора MultiRotator, центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин.
6. В чистую пробирку переносили верхнюю водную фракцию, содержащую ДНК.
7. К водному раствору ДНК добавляли NaCl до концентрации 0,2М и два объема холодного 96%-ного этанола, перемешивали.
8. Центрифугировали 2 мин при 12000 об/мин для осаждения ДНК, надосадочную жидкость удаляли.

9. Добавляли 1 мл 76%- го этилового спирта, перемешивали в течение 10 мин., повторно центрифугировали 2 мин 12000 об/мин, надосадочную жидкость сливали.
10. Пробирки с ДНК подсушивали в термостате при 37°C до полного испарения спирта. Образцы хранили при -20°C. Концентрацию и степень чистоты образцов определяли с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.2.7 ПЦР-ПДРФ анализ

Генотипирование по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR* осуществляли методом ПЦР-ПДРФ. В стандартной ПЦР выделяют несколько этапов: денатурация ДНК при 95°C, отжиг (гибридизация) праймеров (55-65°C), достройка праймеров (72°C). Циклы повторяются 30-40 раз. При этом происходит экспоненциальное увеличение количества амплифицируемой ДНК. Перед первым циклом выдерживают смесь 5 минут при 95°C (горячий старт), а после последнего цикла амплификат инкубируют 5 минут при 72°C для завершения достройки праймеров. Для амплификации использовали следующие пары праймеров (ООО «Евроген», Россия): *GH* F:5'-gct-gct-cct-gag-ggc-cct-tcg-3'. R:5'-gcg-gcg-gca-ctt-cat-gac-cct-3' (Schlee P. et al., 1994); *PRL*: F:5'-cga-gtc-ctt-atg-agc-ttg-att-ctt-3', R:5'-gcc-ttc-cag-agg-tcg-ttt-gtt-ttc-3' (Mitra A. et al., 1995); *Pit-1*: F: 5' aaa-cca-tca-tct-ccc-ttc-tt-3'; R: 5' aat-gta-caa-tgt-ctt-ctg-ag-3' [Woollard J., et al. 1994]. Для выявления генотипов *FSHR* использовались праймеры (ООО «Синтол», Россия): прямой: 5'CTG CCT CCC TCA AGG TGC CCC TC3' и обратный 5'AGT TCT TGG СТА ААТ GTC ТТА GG GGG3' [Houde A. et al., 1994]. Амплификацию проводили на аплификаторе «Bio-Rad» (T-100 Bio-Rad, Laboratories, Inc.) в следующем режиме: горячий старт 95°C – 5 мин, и далее 35 циклов: 95°C – 30 сек, отжиг праймеров 68°C (*GH*), 60°C (*PRL*), 56°C (*Pit-1*) и элонгация – 72°C – 10 мин. Полученный продукт амплификации рестриктировали эндонуклеазами *AluI*, *RsaI* и *HinfI* соответственно (ООО «СибЭнзим» Россия) при 37°C,

в течение 3 часов. Рестрикты разделяли на 2% агарозном геле с добавлением флуоресцентного красителя - бромистого этидия в течение 1,5 часа при рабочем напряжении 100 В и идентифицировали с помощью видеосистемы гель-документирования Gel Imager-2 (ООО Компания «Хеликон», Россия).

2.2.2.8 Оценка племенной ценности (ПЦ) по молочной продуктивности

Новый уровень селекции в молочном скотоводстве, применяемый в РФ, указывает на целесообразность проведения оценки племенной ценности методом BLUP [Племяшов К.В. и др., 2014; Янчуков И. и др., 2013; Тележенко Е.В. и др., 2016; Кудинов А.А. и др., 2017]. Оценка взаимосвязи продуктивности животных с количеством ооцит кумулюсных клеток производилась с использованием племенной ценности (ПЦ) коров по признакам молочной продуктивности, рассчитанной с помощью BLUP Animal Model [Kudinov A. et al., 2018]. Уравнение модели повторных записей BLUP AM имело вид:

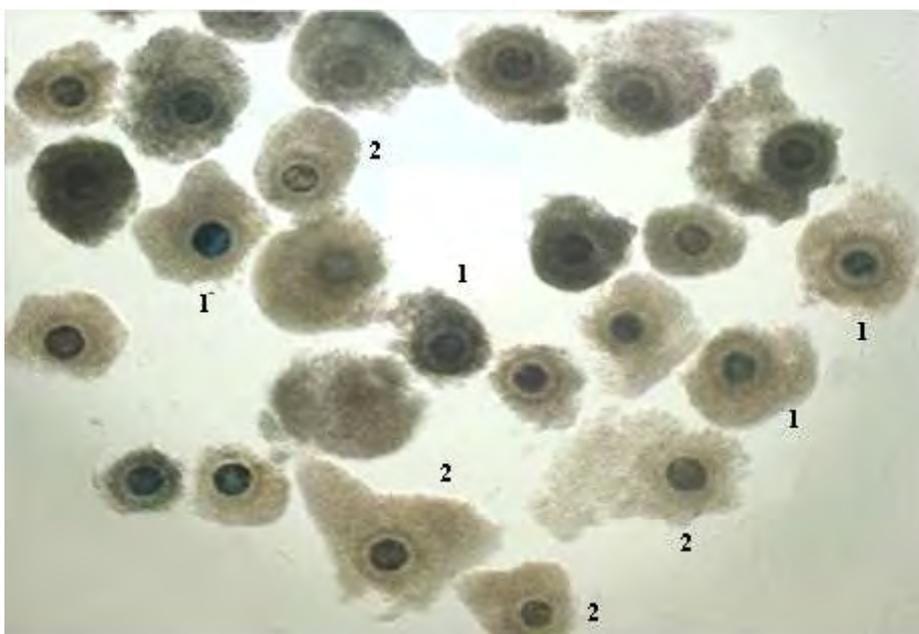
$$Y = HYS + ACDO + a + pe + e,$$

Где Y – продуктивность животного; HYS – фиксированный эффект стадо – год – сезон отела, $ACDO$ – эффект возраста отела и сервис периода, a – аддитивный эффект, pe – эффект влияния окружающей среды, e – остаточное неизвестное. Решение уравнения смешанной модели проводилось с помощью программного обеспечения MiX99. Фенотипические данные были представлены продуктивностью коров 2000 – 2013 гг. рождения из 49 племенных заводов и репродукторов голштинского и черно-пестрого скота Ленинградской области. Расчет средней, ошибки среднего и коэффициента корреляции проводился в программной среде RStudio.

2.2.2.9 Определение функционального статуса ооцитов и уровня стероидных гормонов в ФЖ

Для оценки функционального статуса ооцита использовали ВСВ – диагностику (маркер глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы, определяет растущие и завершившие

фазу роста ооциты). Из фолликулов, диаметром 3-6 мм, с хорошим тургором и обширной васкуляризацией, проводилась аспирация фолликулярной жидкости (ФЖ), совместно с ооцит-кумуляными комплексами. Данная манипуляция осуществлялась при помощи шприца, объемом 1,0 мл с иглой диаметром 0,18 мм. После аспирации, капля ФЖ, с предположительно содержащимся в ней ОКК, помещалась в 6-ти луночный планшет, в центр лунки (1 лунка – 1 капля ФЖ). Ввиду того, что средний объем ФЖ, выделенной из одного фолликула, крайне невелик, во избежание ее пересыхания, целесообразно выполнять манипуляцию очень быстро. После окончания аспирации каждая капля ФЖ исследуется на наличие ОКК при помощи микроскопа МБС-10, увеличение 14x28. Визуализированный ОКК из капли ФЖ переносится в подготовленный рабочий раствор витального красителя ВСВ (brilliant blue) бриллиантового кристаллического голубого (Sigma, В-5388), концентрация 26μМ, экспозиция 90 минут [Кузьмина Т.И. и др., 2014]. Особое внимание уделяется маркировке планшетов (номер лунки с каплей ФЖ должен четко соответствовать номеру лунки с ВСВ красителем, содержащим ОКК). После выявления ВСВ «+» (ооциты, завершившие фазу роста) и ВСВ «-» (растущие) ооцитов проводили идентификацию «ОКК-ФЖ» по маркировке (рис.7). Затем ФЖ собиралась отдельно («+» и «-») в пробирки объемом 1мл. После центрифугирования, при 200 g в течение 10–15 мин, надосадочная жидкость отбиралась в чистые пробирки, также отдельно («+» и «-»), а супернатант использовали для приготовления препаратов клеток гранулезы. Полученную ФЖ расфасовывали в апиrogenные пластиковые пробирки. Объем пробы составлял 160 мкл. Далее образцы маркировались и замораживались при -20°C. Уровень эстрадиола и тестостерона в фолликулярной жидкости коров определяли на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 с использованием наборов «Эстрадиол-ИФА» и «Тестостерон-ИФА» производство «ХЕМА».



**Рисунок 7. ВСВ диагностика ооцитов крупного рогатого скота
(1 – ВСВ «+», 2 – ВСВ «-»)**

2.2.2.10 Приготовление препарата клеток гранулезы и определение уровня апоптоза соматических фолликулярных клеток

Для приготовления цитологического препарата клеток гранулезы использовали суспензию клеток после осаждения, полученный в результате центрифугирования жидкости овариальных фолликулов, содержащих ВСВ «+» и ВСВ «-» ооциты (см. раздел 2.2.2.9). Осадок ресуспендировали с 0,9% NaCl, затем каплю суспензии помещали на обезжиренное предметное стекло и делали мазок. Препарат маркировали, высушивали, и окрашивали азур-эозином по методу Романовского-Гимза. Цитоморфологическую характеристику образцов проводили с использованием светового микроскопа при увеличении X900. Согласно исследованию Jolly P.D. et al., 1997 нами были определены морфологические критерии дегенерации ядерного материала, которые включают:

1. Темно окрашенную массу слипшихся частиц хроматина, расположенных вдоль ядерной мембраны
2. Компактное ядро с темным, гомогенно-окрашенным хроматином

3. Фрагментацию слипшегося хроматина

Количественные исследования проводили путем определения индекса митозов (МИ) и индекса пикнозов (ПИ), как долю окрашенных клеток гранулезы фолликулов яичников с соответствующими морфологическими признаками.

2.2.2.11 Статистический анализ

Для статистического анализа данных использовали методы вариационной статистики [Плохинский Н.А., 1970; Меркурьева Е.К., 1977]. Обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и Atte Stat.

Частоту генотипов рассчитывали по формуле:

$$p = \frac{n}{N}$$

где p - частота генотипа; n - количество особей, имеющих определенный генотип; N - общее число особей.

Частоту аллелей определяли по формулам:

$$P_A = \frac{2 \cdot P_{AA} + P_{AB}}{2 \cdot N}$$

где P_A - частота аллеля А; P_{AA} - число особей с гомозиготным генотипом АА; P_{AB} - число особей с гетерозиготным генотипом АВ; N - общее число особей. Частота аллели В вычисляется путем вычитания значения P_A из 1.

По закону Харди-Вайнберга оценивали генетический состав выборки и степень нарушения генного равновесия:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

где p - частота аллеля А; q - частота аллеля В.

Соответствие наблюдаемого и ожидаемого распределения генотипов оценивали, используя метод хи-квадрат:

$$\chi^2 = \sum \frac{(H_0 - H_e)}{H_e}$$

где χ^2 - критерий соответствия, H_0 - значения фактических наблюдений, H_e - значения теоретических наблюдений.

Число степеней свободы k определяли по формуле:

$$k = n - 1$$

где n - число групп

Для определения статистической значимости различий средних величин использовали t-критерий Стьюдента:

$$t_d = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

где t_d - критерий достоверности разности; M_1 - средняя арифметическая первой сравниваемой группы, M_2 - средняя арифметическая второй сравниваемой группы, m_1 - средняя ошибка первой средней арифметической, m_2 - средняя ошибка второй средней арифметической.

2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Контроль и оценка воспроизводительной способности скота осложняются тем, что она складывается из целого ряда показателей. Поэтому исследование воспроизводительной способности крупного рогатого скота должно производиться с изучением и оценкой отдельных признаков, и выделением из них особо важных критериев, с последующей их комплексной оценкой. Анализ литературных данных показывает, что поиск и определение универсальных маркеров продуктивности крупного рогатого скота осложняется тем, что каждая популяция скота имеет свои генетические особенности и в каждом конкретном стаде имеются свои отличительные черты взаимосвязи между признаками.

2.3.1 Морфологическая характеристика ооцит-кумулясных комплексов мясного, молочного и зебувидного скота при трансвагинальной пункции фолликулов

Данные диаграммы, представленные на рис.7 характеризуют популяцию ооцит-кумулясных комплексов в разных группах самок-доноров. В зависимости от породы, количество жизнеспособных ОКК от их общего числа составляет: абердин-ангусы - 67,2%; черно-пестрые голштинизированные - 42,0%; Nelore - 83,9%; Gir - 71,4%

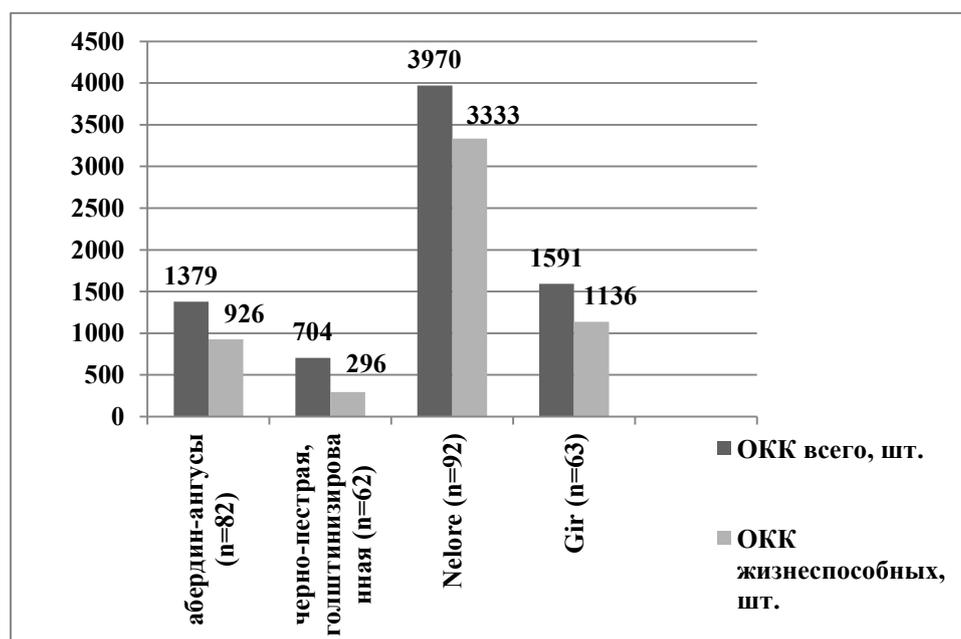


Рисунок 7. Характеристика популяции ооцитов *Bos taurus* и *Bos indicus*, полученных от коров-доноров различного направления продуктивности

В таблице 1 приведены данные о количестве ооцит-кумулюсных комплексов, в том числе жизнеспособных, полученных от коров мясного и молочного направления продуктивности.

Таблица 1 – Выход ооцитов на одно животное, полученных от коров-доноров разного направления продуктивности

Группа	<i>Bos taurus</i>		<i>Bos indicus</i>	
	Абердин-ангус	Черно-пестрая голшти-низированная	Nelore	Gir
Тип продуктивности	Мясной	Молочный	Мясной	Молочный
Возраст, мес.	24-72	27-60	24-60	27-60
n, голов	82	62	92	63
ОКК всего (среднее на 1-го донора), шт.	16,8±0,8	11,3±1,1	43,1±3,6	25,3±2,1
ОКК жизнеспособных (среднее на 1-го донора), шт.	11,3±0,6 ^a	4,8±0,6 ^c	36,2±2,1 ^b	18,1±2,8 ^d

Достоверность различия сравниваемых значений a,b; c,d (t-критерий Стьюдента) P<0,05

Среднее количество ооцит-кумулюсных комплексов на голову полученных от коров голштинизированной черно-пестрой породы, наименьшее, по сравнению с группой самок абердин-ангус и зебувидного скота (11,3 против 16,8, а также 43,1 и 25,3 соответственно). Относительное количество жизнеспособных ОКК на одного донора от общего количества в группе самок Nelore наивысшее - 36,2, а количество жизнеспособных ооцитов, полученных от коров мясного направления породы абердин-ангус уступает более чем в 3 раза и составляет 11,3. Выход жизнеспособных ОКК на одного донора в группе черно-пестрых коров на 13,3 меньше, чем на одну

корову в группе Gir (4,8 против 18,1). Следует отметить, что выход жизнеспособных гамет в группах *Bos taurus* и *Bos indicus* у самок мясного направления продуктивности выше, в сравнении с молочным скотом (11,3 против 4,8, и 36,2 против 18,1). Сравнение молочных пород *Bos taurus* и *Bos indicus* показало, что выход ооцитов у самок черно-пестрой голштинизированной породы более чем в 2 раза уступает в черно-пестрой породе, коровам породы Gir и является наименьшим во всех 4 группах. Причиной этого может быть интенсивная селекция на повышение признаков молочной продуктивности проводимая в последние десятилетия в Российской Федерации. Голштинизация черно-пестрого скота, разводимого в России, несомненно, позволила значительно повысить молочную продуктивность коров, но при этом происходит снижение фертильности, что в свою очередь приводит к ранней выбраковке животных [Hyun-Joo Lim et al., 2015; Barbat A. et al., 2010]. Рядом авторов, при сравнении мясных пород *Bos taurus* и *Bos indicus* отмечается, что у самок *Bos indicus* больше гамет пригодных для производства эмбрионов [Baruselli P.S. et al., 2016; Meza F.J.T. et al., 2018]. Так, например, по данным исследователей, от коров Nelore было получено значимо большее количество жизнеспособных ооцитов в сравнении с самками голштинской породы (68,8% и 57,7%) [Sartori R. et al., 2016], что согласуется с данными нашего исследования. В целях увеличения выхода ооцитов некоторые авторы рекомендуют разведение кроссбредных коров голштинской породы с прилитием крови животных породы Gir [Pontes J.H.F. et al., 2010].

2.3.2 Влияние возраста самок крупного рогатого скота на количество и качество ОКК.

При исследовании ассоциации возраста самок мясного направления продуктивности с характеристикой ОКК (таблица 2) установлено, что среднее количество ооцит-кумулюсных комплексов на голову, полученных от телок 12 месячного возраста, на 2,4 ОКК меньше, чем в группе коров (9,9 против 12,3), при этом относительное количество жизнеспособных ОКК от их общего количества, полученных

от телок и коров возраста 2-2,5 года, находится на одном уровне 69% и 67% соответственно. Выход жизнеспособных ОКК на одну телку – донора на 17% меньше, чем на одну корову (6,8 против 8,2).

Таблица 2 – Влияние возраста самки-донора породы абердин-ангус на выход ооцит-кумулясных комплексов

Группа	Возраст	кол-во самок – доноров	ОКК всего	ОКК всего (среднее на 1-го донора)	ОКК жизнеспособных всего	ОКК жизнеспособных (среднее на 1 донора)
1	12 мес	171	1695	9,9	1169 (69%)	6,8
2	2-2,5 года	153	1878	12,3	1268 (67,5%)	8,2

Результаты культивирования эмбрионов после оплодотворения ооцитов, представленные в таблице 3, демонстрируют, что дроблению до третьего дня (D3) подверглись 62,9% яйцеклеток, полученных от телок и 52,5% - от коров ($P < 0,01$). Выход эмбрионов, полученных от телок на 8-10 день культивирования (D8-D10) был достоверно выше, чем от коров ($t=2,26$ $P < 0,01$). Можно предположить, что ОКК, полученные методом прижизненной аспирации от телок обладают большей жизнеспособностью чем ОКК коров.

Таблица 3 – Влияние возраста самки-донора породы абердин-ангус на выход эмбрионов *in vitro*

Группа	Возраст	n доноров	Дробление, D3	% D3 от жизнеспособных ОКК	Бластоцисты D8-D10	Бластоцисты, % от D3	Всего эмбрионов на разных стадиях развития	Кол-во эмбрионов от жизнеспособных ОКК (%)
1	12 мес	171	735	62,9±1,41 ^c	141	19,1±1,45	243	20,8±1,19 ^a
2	2-2,5 года	153	666	52,5±1,97 ^d	111	16,6±1,44	219	17,2±1,06 ^b

Достоверность различия a-b $P < 0,05$; c-d $P < 0,01$

Был проведен анализ влияния возраста самок черно-пестрого голштинизированного скота, разводимого в Ленинградской области, на качество и количество ооцит-кумулюсных комплексов, выделенных из яичников, методом овариальной резекции. В таблица 4 представлены результаты, которые показывают, что у молодых самок общее количество ОКК, в том числе жизнеспособных, выше на 16,6% и 15,7% соответственно, чем в группах самок более старшего возраста.

Таблица 4 – Влияние возраста самок черно-пестрой голштинизированной породы на количество и качество ооцит-кумулюсных комплексов

Возраст	п, гол	ОКК всего/на гол	ОКК жизнеспособные/на гол	% жизнеспособных ОКК
12м-2г	9	16,4±2,13	9,6±1,80	58,20
2г1м-5л	34	13,7±1,67	5,7±0,8	41,60
5л1м-10л	38	13,4±2,03	5,7±1,2	42,50

Возрастное снижение качества ооцитов характерно для млекопитающих. Старение влияет как на сам ооцит, так и на его микроокружение – фолликулярную жидкость и соматические фолликулярные клетки [Iwata H. et al., 2017]. У людей фертильность снижается с 35 летнего возраста [Hull M.G. et al., 1996; Spandorfer S.D. et al., 2004]. Проведен ряд исследований, подтверждающих возрастное снижение репродуктивной функции крупного рогатого скота [Erickson V.H. et al., 1976], в том числе количества эмбрионов, полученных после индукции суперовуляции у коров [Malhi P.S. et al., 2007]. Так же выявлены специфические особенности ооцитов крупного рогатого скота, которые связаны со старением: преждевременное прогрессирование ядерного созревания [Yamamoto T. et al., 2010], аномально-высокая скорость оплодотворения после экстракорпорального оплодотворения [Iwata H. et al., 2011], низкая способность к развитию, ооциты у коров старшего возраста ассоциировались с митохондриальной дисфункцией [Takeo S. et al., 2013]. Наблюдалась отрицательная корреляция между количеством копий митохондриальной ДНК в яйцеклетках и возрастом самок крупного рогатого скота [Iwata H. et al., 2011].

Однако, несмотря на имеющиеся данные о возрастных аномалиях в яйцеклетках, остается до конца неясным, являются ли эти аномалии следствием прижизненного накопления молекулярного и клеточного повреждения в ооцитах или они имеют другие причинные факторы, такие как внутрифолликулярная среда которая поддерживает рост и развитие гаметы с потенциалом к развитию в жизнеспособный организм, способным к воспроизводству.

2.3.3 Влияние морфофункционального состояния яичников молочного скота на выход ооцит-кумулюсных комплексов

Всего исследовано 75 яичников, из которых было выделено 593 ооцит-кумулюсных комплекса, из них определены как жизнеспособные - 42,7% (n=253). Характеристика ОКК выделенных из яичников с желтым телом и без него, представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика ОКК, выделенных из яичников коров молочного направления продуктивности с разным морфофункциональным состоянием

Морфологическое состояние яичников	n яичников (шт.)	Выделено ооцит - кумулюсных комплексов (ОКК)		% жизнеспособных ОКК от ОКК всего
		Всего	Жизнеспособных	
с желтым телом	30	218	92	42,2%
без желтого тела	45	375	161	42,9%

По результатам анализа данных таблицы 5 нами не установлено достоверных различий по количеству ОКК, полученных в среднем на один яичник с желтым телом ($7,26 \pm 1,07$) и без такового ($8,33 \pm 0,83$). При разном морфофункциональном статусе яичников наблюдается та же тенденция по числу жизнеспособных ОКК $3,07 \pm 0,58$ против $3,57 \pm 0,55$.

Таблица 6 – Средний выход ОКК на 1 яичник, с различным морфофункциональным состоянием

морфология яичников	n яичников (шт.)	выделено ооцит-кумулюсных комплексов на 1 яичник	
		Всего	жизнеспособных
с желтым телом	30	$7,26 \pm 1,07$	$3,07 \pm 0,58$
ез желтого тела	45	$8,33 \pm 0,83$	$3,57 \pm 0,55$

Данные, полученные в результате исследования, свидетельствуют о том, что выход ооцит-кумулюсных комплексов, в том числе жизнеспособных, полученных путем овариальной резекции, не ассоциирован с морфофункциональным состоянием яичника и наличием желтого тела. Это согласуется с данными Леткевич Л.Л. и др. 2008 которые показали, что из яичников в лютеиновой стадии полового цикла процент ооцитов, пригодных к культивированию вне организма, составил 49,2 %, а в фолликулярной– 45,6 %.

Однако, наблюдалась небольшая тенденция к снижению общего выхода ОКК в яичниках с ЖТ, что может объясняться ингибирующим действием прогестерона на оогенез. Исследования, проведенные на буйволах [Singh S. et al., 2001] показывают, что, хотя наличие желтого тела в яичнике на момент выделения гамет влияло на общее количество ооцит-кумулюсных комплексов и на их созревание *in vitro*, но не выявлено различий в дальнейшем оплодотворении и дроблении. Схожие данные получены и на мелком рогатом скоте [Widyastuti R. et al., 2017]. Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что морфофункциональное состояние яичников не влияет на жизнеспособность ооцит-кумулюсных комплексов коров голштинизированной черно-пестрой породы.

2.3.4 Распределение генотипов в исследуемой популяции самок голштинизированного черно-пестрого скота

Выборку составили самки голштинизированной черно–пестрой породы, в возрасте от 18 месяцев до 10 лет из разных хозяйств Ленинградской области (21 голова, 39 голов и 9 голов). Биологические образцы получены в результате резекции 138 яичников (n=69) *post mortem*. Выбор генов-кандидатов основан на влиянии этих генов, как на уровень продуктивности, так и на показатели воспроизводства. Были определены генотипы по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR*, а так же определена частота их встречаемости в популяции (таб. 7)

Таблица 7 – Частоты генотипов и аллелей, выявленных по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1*

Частота генотипов			H_{exp}	χ^2	Частота аллелей	
<i>GH</i>						
LL (n=61)	LV (n=8)	VV (n=0)	0,109	0,26	L	V
0,884	0,116	-			0,942	0,058
<i>PRL</i>						
AA (n=55)	AB (n=14)	BB (n=0)	0,172	0,36	A	B
0,837	0,163	-			0,905	0,095
<i>Pit-1</i>						
AA (n=4)	AB (n=32)	BB (n=33)	0,411	1,11	A	B
0,058	0,464	0,478			0,290	0,710
<i>FSHR</i>						
CC (n=50)	CG (n=15)	GG (n=4)	0,278	3,47	C	G
0,724	0,218	0,058			0,833	0,167

На основании полученных электрофореграмм (рис.8-11) были рассчитаны частоты генотипов и аллелей по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR* в анализируемой выборке коров.

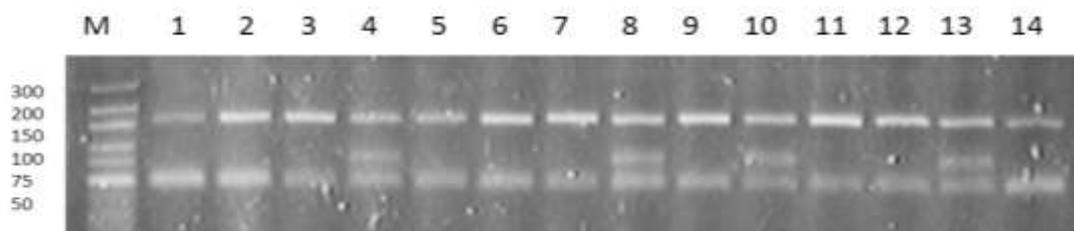


Рисунок 8. Электрофореграмма фрагментов рестрикции гена *GH*

М – маркер молекулярных масс; Дорожка 1,3,4,6-17 - генотип LL, соответствуют фрагменты 171 и 52 п.н.; дорожка 2,5 - генотип LV, соответствуют фрагменты 223, 171 и 52 п.н.;

По гену *GH* определено только два генотипа LL и LV с частотой встречаемости 0,884 и 0,116 соответственно. Выявлена высокая частота встречаемости аллеля L – 0,942, а аллель V определен как редкий (0,058). Анализ фактического и теоретического распределения генотипов по гену *GH* методом Харди-Вайнберга не выявил нарушения генного равновесия (показатель $\chi^2=0,26$, $N_{\text{exp}}=0,109$).

Рисунок 9. Электрофореграмма фрагментов рестрикции гена *PRL*



М – маркер молекулярных масс; Дорожка 1,2,3,5,6,7,9,11,12,14 - генотипу AA, соответствует фрагмент 156 п.н.; дорожка 4,8,10,13 - генотип АВ – соответствуют фрагменты 156, 82 и 74 п.н.;

Большая часть животных имела генотип AA гена *PRL* (0,797) и только у 14-ти голов определен гетерозиготный генотип АВ (0,203). Частота аллеля А была на уровне 0,898, а аллеля В – 0,102. Анализ данных показал, что генное равновесия в данной выборке животных не нарушено ($\chi^2=0,86$, $N_{\text{exp}}=0,183$).

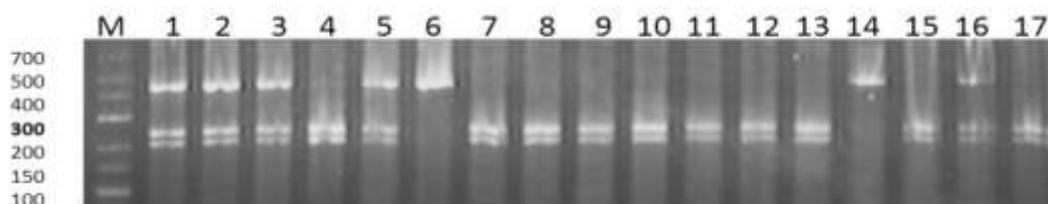


Рисунок 10. Электрофореграмма фрагмента рестрикции гена *Pit-1*

М – маркер молекулярных масс; Дорожки 6,14 - генотип AA, соответствует фрагмент 451 п.н.; дорожка 1,2,3,5,16 - генотип АВ, соответствуют фрагменты 451, 244

и 207 п.н.; дорожка 4,7-13,15,17 - генотип ВВ, соответствуют фрагменты 244 и 207 п.н.

При анализе полиморфизма гена *Pit-1* определено три генотипа: АА, АВ и ВВ. Их частота встречаемости составила 0,058 0,464 и 0,478, соответственно. Более половины анализируемых животных имели аллель В (частота 0,710), аллель А оказался редким, и его частота составила 0,290. Показатель $H_{exp}=0,411$, значение $\chi^2=1,11$, что свидетельствует о том, что генное равновесие в данной выборке животных не нарушено. Результаты наших исследований согласуются с другими исследованиями популяции молочного скота Северо - Западного региона России [Позвникова М.В. и др., 2016].

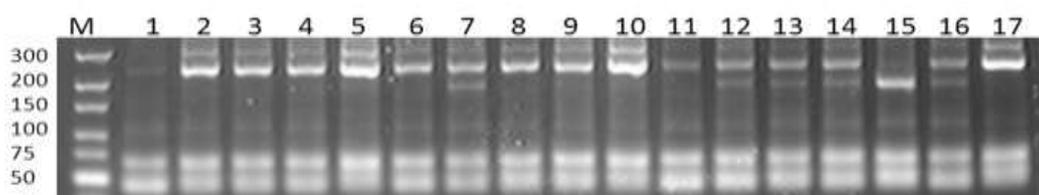


Рисунок 11. Электрофореграмма фрагментов рестрикции гена *FSHR*.

М – маркер молекулярных масс; Дорожки 2,3,4,5,6,8,9,10,11,17– генотип СС, соответствуют фрагменты 243 и 63 п.н.; дорожки 7,12,13,14,16 - генотип СG – соответствуют фрагменты 243, 193 и 63+50 п.н.; дорожка 15 - генотип GГ – соответствуют фрагменты 193 и 63+50 п.н.

Результаты генотипирования по гену *FSHR* в анализируемой выборке животных свидетельствуют о том, что преобладал генотип СС и его частота была определена на уровне 0,724. Только 15 голов являлись носителями гетерозиготного генотипа СG (0,218) и 4 головы – гомозиготного генотипа GГ (0,058). Частота встречаемости аллеля С и G гена *FSHR* составила 0,833 и 0,167 соответственно. Анализ эмпирического и теоретического распределения генотипов по методу Харди-Вайнберга не выявил нарушения генного равновесия ($\chi^2=3,47$; $H_{exp}=0,278$).

Основываясь на полученных нами данных, можно отметить равномерность распределения генотипов по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR* в анализируемой выборке животных. Наибольшая частота встречаемости определена для аллеля L гена *GH* (0,942), аллеля А гена *PRL* (0,898), аллеля В гена *Pit-1*(0,710), аллеля С гена *FSHR* (0,833) что свидетельствует о проводимой селекции по признакам молочной продуктивности в хозяйствах.

2.3.5 Ассоциация полиморфизма генов *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR* с морфологической полноценностью ОКК

Связь различных генотипов по генам *GH*, *PRL* и *Pit-1* с качеством и количеством полученных ОКК из яичников коров показана в таблице 8.

Таблица 8 – Качество и количество ооцит-кумулясных комплексов из яичников коров с различными генотипами по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR*

Генотип	п голов	п яичников	Выделено ОКК, всего (шт.)	ОКК, всего, среднее на 1 голову (шт.)	ОКК, жизнеспособные (шт.)	% жизнеспособных ОКК от ОКК всего	ОКК, жизнеспособные, среднее на 1 голову (шт.)
<i>GH</i>							
LL	61	122	1008	16,52±1,38 ^a	442	43,8	7,25±1,01 ^c
LV	8	16	72	9,00±1,73 ^b	22	30,5	2,75±0,77 ^d
Итого	69	138	1080	-	464	-	-
<i>PRL</i>							
AA	55	110	892	16,22±1,51	424	47,5	7,70±1,09 ^e
AB	14	28	188	13,42±1,93	40	21,3	2,86±0,60 ^f
Итого	69	138	1080	-	464	-	-
<i>Pit-1</i>							
AA	4	8	38	9,50±1,04	17	44,7	4,25±1,70
AB	32	64	484	15,12±1,77	215	44,4	6,72±1,20
BB	33	66	558	16,91±2,00	232	41,6	7,03±1,51
Итого	69	138	1080	-	464	-	-
<i>FSHR</i>							
CC	52	100	795	15,3±1,5	360	45,2	6,9±1,2
CG	13	30	239	15,9±2,5	89	37,2	5,9±1,9
GG	4	8	46	11,5±3,9	15	32,6	3,75±2,0
Итого	69	138	1080	-	464	-	-

Уровни достоверности различий между группами: a-b, c-d, p≤0,05; e-f p≤0,01.

Животные с генотипом LL в сравнении с особями с генотипом LV гена *GH* отличались высоким выходом ОКК в среднем на один яичник (LL к LV +7,54 шт,

$p \leq 0,05$), а также высоким выходом жизнеспособных ОКК (LL к LV +4,5 шт, $p \leq 0,05$). Не определено достоверных различий между группами животных с генотипами AA и AB гена *PRL* по показателю ОКК в среднем на голову, однако из яичников коров с генотипом AA было получено большее количество жизнеспособных ОКК (+4,84 шт, $p \leq 0,01$). Анализ связи полиморфных вариантов гена *Pit-1* с количеством и качеством ОКК не выявил значимых различий в исследуемой группе особей.

Комплексное маркирование признака считается более эффективным, поэтому в работе было проведено определение генетической структуры анализируемого поголовья в двух вариантах:

- 1) по комплексу генотипов генов *GH*, *PRL* и *Pit-1*;
- 2) по комплексу генотипов генов *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR*.

В исследуемой популяции животных было выявлено 9 комплексных генотипов по генам *GH/PRL/Pit-1* и 20 комплексных генотипов по генам *GH/PRL/Pit-1/FSHR*. В оценку было включено только по три группы животных с разными комплексными генотипами, где $n \geq 5$. Данные приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Качество и количество ооцит-кумулясных комплексов из яичников коров с разными комплексными генотипами по генам *GH/PRL /Pit-1* и *GH/PRL /Pit-1/ FSHR*

Генотип	п голов	п яичников	Выделено ОКК, всего (шт.)	ОКК, всего, среднее на 1 голову (шт.)	ОКК, жизнеспособные (шт.)	% жизнеспособных ОКК от ОКК всего	ОКК, жизнеспособные, среднее на 1 голову (шт.)
комплексные генотипы по генам <i>GH/PRL /Pit-1</i>							
LL/AA/AB	22	44	384	17,45±2,38	181	47,1	8,22±1,60
LL/AA/BB	24	48	432	18,00±2,47 ^a	215	49,7	8,95±1,92 ^c
LL/AB/AB	7	14	70	10,00±0,87 ^b	21	30,0	3,00±0,69 ^d
Итого	53	106	886	-	417	-	-
комплексные генотипы <i>GH/PRL/Pit-1/FSHR</i>							
LL/AA/AB /CC	16	32	280	17,5±2,75	119	42,5	7,43±1,59
/AA/BB/CG	6	12	88	14,66±3,09	26	29,5	4,33±1,81
LL/AB/AB/CC	17	34	274	16,11±2,97	163	59,4	9,58±2,51
Итого	39	78	642	-	308	-	-

Уровни достоверности различий между группами: a-b, c-d, $p \leq 0,05$.

Изучение комплексного влияния пула анализируемых генов на исследуемые параметры показало, что низкий выход ОКК (в том числе и жизнеспособных) наблюдался в группе животных с генотипом LL/AB/AB в сравнении с группой особей с генотипом LL/AA/BB (-8,0 и -5,95 соответственно при $p < 0,05$). Учитывая отсутствие связи полиморфных вариантов гена *Pit-1* с анализируемыми признаками, можно отметить, что наличие в комплексных генотипах гомозиготных вариантов аллеля L гена *GH* и аллеля A гена *PRL* положительно влияет как на общее количество ОКК, так и на их качественные признаки (морфологическое состояние). Этот факт подтверждается данными корреляционного анализа. Так в группе животных с генотипом LL гена *GH* коэффициент корреляции по признаку общее количество ОКК – жизнеспособные ОКК составил 0,662 при $p \leq 0,001$, а в группе особей с генотипом AA гена *PRL* – 0,797 при $p \leq 0,001$. Наличие в комплексном генотипе гетерозиготного варианта AB гена *PRL* ассоциированного с низким выходом жизнеспособных ОКК, вероятно может обуславливать снижение анализируемых показателей. Коэффициент корреляции по признаку общее количество ОКК - ОКК жизнеспособные в группе особей с генотипом AB гена *PRL* отрицательный ($r = -0,120$).

Достоверные данные были получены только по гену *GH*. Так, генотип LV гена *GH* был отрицательно связан как с общим выходом ОКК, так и с выходом жизнеспособных ОКК. В то же время особи с данным генотипом отличались высокими показателем ПЩ по молочному жиру и белку и имели тенденцию к высоким удоям. Полученные данные можно объяснить тем, что ген *GH* имеет значительное влияние на метаболические процессы в организме млекопитающих. Авторами [Balogh O. et al., 2008] отмечается, что особи с генотипом LV гена GH имели высокую резистентность к инсулину, что определяло их значительный генетический потенциал к высоким удоям. В то же время исследователями [Baruselli P.S. et al., 2016] показано, что высокая резистентность к инсулину у лактирующих коров ассоциирована с низкой компетентностью ооцитов, а, следовательно, и с низкой фертильностью коров. Высокая концентрация в крови инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) была характерна для гомозиготных коров LL, которые отличались высоким показателем выхода молочного жира, а для гетерозиготных особей были характерны высокие

удои [Grochowska R. et al., 2001]. По данным [Lechniak D. et al., 2002] полиморфные варианты гена *GH* не влияли на общее количество и на диаметр ооцитов, хотя для животных с генотипом *VV* была характерна высокая частота диплоидных ооцитов и ооцитов с нередуцированным числом хромосом. Не было определено значимого влияния генотипов *GH* на интервал от отела до первой овуляции и на циклические изменения, происходящие в яичнике во время эстрального цикла [Balogh O. et al., 2009]. В тоже время показано, что коровы с генотипом *LL* гена *GH* имели предрасположенность к более легким отелам и низкой частоте дистоции [Hadi Z. et al., 2015].

Хотя генотип *AA* гена *PRL* был ассоциирован с высоким выходом жизнеспособных ОКК, не было получено достоверной взаимосвязи по признакам молочной продуктивности, но была отмечена некоторая тенденция у этих животных к низким показателям по удою, молочному жиру и белку. В других исследованиях, при сравнении молочной продуктивности коров в зависимости от генотипа по гену *PRL* не выявлено существенных различий [Горячева Т. С. и др. 2010; Thuy N.T.D. et al., 2018].

Отсутствие достоверных связей полиморфных вариантов гена *Pit-1* с молочной продуктивностью и репродуктивными качествами отражено в ряде работ [Yasemin Ö.N.E.R. et al., 2017, Grossi D. et al., 2015], что подтверждает полученные нами результаты.

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что ген *FSHR* у крупного рогатого скота слабо отражает количественные и качественные характеристики ооцит-кумулюсных комплексов, полученных из яичников *post mortem*, и следовательно не может рассматриваться как маркер этих параметров. В работе Satrapa R. A. et al., 2012 также не определено значимого влияния гена *FSHR* на компетентность ооцитов. Вероятно, что ген *FSHR* может являться прогностическим признаком результатов стимуляции суперовуляции у самок крупного рогатого скота в технологии получения эмбрионов *in vivo*. При методе вымывания эмбрионов (*in vivo*) ответ организма самки на индукцию суперовуляции посредством дорогостоящей гормональной стимуляции имеет важное определяющее значение, так

как при слабом ответе процедура получения эмбрионов *in vivo* становится экономически не эффективной. Поэтому использование гена *FSHR* в качестве маркера ответа на стимуляцию суперовуляции приобретает актуальность. Схожее предположение высказано Yang W. C., 2010 о том, что аллельная структура гена, кодирующего *FSHR*, может коррелировать с суперовуляцией и скоростью зачатия у крупного рогатого скота.

2.3.6 Племенная ценность молочной продуктивности коров разных генотипов по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1*, *FSHR* и ассоциация с ОКК

Учитывая тот факт, что уровень молочной продуктивности связан с репродуктивными качествами коров, нами была проведена оценка связи полиморфных вариантов изучаемых генов с показателями ПЦ удою, ПЦ жира, ПЦ белка у 60 голов (таблица 10).

Таблица 10 – Показатели ПЦ молочной продуктивности коров с различными генотипами по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR*

Генотип	N	ПЦ удою, кг	ПЦ жир, кг	ПЦ белок, кг
<i>GH</i>				
LL	55	75,9±34,9	-15,9±1,22 ^a	-23,1±0,7 ^c
LV	5	204,3±65,6	-7,6±3,5 ^b	-17,1±1,4 ^d
	60			
<i>PRL</i>				
AA	48	75,8±38,8	-15,8±1,3	-23,1±0,7
AB	12	129,7±51,4	-12,6±2,4	-20,1±1,3
	60			
<i>Pit-1</i>				
AA	4	-24,4±148,8	-20,4±3,5	-24,9±2,5
AB	28	139,7±45,9	-14,1±1,6	-21,8±1,0
BB	28	49,4±48,1	-15,6±1,84	-22,9±1,6
	60			
<i>FSHR</i>				
CC	43	100,4±40,6	-14,7±1,3	-22,4±0,8
CG	13	54,9±62,6	-15,1±3,1	-22,0±1,3
GG	4	41,5±113,0	-20,4±3,0	-25,3±2,1
	60			

Уровень достоверности a-b $p \leq 0,05$; c-d $p \leq 0,01$.

Анализ данных показал, что только животные с генотипом LL уступали своим сверстницам с генотипом LV по гену *GH* по молочному жиру и белку на 8,3 кг ($p \leq 0,05$) и на 6,0 кг ($p \leq 0,01$) соответственно, но, однако эти коровы имели тенденцию к низким показателям по удою. По другим вариантам анализируемых генов достоверных различий не выявлено.

В результате анализа данных (таблица 11) нами выявлена слабая положительная корреляционная связь по ПЦ удою и молочного жира с общим выходом ОКК и выходом жизнеспособных ОКК. Однако, слабая корреляция может быть ввиду малочисленной выборки.

Таблица 11 – Корреляция между показателями ПЦ молочной продуктивности и качественными и количественными характеристиками ОКК

Коррелируемые признаки	Коэффициент корреляции
Общий выход ОКК – ПЦ удою	0,164
Выход жизнеспособных ОКК – ПЦ удою	0,004
Общий выход ОКК – ПЦ молочный жир	0,108
Выход жизнеспособных ОКК – ПЦ молочный жир	0,03
Общий выход ОКК – ПЦ молочный белок	-0,04
Выход жизнеспособных ОКК – ПЦ молочный белок	-0,06

Так же был проведен анализ групп животных с различными комплексными генотипами по генам *GH/PRL/Pit-1* и *GH/PRL/Pit-1/FSHR* и показателей ПЦ молочной продуктивности (таблица 12).

Таблица 12 – ПЦ показателей молочной продуктивности животных с разными комплексными генотипами по генам *GH/PRL/Pit-1* и *GH/PRL/Pit-1/FSHR*

генотип	n	ПЦ удою, кг	ПЦ жир, кг	ПЦ белок, кг
Комплексный генотип по генам <i>GH/PRL/Pit-1</i>				
LL/AA/AB	21	127,9±58,7	-14,9±2,1	-22,9±1,1
LL/AA/BV	21	23,8±57,6	-17,0±2,12	-23,8±1,2
LL/AB/AB	5	115,4±56,0	-13,6±3,2	-19,5±1,7
Итого	47	-	-	-
Комплексный генотип по генам <i>GH/PRL/Pit-1/FSHR</i>				
LL/AA/AB/CC	16	184,79±65,85	-12,96±2,16	-23,50±1,43
LL/AA/BV/CG	6	103,77±73,74	-14,21±3,88	-21,53±1,01
LL/AB/AB/CC	17	17,52±77,3	-16,85±2,49	-23,49±1,67
Итого	49	-	-	-

Был проведен анализ данных только 47 племенных коров черно-пестрой голштинизированной породы с различными комплексными генотипами по генам *GH/PRL/Pit-1* и 49 голов с комплексными генотипами по генам *GH/PRL/Pit-1/FSHR*. Группы коров с другими комплексными генотипами, в связи с их малочисленностью не рассматривались. В исследуемых группах животных не выявлено достоверно значимых различий показателей ПЦ по молочной продуктивности.

Нельзя недооценивать влияние генетического фактора на продуктивность и фертильность животных. Генетическая дисперсия и плейотропное действие генов, не всегда позволяет дать ответ на вопрос насколько значимый вклад вносит один или другой ген в формирование признака. И чаще всего, полученные данные могут являться некоторой особенностью анализируемой популяции, так как значительную роль в фенотипическом проявлении признака оказывает окружающая среда [Xiang R. et al., 2017]. По данным ряда авторов для голштинизированной черно-пестрой породы в которой в последние десятилетия ведется направленная селекция на повышение удоев, характерна высокая частота встречаемости аллеля L гена *GH* – 0,93 [Metin Kiyic et al., 2018], аллеля A гена *PRL* – 0,74-0,890 [Часовщикова М.А. и др., 2012; Гареева И.Т., 2012], и аллеля В гена *Pit-1* – 0,667-0,880 [Позовникова М.В., 2017].

Для определения связи уровня молочной продуктивности коров с изучаемыми параметрами ОКК все животные (n=60) были разделены на группы в зависимости от общего выхода ОКК (таблица 13) и жизнеспособности ооцит-кумулясных комплексов (таблица 14). Статистическая группировка проводилась на основе количественных (общее количество ОКК) и качественных (жизнеспособность ОКК) признаков. Критерием разделения на группы был показатель медианы. Оценку связи выхода жизнеспособных ОКК с уровнем ПЦ по показателям молочной продуктивности проводили внутри групп по общему выходу ОКК.

Таблица 13 – ПЦ показателей молочной продуктивности в зависимости от общего количества ОКК

Группа	n	ПЦ Удой (кг)	ПЦ Молочный жир (кг)	ПЦ Молочный белок (кг)
≤12 ОКК	30	26,5±48,5	-16,3±1,7	-23,2±1,0
≥13 ОКК	30	146,9±41,8	-14,1±1,5	-21,9±0,9

Таблица 14 – ПЦ показателей молочной продуктивности в зависимости от количества жизнеспособных ОКК

Группа	n	ПЦ Удой (кг)	ПЦ Молочный жир (кг)	ПЦ Молочный белок (кг)
≤ 3 ОКК	19	33,7±68,5	-16,0±2,5	-22,8±1,4
≥ 4 ОКК	11	13,6±63,3	-17,1±2,3	-23,8±1,3
≤ 9 ОКК	18	181,1±43,1	-13,7±1,5	-21,7±1,2
≥ 10 ОКК	12	95,6±82,1	-14,5±3,2	-22,1±1,6

Согласно анализу, повышение показателя ПЦ по удою, молочному жиру и белку наблюдается в группе животных с высоким общим выходом ОКК. Противоположная ситуация обнаружена при анализе групп по выходу жизнеспособных ОКК: высокие средние значения ПЦ по молочной продуктивности отмечаются в группах с низким выходом жизнеспособных ОКК. Коэффициент корреляции между группами близок к единице.

Так как сравнение средних показателей ПЦ по признаку молочной продуктивности в зависимости от общего выхода ОКК и выхода жизнеспособных ОКК не выявило достоверных различий, то нами был проведен регрессионный анализ.

На рисунках 12–14 отображены уравнения линейной и квадратичной регрессии ПЦ признаков молочной продуктивности и общего выхода ОКК. Негативный

коэффициент регрессии наблюдается между ПЦ по молочному жиру и белку к общему выходу ОКК. Низкий показатель R^2 и достоверность теста ANOVA $>0,05$ может являться результатом использования выборки малого размера.

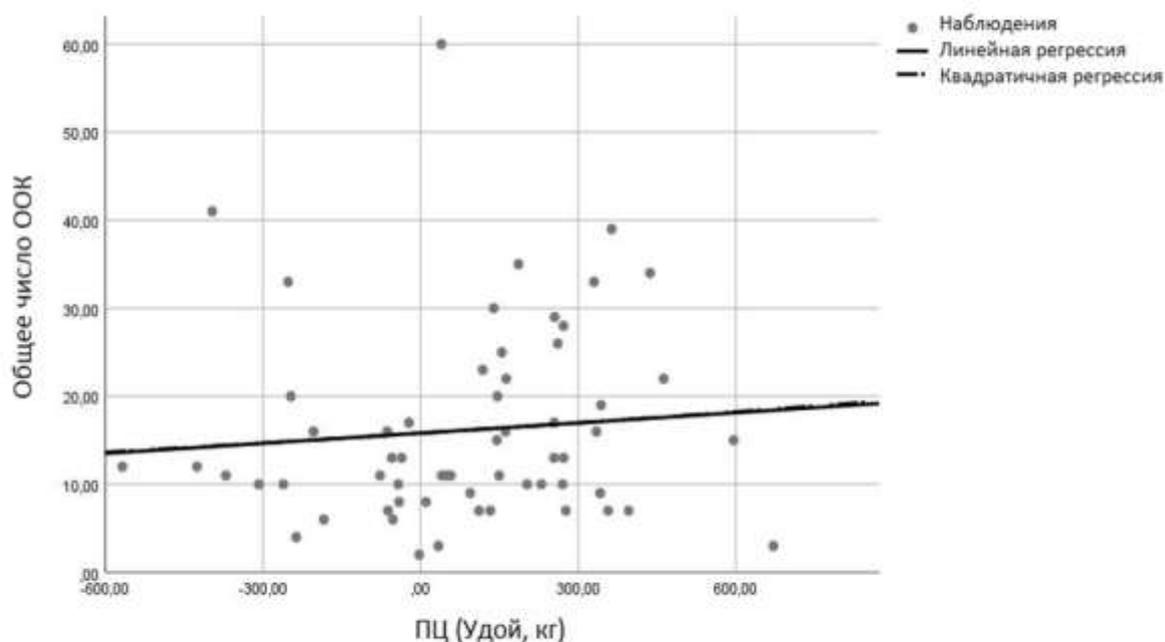


Рисунок 12. Линейная и квадратичная регрессия между ПЦ по удою (кг) к общему выходу ОКК

Значения для линейной регрессии $R^2 = 0.008$, $\beta = 0.09$, ANOVA F тест = 0.46, $p = 0.502$; для квадратичной $R^2 = 0.008$, $\beta = 0.09$, ANOVA F тест = 0.22, $p = 0.8$

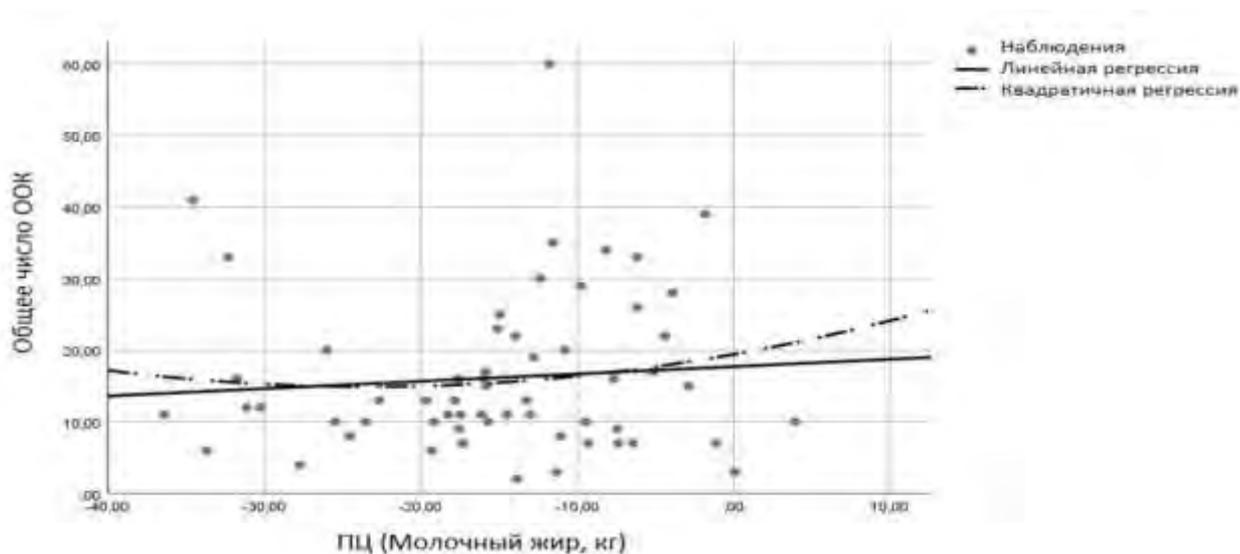


Рисунок 13. Линейная и квадратичная регрессии между ПЦ молочного жира (кг) и общим выходом ооцит-кумулюсных комплексов

Значения для линейной регрессии $R^2 = 0.007$, $\beta = 0.086$, ANOVA F тест = 0.43, $p = 0.52$; для квадратичной $R^2 = 0.014$, $\beta = 0.32$, ANOVA F тест = 0.39, $p = 0.68$.

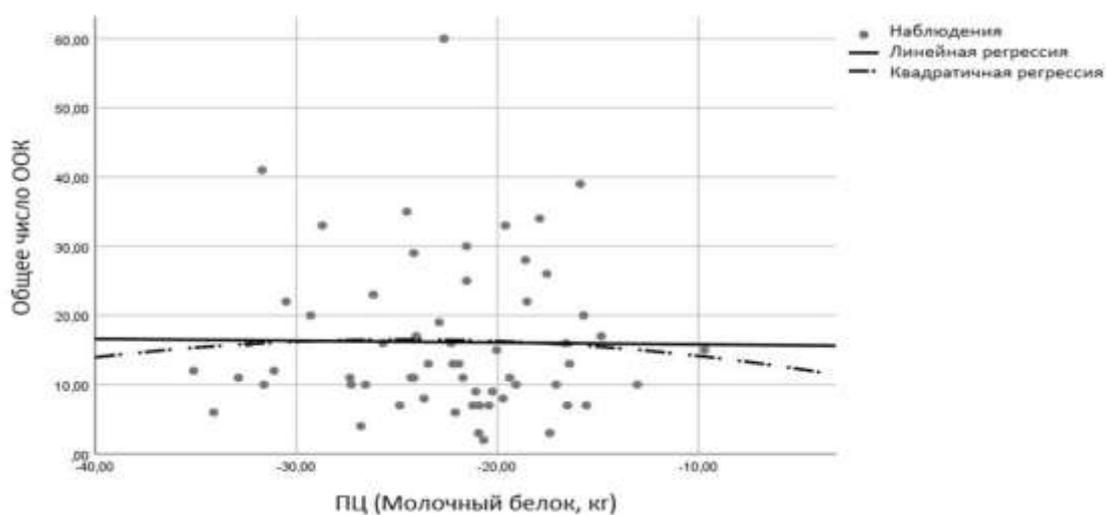


Рисунок 14. Линейная и квадратичная регрессии между ПЦ молочным белком (кг) и общим выходом ооцит-кумулюсных комплексов

Значения для линейной регрессии $R^2 = 0$, $\beta = -0.013$, ANOVA F тест = 0.01, $p = 0.92$; для квадратичной $R^2 = 0.002$, $\beta = -0.27$, ANOVA F тест = 0.046, $p = 0.96$.

На рисунках 15–17 отображены уравнения линейной и квадратичной регрессии ПЦ признаков молочной продуктивности и выхода жизнеспособных ОКК. Негативный коэффициент регрессии наблюдается между ПЦ признаков молочной продуктивности и числом жизнеспособных ОКК. Низкий показатель R^2 и достоверность теста ANOVA $> 0,05$ объясняется недостаточной выборкой для анализа ПЦ или отсутствием связи количества ОКК с продуктивными показателями. Малая выборка, в свою очередь, зависит от ограниченного количества материала для оценки ОКК.

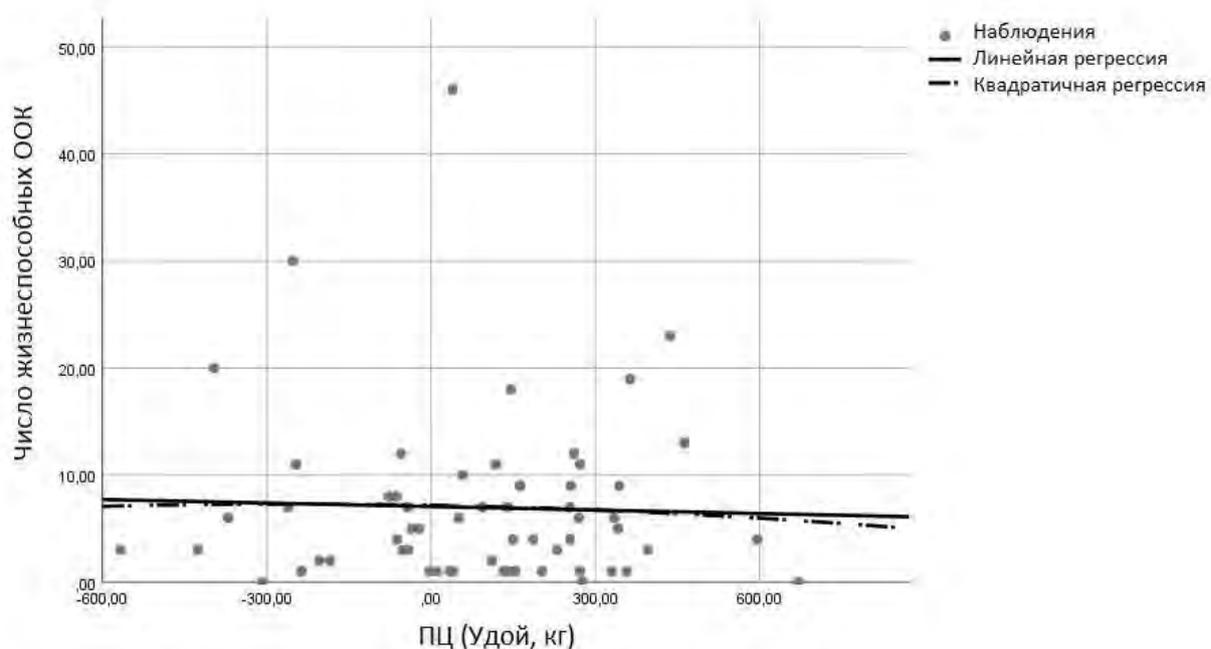


Рисунок 15. Линейная и квадратичная регрессии между ПЦ удоем (кг) и выходом жизнеспособных ооцит-кумулюсных комплексов

Значения для линейной регрессии $R^2 = 0.001$, $\beta = -0.035$, ANOVA F тест = 0.07, $p = 0.792$; для квадратичной $R^2 = 0.002$, $\beta = -0.029$, ANOVA F тест = 0.046, $p = 0.96$.

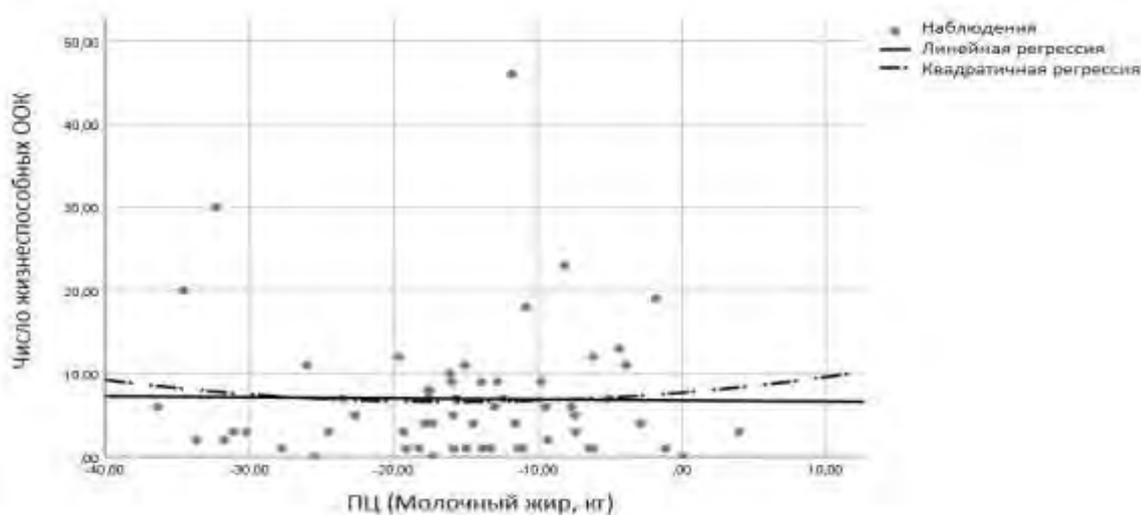


Рисунок 16. Линейная и квадратичная регрессии между ПЦ по молочному жиру (кг) и выходом жизнеспособных ооцит-кумулюсных комплексов

Значения для линейной регрессии $R^2 = 0$, $\beta = -0.015$, ANOVA F тест = 0.013, $p = 0.909$; для квадратичной $R^2 = 0.004$, $\beta = 0.166$, ANOVA F тест = 0.110, $p = 0.896$.

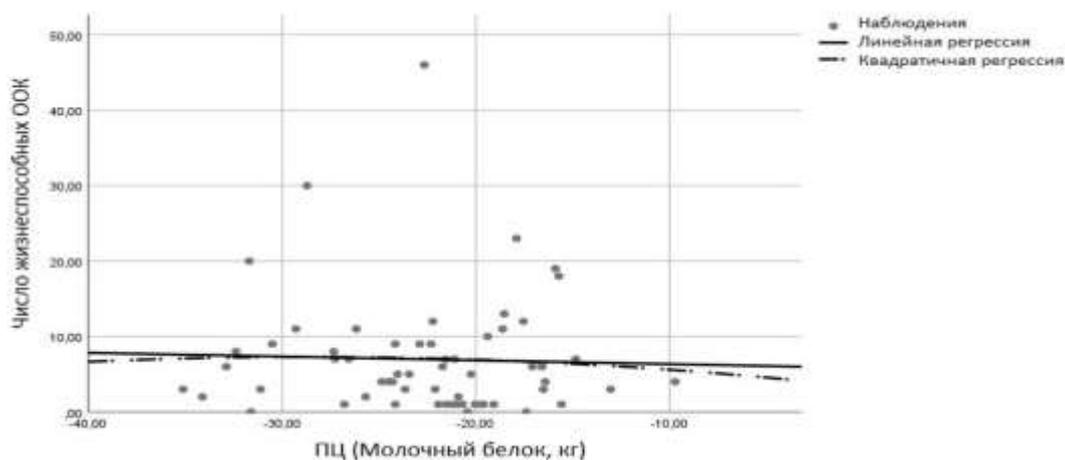


Рисунок 17. Линейная и квадратичная регрессии между ПЦ по молочному белку (кг) и выходом жизнеспособных ооцит-кумулюсных комплексов

Значения для линейной регрессии $R^2 = 0.001$, $\beta = -0.034$, ANOVA F тест = 0.069, $p = 0.794$; для квадратичной $R^2 = 0.002$, $\beta = -0.194$, ANOVA F тест = 0.05, $p = 0.951$.

Если рассматривать количественный и качественный показатели ОКК как биомаркер репродуктивного потенциала коров, то в настоящем исследовании не установлено прямой зависимости между выходом ОКК и уровнем ПЦ по показате-

лям молочной продуктивности животных. Однако, наблюдалась некоторая тенденция к положительной связи ПЦ по молочной продуктивности и общим количеством ОКК и отрицательной связи уровня ПЦ по молочной продуктивности и выходу жизнеспособных ОКК.

В целом, мировой опыт показывает, что включение в селекцию индексов фертильности является назревшей необходимостью, так как это благоприятно скажется на репродуктивном здоровье стад, что в свою очередь не ведет к снижению молочной продуктивности коров [Berry D.P. et al., 2014].

Таким образом, основываясь на полученных нами данных можно предположить, что интенсивный и односторонний отбор животных по показателям молочной продуктивности может отрицательно влиять на качество ОКК самок, что в свою очередь будет фенотипически выражаться снижением репродуктивных качеств коров, что согласуется с данными Никиткина Е.В. и др., 2012.

2.3.7 Биохимический профиль фолликулярной жидкости и интактность ооцит – кумулюсных комплексов

Данные таблицы 15 показывают, что животные при идентичных показателях жира и белка в молоке, при одном и том же возрасте первого осеменения, имеют одинаковый выход ооцит-кумулюсных комплексов на голову, однако количество жизнеспособных ооцитов в первой группе в 3,2 раза меньше, чем во второй.

Таблица 15 – Выход жизнеспособных ооцит-кумулюсных комплексов и показатели молочного жира, молочного белка, возраста первого осеменения

Показатель	Группа 1	Группа 2
Всего доноров n=21	11	10
Молочный жир	3,86 ± 0,08	3,95 ± 0,12
Молочный белок	3,08 ± 0,05	3,1 ± 0,07
Возраст при первом осеменении (мес.)	15,85 ± 0,69	15,6 ± 0,56
ОКК, всего на 1 голову	17,2 ± 3,15	17,6 ± 2,65
ОКК, жизнеспособные на 1 голову	3,3 ± 0,08 ^a	10,6 ± 1,73 ^b

Уровни достоверности различий между группами: a-b, p < 0,01.

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

Результаты биохимического исследования, представленные в таблице 16 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 [Richards J.S. et al., 1998; Gosden R. et al., 1988].

Таблица 16 – Биохимические показатели жидкости овариальных фолликулов в группах коров с разным количеством жизнеспособных ооцитов

Группа	ОКК всего	ОКК, жизнеспособные		АСТ, U/L	Холестерин (mmol/L)	Триглицериды (mmol/L)
		на 1 голу (шт.)	%			
1	172	3,3 ± 0,08 ^a	21,9 ± 4,37	2760 ± 370,4 ^c	0,49 ± 0,090 ^e	1,38 ± 0,098 ^g
2	158	10,6 ± 1,73 ^b	62,7 ± 5,77	1698 ± 329,7 ^d	1,37 ± 0,302 ^f	1,93 ± 0,173 ^h

Уровни достоверности различий между группами: a-b, $P < 0,01$; c-d, e-f, g-h, $P < 0,05$

В группе животных с меньшим количеством жизнеспособных ОКК концентрация АСТ на 38% превышает вторую группу ($P < 0,05$). 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 предположить, 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 жизнеспособными (морфологически-полноценными) ОКК и концентрацией:

- а) триглицеридов составил $r = 0,46$ при уровне достоверности $p = 0,10$;
- б) холестерина $r = 0,69$ при достоверности $p = 0,01$;
- в) АСТ $r = - 0,40$ при достоверности $p = 0,15$.

Достоверные различия в концентрациях триглицеридов и АСТ и при 50% отборе морфологически жизнеспособных и нежизнеспособных ОКК не могут считаться единичными показателями определяющими качество ооцитов, поскольку уровень достоверности коэффициента 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 автора. Возрастание активности фермента АСТ, возможно, приводит к усилению образования аспартата, что в свою очередь положительно коррелирует с концентрацией глюкозы. В то же время увеличение интенсивности использования аминокислот в процессе глюконеогенеза, вероятно неблагоприятно сказывается на воспроизводительной способности коров [Лейбова В.Б. и др., 2011].

2.3.8 Апоптоз клеток гранулезы, и его взаимосвязь с функциональным статусом ооцита и уровнем стероидов в фолликулярной жидкости

В серии экспериментов (4 повторности) было исследовано 328 фолликулов, аспирированных из 75 яичников коров (50 яичников с желтым телом (лютеиновая фаза), 25 яичников на стадии фолликулярного роста). Выделено 90 ооцит-кумулясных комплексов, из них 56 (62,3%) ВСВ «+», 34 (37,3%) ВСВ «-». Данные таблицы 17 отражают уровень стероидных гормонов в фолликулярной жидкости в зависимости от функционального состояния ооцитов.

Таблица 17 – Концентрация эстрадиола и тестостерона в жидкости овариальных фолликулов, содержащих завершившие фазу роста (ВСВ+) и растущие (ВСВ-) ооциты коров

Результат ВСВ диагностики	Концентрация эстрадиола (x ± m), нг/мл	Концентрация тестостерона (x ± m), нг/мл
ВСВ «+»	7,39±0,18 ^a	26,17±2,6 ^c
ВСВ «-»	5,37±0,42 ^b	33,47±1,7 ^d

Достоверность различия a-b P<0,05, c-d P<0,05 (критерий Стьюдента).

Установлены достоверные различия в содержании эстрадиола в жидкости фолликулов, содержащих ВСВ «+» или ВСВ «-» ооциты ($7,39 \pm 0,18$ нг / мл против $5,37 \pm 0,42$ нг / мл, $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента). Содержание тестостерона так же достоверно значимы ($26,17 \pm 2,6$ нг / мл против $33,47 \pm 1,7$ нг / мл, $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента). Полученные данные, показывают, что уровень эстрадиола в фолликулярной жидкости коров, содержащей ооциты, завершившие фазу роста *in vivo*, превышает таковой в фолликулах, содержащих ооциты, находящиеся в фазе роста. А уровень тестостерона, ниже в жидкости фолликулов, содержащих ооциты, тестированные, как завершившие рост.

Было установлено, что интенсивность апоптоза и высокий уровень пикнозов в клетках гранулезы овариальных фолликулов коров тесным образом связана с функциональным статусом ооцита (таблица 18), что согласуется с исследованиями Кузьминой Т.И. и др., 2014.

Таблица 18 – Интенсивность апоптоза соматических фолликулярных клеток в разных фазах роста ооцитов

ВСВ статус ооцита	Количество ооцитов	Количество клеток гранулезы	Индекс митозов	Индекс пикнозов
ВСВ «+»	56	1821	54	172
ВСВ «-»	34	1414	104	45

Взаимодействие соматических фолликулярных клеток (тека и гранулеза) играет важную роль в процессе роста и созревания фолликулов. В зависимости от условий этого взаимодействия происходит либо нормальное созревание ооцита, либо атрезия фолликула и гибель гаметы. Все изменения, происходящие в синтезе стероидов, отражаются на судьбе фолликула и ооцита. Секреторная активность фолликулярных клеток сбалансирована на каждой стадии фолликулогенеза. В настоящем исследовании выявлена корреляция между уровнем стероидных гормонов в жидкости овариальных фолликулов коров, количеством апоптозов в клетках гранулезы и функциональным статусом ооцитов. Выявленные различия позволяют прогнозировать потенциал развития ооцита с учетом деструктивных изменений соматических фолликулярных клеток или их пролиферации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что зебувидный скот (*Bos indicus*) превосходит *Bos taurus* более чем в 2 раза по выходу ооцит-кумулюсных комплексов, как в группе мясного скота, так и в группе молочного (11,3 против 4,8, и 36,2 против 18,1; $P < 0,05$).
2. Среднее количество ооцит-кумулюсных комплексов на самку породы абердин-ангус, полученных от телок 12 месячного возраста, на 2,4 ОКК меньше, чем в группе коров (9,9 против 12,3), при этом относительное количество жизнеспособных ОКК от их общего количества, полученных от телок и коров возраста 2-2,5 года, находится на одном уровне 69% и 67% соответственно. При этом выход эмбрионов, полученных от телок на 8-10 день культивирования был достоверно выше, чем от коров ($P < 0,01$).
3. У молодых самок черно-пестрой голштинизированной породы общее количество ОКК, в том числе жизнеспособных, выше на 16,6% и 15,7% соответственно, чем в группах самок более старшего возраста.
4. У коров голштинизированной черно-пестрой породы не установлено достоверных различий по количеству ОКК, полученных в среднем на один яичник с желтым телом ($7,26 \pm 1,07$) и без такового ($8,33 \pm 0,83$). При разном морфофункциональном статусе яичников наблюдается та же тенденция по числу жизнеспособных ОКК $3,07 \pm 0,58$ против $3,57 \pm 0,55$.
5. Установлено равномерное распределения генотипов по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* и *FSHR* в анализируемой выборке животных. Наибольшая частота встречаемости определена для аллеля L гена *GH* (0,942), аллеля А гена *PRL* (0,898), аллеля В гена *Pit-1* (0,710), аллеля С гена *FSHR* (0,833) что свидетельствует о проводимой селекции по признакам молочной продуктивности в хозяйствах.
6. При анализе SNP, животные с генотипом LL в сравнении с особями с генотипом LV гена *GH* отличались высоким выходом ОКК в среднем на один яичник (LL к LV +7,54 шт, $p \leq 0,05$), а также высоким выходом жизнеспособных ОКК (LL к LV +4,5 шт, $p \leq 0,05$). Не определено достоверных различий между группами животных с генотипами AA и AB гена *PRL* по показателю ОКК в среднем на голову, однако из яичников коров с генотипом AA было

получено большее количество жизнеспособных ОКК (+4,84 шт, $p \leq 0,01$). Анализ связи полиморфных вариантов гена *Pit-1* с количеством и качеством ОКК не выявил значимых различий в исследуемой группе особей.

7. Анализ влияния комплексного генотипа генов *GH/PRL/Pit-1* на исследуемые параметры показал, что выход ОКК (в том числе и жизнеспособных) в группе животных с генотипом LL/AA/BB более высокий, чем в группе особей с генотипом LL/AB/AB ($8,95 \pm 1,92$ против $3,00 \pm 0,69$, $P < 0,05$).
8. Сравнение средних показателей ПЦ по признаку молочной продуктивности в зависимости от общего выхода ОКК и выхода жизнеспособных ОКК не выявило достоверных различий. Однако, наблюдалась некоторая тенденция к положительной связи ПЦ по молочной продуктивности и общим количеством ОКК и отрицательной связи уровня ПЦ по молочной продуктивности и выходу жизнеспособных ОКК.
9. Установлено, что уровень холестерина в жидкости овариальных фолликулов ассоциирован с количеством жизнеспособных ОКК ($r = 0,69$, $P < 0,01$).
10. Уровень эстрадиола в фолликулярной жидкости коров, содержащей ооциты, завершившие фазу роста *in vivo*, превышает таковой в фолликулах, содержащих ооциты, находящиеся в фазе роста. А уровень тестостерона, ниже в жидкости фолликулов, содержащих ооциты, тестированные, как завершившие рост.
11. Установлено, что интенсивность апоптоза и высокий уровень пикнозов в клетках гранулезы овариальных фолликулов коров тесным образом связана с функциональным статусом ооцита

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. При отборе самок–доноров ооцитов рекомендуем проводить ДНК тестирование по генам *GH*, *PRL*, *Pit-1* для выявления животных с высоким репродуктивным потенциалом.
2. С целью донации ооцитов в программах получения эмбрионов *in vitro* предпочтительнее использовать телок и молодых самок, независимо от стадии эстрального цикла.
3. Полученные интерьерные показатели у коров могут быть использованы при разработке и совершенствовании систем культивирования ОКК, с целью дозревания ооцитов *in vitro*.
4. Результаты исследований могут быть использованы студентами и аспирантами сельскохозяйственных, ветеринарных, медицинских ВУЗов, научными сотрудниками НИИ, специалистами в области воспроизводства и биотехнологии животных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСТ – аспаратаминотрансфераза

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

Генотипирование – молекулярно-генетические методы, позволяющие выявить различия между индивидами на уровне генов или ДНК

ГнРГ – гонадотропин–релизинг гормон

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖТ (CL) – желтое тело (*corpus luteum*)

МДБ – массовая доля белка

МДЖ – массовая доля жира

мМ, μ М – миллимолярная и микромолярная концентрация, соответственно

мт ДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

ОКК – ооцит-кумулярный комплекс

Олигонуклеотид – короткая последовательность дезоксирибонуклеотидов одноцепочечной ДНК

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ДНК

Праймер – олигонуклеотид, служащий затравкой в ПЦР

ПЦ – племенная ценность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Ферменты рестрикции – ферменты, расщепляющие ДНК в строго определенных участках, позволяющие выявить однонуклеотидные полиморфизмы в этих участках

ФЖ – фолликулярная жидкость

ФСГ (FSH) – фолликулостимулирующий гормон

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

BСS – оценка физического состояния (кондиции) животного

ЕТ – (embryo transfer), перенос эмбрионов в организм реципиента

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста - 1

ISSR маркеры – высокополиморфные маркеры для полилокусного генотипирования

IVC – (in vitro cultivation) культивирование эмбрионов

IVF – (in vitro fertilization) оплодотворение ооцитов

IVM – (in vitro maturation) созревание ооцит-кумулюсных комплексов

NEB – (negative energy balance) отрицательный энергетический баланс

OPU или ТАО – (ovum pick up или трансвагинальная аспирация ооцитов) прижизненная пункция овариальных фолликулов

SNP – (Single nucleotide polymorphism), однонуклеотидный полиморфизм

ZP – (zona pellucida) зона пиллюцида

χ^2 – критерий Пирсона соответствия наблюдаемой частоте встречаемости генотипа в популяции теоретически ожидаемой частоте

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голубец Л.В. Экстракорпоральное оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота: методические рекомендации / Голубец Л.В., А.С. Дешко, М.П. Старовойтова, Е.К. Стецкевич, А.Е. Отрощенко, А.И. Бергель. – Гродно: ГГАУ, 2010 – 48 с.
2. Горячева Т. С., Гончаренко Г. М. Генетические варианты к-казеина и пролактина в связи с молочной продуктивностью коров черно-пестрой породы/ Горячева Т. С., Гончаренко Г. М.//Сельскохозяйственная биология. – 2010.–№ 4.–С.51-54.
3. Грин Н. Биология/ Грин Н., Стаут У., Тейлор Д.– М.: Мир, 1990. – 2 т.– 325с.
4. Дешко, А. С. Эффективность получения ооцитов крупного рогатого скота в системе *in vitro*/ Дешко, А. С., Голубец, Л. В., Сехин// Сборник научных трудов «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы». – 2014.– Т. 37.– С. 16-23.
5. Дроздов, Е.В. Аллельный полиморфизм гена P1T-1 в стадах крупного рогатого скота Брянской области и его связь с молочной продуктивностью / Е.В. Дроздов, В.В. Заякин, И.Я. Нам // Известия Самарского НЦ РАН. – 2011. – Т.13. – №5(3). – С. 235-239.
6. Зенкина, В.Г. Регуляторы апоптоза и механизм их действия в женской гонаде/ В.Г. Зенкина, В.С. Каредина, О.А. Солодкова, А.О. Михайлов// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2010. – № 7 – С. 7-14.
7. Калашникова Л.А., Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко. - Московская область, Лесные поляны. 2000. – 31с.
8. Кудинов, А.А. Применение метода BLUP Animal Model для оценки племенной ценности коров айрширской породы Ленинградской области/ А.А. Кудинов, А.В. Петрова, К. В. Племяшов// Генетика и разведение животных. – 2017.–№2.–С.79-85

9. Кузьмина, Т.И. Митохондриальная активность в ооцитах коров, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro*/ Т.И. Кузьмина, Х.М. Мутиева, Л.Н. Ротарь// сборник научных трудов «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы», Гродненский государственный аграрный университет. – 2014. – Т. 26. – С.148-153.
10. Ларкин, Д.М. Значимость геномных исследований для понимания истории формирования домашних животных/ Д.М. Ларкин, Н.С. Юдин // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. –2016.– №4.– С. 123–128.
11. Лебедева, И.Ю. Взаимная модуляция регуляторного влияния пролактина и соматотропина на синтез ДНК в клетках гранулезы коров/ И.Ю. Лебедева, Т.И. Кузьмина, В.А. Лебедев, Т.А. Гойло// Цитология. – 2000.–Т.42.–№5.– С.468-472.
12. Лейбова, В.Б. Взаимосвязь между метаболическим статусом и воспроизводительной способностью у коров черно-пестрой породы/ В.Б. Лейбова, И.Ш. Шапиев, И.Ю. Лебедева// Проблемы биологии продуктивных животных. – 2011.– №4.– С. 70-72.
13. Лейбова, В.Б. Метаболическое состояние в конце периода раздоя у высокопродуктивных молочных коров с разной воспроизводительной способностью/ В.Б. Лейбова, И.Ш. Шапиев, И.Ю. Лебедева// Сельскохозяйственная биология. –2011.– №6.–С. 103-109.
14. Леткевич, Л.Л. Состояние ооцит-кумулюсных комплексов выбракованных коров и их способность к оплодотворению вне организма/ Л.Л. Леткевич, Ф.И. Ганджа, И.В. Костикова, Е.Д. Ракович // Зоотехническая наука Беларуси. – 2008.–Т.43 (1).–С.81-87.
15. Лычкова, А. Э. Пролактин и серотонин/ А.Э. Лычкова, А.М. Пузииков // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014.–Т. 69.– № 1-2.– С. 38–45.
16. Мадисон, В. Трансплантация эмбрионов: бразильский феномен/ В. Мадисон// Белорусское сельское хозяйство. –2018.– №12 (200).–С. 55–58.

17. Максимов, В.Н. Основы физиологии: учебное пособие / В.Н. Максимов, И.Н. Медведев. – СПб. : Лань, 2013. – 280с
18. Меркурьева, Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве / Е.К. Меркурьева. -М.: Колос, 1977. – 239 с.
19. Никитин, В.Я. Трансплантация эмбрионов коров – основа антикризисных программ в животноводстве/ В.Я. Никитин, З.Я. Никитина // Актуальные проблемы и достижения в области репродукции и биотехнологии размножения животных: Сб. науч. тр. – Ставрополь. – 1998.–С. 138–140.
20. Никиткина, Е.В. Влияние молочной продуктивности на показатели воспроизводительной функции коров/ Е.В. Никиткина, С.В. Дорощук, И.Ш. Шапиев // Бюллетень ГНУ ВНИИГРЖ. –2012. – выпуск 151. – С.49-52.
21. Пестис, В.К. Первый опыт получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов (ТАО)/ В.К. Пестис, Л.В. Голубец, А.С. Дешко// Вести национальной академии наук Белоруссии. – 2015.– № 1.– С. 86-91.
22. Пестис, В.К. Эффективность получения ооцитов методом трансвагинальной аспирации у коров-доноров/ В.К. Пестис, Л.В. Голубец, А.С. Дешко // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сб. науч. тр. под ред. чл.-корр. НАН Беларуси В. К. Пестиса. –Т. 26. Зоотехния. – Гродно: ГГАУ, 2014. – 123 с.
23. Племяшов, К.В. Молекулярные маркеры в повышении воспроизводства молочного скота/ К.В. Племяшов, А.Ф. Яковлев// Генетика и разведение животных. –2017.– №4.–С. 3–11.
24. Племяшов, К.В. Ленинградская область – платформа развития геномной селекции уже сегодня/ К.В. Племяшов, А.А. Кудинов// Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Новые подходы к научному обеспечению АПК и развитию сельских территорий». –2014.–С.50–54.
25. Племяшов, К.В. Селекция голштинского скота при чистопородном разведении/ К.В. Племяшов, Е.И. Сакса, О.Е. Барсукова// Генетика и разведение животных. –2016.– №1.– С.8-16.

26. Плохинский, Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. - М.: Изд-во МГУ, 1970. - 367 с.
27. Позовникова, М.В. Связь полиморфизма гена Pit-1 продуктивными признаками голштинизированного черно-пестрого скота/ М.В. Позовникова, Г.Н. Сердюк // Генетика и разведение животных. – 2017.–№ 4.–С. 37-41.
28. Позовникова, М.В. Связь полиморфизма гена Pit-1 с хозяйственно-полезными признаками коров айрширской породы/ М.В. Позовникова, О.В. Тулинова, Г.Н. Сердюк, Л.И. Васильева// Вестник ветеринарии. –2016. –№79(4). – С. 54–60.
29. Прохоренко, П.Н. Интенсификация молочного скотоводства на основе использования голштинской породы/ П.Н. Прохоренко// Бюллетень ГНУ ВНИИГРЖ. –2012.– выпуск 151.– С.3-6.
30. Пташинская, М. Краткое руководство по репродукции животных. Крупный рогатый скот часть 1 и 2/ М. Пташинская. – 10-е изд., перераб. и доп. [перевод: Давыдова Н.Ю.]. – Intervet International, 2012.–78с.
31. Ротарь, Л.Н. Морфологическая оценка ооцит-кумулясных комплексов коров разного типа продуктивности в технологии получения эмбрионов *in vitro*/ Л.Н. Ротарь, J.F. Souza// Качественный рост российского агропромышленного комплекса: возможности, проблемы и перспективы: Материалы деловой программы XXVII международной агропромышленной выставки «АГРО-РУСЬ – 2018» – СПб: СПбГАУ, 2018. – С. 214–216.
32. Ротарь, Л.Н. Апоптоз соматических клеток фолликулов в яичниках коров и его взаимосвязь с уровнем стероидных гормонов в фолликулярной жидкости и ВСВ-диагностикой ооцитов/ Ротарь Л.Н., Политов В.П.//Известия СПб ГАУ. - 2017.- № 2 (47).- С.100-104.
33. Сакса, Е.И. Вклад сотрудников лаборатории генетики и селекции черно-пестрого и голштинского скота в совершенствовании породы/ Е.И. Сакса, О.Е. Барсукова// Генетика и разведение животных. –2015.–№3.–С.49-56.

34. Свиридов Б.Е. Суперовуляция у высокопродуктивных коров/ Б.Е. Свиридов, Е.В. Никиткина, Е.М. Пестунович// Бюллетень ГНУ ВНИИГРЖ. –2015. –выпуск 151. – С.75-77.
35. Селионова, М.И. Геномные технологии в селекции сельскохозяйственных животных/ М.И. Селионова, А.М. Айбазов // Сборник научных трудов ГНУ СНИИЖК. - 2014. - №7 (1). - С.140-145.
36. Столповский, Ю.А. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR маркеров у пород крупного рогатого скота/ Ю.А. Столповский, М. Ахани Азари, А.Н. Евсюков, Н.В. Кол, М.Н. Рузина, В.Н. Воронкова, Г.Е. Сулимова. //Генетика. –2011.–Т. 47.– № 2.–С. 213–226.
37. Тележенко, Е.В. Влияние геномной селекции на стратегию развития племенного молочного животноводства/ Е.В. Тележенко // Молочное и мясное скотоводство. –2016.–№3.–С.3–6.
38. Терлецкий, В.П. Использование современных молекулярно-генетических методов в генотипировании сельскохозяйственных животных: методическое пособие / В.П. Терлецкий, К.В. Племяшов, В.И. Тыщенко, Н.В. Дементьева - СПб-Пушкин, 2014. 43с.
39. Часовщикова, М.А. Генетические варианты пролактина в связи с продуктивностью коров черно-пестрой породы / М.А. Часовщикова // Вестник ИрГСХА. –2012. – №53(12). – С.105-109.
40. Элдер, К. Экстракорпоральное оплодотворение / К. Элдер, Б. Дэйл. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 304 с.
41. Юдин, Н.С. Молекулярно-генетические маркеры экономически важных признаков у молочного скота /Н.С. Юдин, М.И. Воевода //Генетика. - 2015. - Т.51. - №5. - С.600-612.
42. Яковлев, А.Ф. Использование ДНК-маркеров в селекции голштинского скота / А.Ф. Яковлев // Генетика и разведение животных. –2014.– №2.– С.3-6.

43. Янчуков, И. Роль геномной оценки в разведении молочного скота/ И. Янчуков, А. Ермилов, С. Харитонов, М. Глущенко// Молочное и мясное скотоводство. –2013.—№8.—С.6-8.
44. Adjaye, J. Whole-genome approaches for large-scale gene identification and expression analysis in mammalian preimplantation embryos/ J. Adjaye// *Reproduction, Fertility and Development*. – 2005.— V.17.—№1–2.— P.37–45.
45. Adjaye, J. Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression/ J. Adjaye, R. Herwig, T. C. Brink// *Physiological Genomics*.— 2007.—V. 31.— №2.—P. 315–327.
46. Alvarez, P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment/ P. Alvarez, L.J. Spicer, C.C. Chase, M.E. Payton, T.D. Hamilton, R.E. Stewart// *Journal of Animal Science*.— 2000.— № 78.— P. 1291–1302.
47. Alves, B.G. 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. Lucio, M.C. Martins, T.H. Silva, L.S. Braga, T.V. Silva, M.A. Viu, M.E. Beletti, J.O. Jacomini, R.M. Santos, M.L. Gambarini // *Animal Reproduction Science*.— 2014.— V.146.— №3–4.— P.117–125.
48. Armstrong, D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence / D.T. Armstrong // *Theriogenology*.— 2001.—V.55.—№6.— P.1303–1322.
49. Arshad, H.M. Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes/ H.M. Arshad, N. Ahmad, H. Zia-ur-Rahman, N.A. Samad, N. Akhtar, S. Ali// *Pakistan Veterinarian Journal*.— 2005.—V.25.— №4.— P.189–193.
50. Balaban, B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation/ B. Balaban, B. Urman // *Reproductive Biomedicine Online*.—2006.—V. 12. — P.608–615.
51. Baldrighi, J.M. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same

- management/ J.M. Baldrighi, M.F. Sa Filho, E.O.S. Batista, R.N.V.R. Lopes, J.A.Visintin, P.S. Baruselli // *Reproduction of Domestic Animals.*– 2014.–V.49.– P.1015–1020.
52. Balogh, O. AluI polymorphism of the bovine growth hormone (GH) gene, resumption of ovarian cyclicity, milk production and loss of body condition at the onset of lactation in dairy cows./ O. Balogh, K. Kovacs, M. Kulcsar, A. Gaspardy, A. Zsolnai, L. Katai, G. Huszenicza // *Theriogenology.*– 2009.–V.71.–№ 4.– P.553–559.
53. Balogh, O. Interrelationships of growth hormone AluI polymorphism, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein–Friesian cows/ O. Balogh, O. Szepes, K. Kovacs, M. Kulcsar, J. Reiczigel, J.A. Alcazar, M. Keresztes, H. Febel, J. Bartyik, S. G. Fekete, L. Fesus, G. Huszenicza // *Veterinari Medicina.*– 2008.– V. 53.–№11.– P. 604–616.
54. Barbat, A. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement/ A. Barbat, P. Le Mezec, V. Ducrocq, S. Mattalia, S. Fritz, D. Boichard, C. Ponsart, P. Humblot// *Journal of Reproduction and Development.*– 2010.– № 56. –P. 15–21.
55. Baruselli, P.S. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental and reproductive stages/ P.S. Baruselli, E.O.S. Batista, L.M.Vieira, R.M. Ferreira, B.G. Guerreiro, B.M. Bayeux, J.N.S. Sales, A.H. Souza, L.U. Gimenes// *Animal Reproduction.*–2016.–V.31.– №3.– P.264–272.
56. Baruselli, P.S. Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows/ P.S. Baruselli, L.M. Vieira, M.F. Sa Filho, R.D. Mingoti, R.M. Ferreira, M.R. Chiaratti, L.H. Oliveira, J.N. Sales, R. Sartori// *Theriogenology.*– 2016.– V.86.– P. 263–269.
57. Berry, D.P. Milk Production and Fertility in Cattle/ D.P. Berry, N.C. Friggens, M. Lucy, J.R. Roche// *Annual. Rev. Animals Bioscience.*–2016.–V.4. – P.269–290.
58. Berry, D.P. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle / D.P. Berry, E. Wall , J.E. Pryce// *Animal.*– 2014.– V.8.– P.105–121.

59. Besnard, N. Prolactin and lipopolysaccharide treatment increased apoptosis and atresia in rat ovarian follicles/ N. Besnard, E. Horne, S.Whitehead// *Acta physiologica Scandinavica*. –2001.– V.172.–№1.– P. 17–25.
60. Blondin, P. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes/ P. Blondin, D. Bousquet, H. Twagiramungu, F. Barnes, M.A. Sirard// *Biology of Reproduction*.– 2002.–V.66.– P.38–43.
61. Boerjan, M.L. Embryonic origins of health: long-term effects of IVF in human and livestock/ M.L. Boerjan, J.H. den Daas, S.J. Dieleman, // *Theriogenology*.– 2000.– V.53.–P.537–547.
62. Boni, R. Origins and effects of oocyte quality in cattle/ R. Boni// *Animal Reproduction*.–2012. – V.9.–№3. – P.333–340.
63. Boni, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis/ R. Boni// *Animal Reproduction*. –2012.– V.9.–№3.– P.362–369.
64. Bousquet, D. Fertilization in vitro of bovine oocytes: analysis of some factors affecting the fertilization rates/ D. Bousquet, A. Goff, W.A. King, T. Greve// *Veterinary Research*.– 1988.– V. 52.–№2.– P. 277–279.
65. Caixeta, E. S. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence/ E.S. Caixeta, P. Ripamonte, M.M. Franco, J.B. Junior, M.A.N. Dode// *Reproduction, Fertility and Development*.– 2009.– V. 21.–№5.– P. 655–664.
66. Carvalho, J.B.P. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers/ J.B.P. Carvalho, N.A.T. Carvalho, E.L. Reis, M. Nichi, A.H. Souza, P.S. Baruselli // *Theriogenology*. – 2008.– V.69.– P.167–175.
67. Chan, W. Molecular genetics, biochemical and clinical implications of gonadotropin receptor mutations/ W. Chan// *Molecular Genetic Metabolism*. – 1998.– V. 63.–P. 75–84. 26.

68. Cochran, S. D. Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle/ S.D. Cochran, J.B. Cole, D.J. Null, P.J. Hansen // *BMC Genetics*.–2013.–V.49.–№ 14.–P.171–182.
69. Cooke, N.E. Human prolactin cDNA structural analysis and evolutionary comparisons/ N.E. Cooke, D. Coit, J. Shine// *Biological Chemistry*.–1981.–V.25.–№8.–P. 4007-4016.
70. Dalai, N. 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 Journal of Livestock Research*.– 2017.–V.10.–№7.– P.233– 237 .
71. Djokovic, R. Relationship between blood metabolic hormones, metabolites and energy balance in Simmental dairy cows during peripartum period and lactation/ R. Djokovic, M. Cincovic, B. Belic, B.Toholj, I. Davidov, T. Hristovska// *Pakistan Veterinarian*.–2015.– V.35.–№2 .– P.163–167.
72. Dumesic, D.A. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health/ D.A. Dumesic, D.R. Meldrum, M.G. Katz-Jaffe, R.L. Krisher R.L., W.B. Schoolcraf // *Fertility and Sterility*.– 2015.–V. 103.– P. 303–316.
73. Erickson, B.H. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow/ B.H. Erickson, R.A. Reynolds, R.L. Murphree// *Biology Reproduction*.– 1976.– V.15.– P.555–560.
74. Evans, A. C. Use of microarray technology to profile gene expression patterns important for reproduction in cattle/ A.C. Evans, N. Forde, G.M. O’Gorman, A.E. Zielak, P. Lonergan, T. Fair// *Reproduction in Domestic Animals*.– 2008.–V. 43.–№2.– P. 359–367.
75. Fadeel, B. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease / B. Fadeel, S.Orrenius// *J. Int. Med*.–2005.–V. 258.– №6. – P. 479–517.
76. Fortune, J. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle/ J. Fortune, G. Rivera, M. Yang// *Animal Reproduction Science*. – 2004.–V. 82.–P.109–126.

77. Freeman, M.E. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion/ M.E. Freeman, B. Kanyicska, A. Lerant, G. Rgynagy// *Physiological Reviews.*–2000.– V.80.№4.–P.1523–1631.
78. Gala, R.R. Evidence for the release of a prolactin-like substance by mouse lymphocytes and macrophages/ R.R. Gala, E.M. Shevach// *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*– 1994. –V.205.–№1. –P.12–19.
79. Galli, C. Bovine embryo technologies/ C. Galli, R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina, G. Lazzari// *Theriogenology.*– 2003.– V.59.– P.599-616.
80. Ghanta, S. Mitochondrial protein acetylation as a cellintrinsic, evolutionary driver of fat storage: chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications/ S. Ghanta, R.E. Grossmann, C. Brenner// *Biochemical Molecular Biology.*–2013.– V.48. – P.561–574.
81. Gong J.G., Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications/ J.G. Gong// *Domestic Animals Endocrinology.* –2002. – V. 23. –№1–2. – P. 229 – 241.
82. Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos// *Biotechnology in Agriculture.*–1994. – №11.–UK: CAB International.
83. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos: Second Edition *Biotechnology in Agriculture No. 27 Department of Animal Science and Production University College Dublin Ireland CABI Publishing.*– 2003 .–548 p.
84. Gosden, R. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid/ R. Gosden, R. Hunter, E. Telfer, C. Torrance, N. Brown// *Reproduction, Fertility and Development.*–1988.–V. 82.–№2.–P.813–825.
85. Grochowska, R. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene/ R. Grochowska, P. Sorensen, L. Zwierzchowski, M. Snochowski, P.J. Lovendahl // *Journal of Animal Science.*– 2001.– V.79.–№2 .– P. 470–476.
86. Grossi, D. Effect of IGF1, GH, and PIT1 markers on the genetic parameters of growth and reproduction traits in Canchim cattle/ D. Grossi, M.E. Buzanskas, N.V.

- Grupioni, C.C.P. de Paz, L.C. de Almeida Regitano, M.M. de Alencar, D.P. Munari // *Molecular biology reports.*– 2015.–V. 42.–№1.– P. 245–251.
87. Guyader, J.C. Identification of contrasted phenotypes in the bovine from repeated in vivo and in vitro embryo production following superovulation/ J.C. Guyader, S. Ponchon, C. Gonzales// *Reproduction Fertility and Development.*–2008.– V. 20.– P. 131–132.
88. Hadi, Z. The relationship between growth hormone polymorphism and growth hormone receptor genes with milk yield and reproductive performance in Holstein dairy cows/ Z. Hadi, H. Atashi, M. Dadpasand, A. Derakhshandeh, M.G. Seno// *Iranian journal of veterinary research.*– 2015.– V.16.–№3.– P. 244–248.
89. Hajarian, H. The presence of corpus luteum has negative impact on in vitro developmental competency of bovine oocytes/ H. Hajarian, M.H. Shahsavari, H. Karami-Shabankareh, M. Dashtizad// *Reproductive Biology.*–2016.–V.16.–№1.– P.47–52.
90. Karami, S. H. The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows/ S.H. Karami, K.N. Moradi, H. Hajarian// *Animal reproduction science.*– 2013.– V.140.–№3–4.–P.109–114.
91. Hassan, A.H. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection/ A.H. Hassan, S.A. Hisham, D. El-Gezeiry, I. Baghdady, I. Ismaeil, J. Mandelbaum// *Human Reproduction.*– 1998.–V.13.–№34.–P.25–30.
92. Haugen, B.R. A thyrotrope-specific variant of pit-1 transactivates the thyrotropin β -promoter / B.R. Haugen, W.M. Wood, D.F Gordon, E.C. Ridgeway// *Biological Chemical.*–1993. –V. 268.–№28.–P. 2818-2824.
93. Hediger, R. Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and to 11 q25-qter in sheep by in situ hybridization/ R. Hediger, S.E. Johnson, W. Barendse // *Genomics.*–1990.–V. 8.– №1.–P.171–174.

94. Heleil, B. Involvement of granulosa cells in realization of prolactin effects on the developmental competence of bovine oocytes matured in vitro/ B. Heleil, T. Kuzmina, H. Alm // *Journal of American Science*.–2010. –V.6.–№9.–P. 796–805.
95. Houde, A. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues/ A. Houde, A. Lambert, J. Sau-mande, D.W. Silversides, J.G. Lussier// *Molecular Reproduction and Develop-ment*.– 1994.–V.39.– P.127–135.
96. Huhtaniemi, H. Mutations of follicle-stimulating hormone and its receptor: Effects on gonadal function/ H. Huhtaniemi, K. Aittomaki// *European J. Endocrinology*.– 1998.–V. 138.– P. 473–481.
97. Hull, K.L. GH as a co-gonadotropin: The relevance of correlative changes in GH secretion and reproductive state/ K.L. Hull, S. Harvey// *Endocrinology*.–2002. – V. 172.–P. 1–19.
98. Hull, M.G. The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fer-tilization./ M.G. Hull, C.F. Fleming, A.O. Hughes, A. McDermott// *Fertility Ste-ri-ility*.– 1996.–V. 65.– P. 783–790.
99. Humblot, P. Reproductive technologies and genomic selection in cattle [Электронный ресурс]/ P. Humblot, D. Le Bourhis, S. Fritz, J.J. Colleau, C. Gon-zalez, C.G. Joly, A. Malafosse, Y. Heyman, Y. Amigues, M. Tissier, C. Ponsart// *Veterinary Medicine International*.–2010.–Article ID 192787.– 8 p. – <http://dx.doi.org/10.4061/2010/192787>
100. Humblot, P. Mesures phenotypiques et etude du polymorphisme de genes candidats de QTL de fertilité femelle en race Prim Holstein/ P. Humblot, G. Noe, C. Ponsart // of the 7th Seminar AGENAE, France.– 2009.– P. 79–80.
101. Hyun-Joo, L. Survey on the incidence of reproductive disorders in dairy cat-tle/ L. Hyun-Joo, Y. Ho-Beak, I. Harim, P. Jihoo, C.Yong-il, J.Yeon-Seop, K. Kwang-Seok, I. Seok-Ki // *Journal of Embryo Transfer*.–2015.–V.30.– №1.–P.59–64.

102. Iwata H., Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes/ H. Iwata, H. Goto, H. Tanaka, Y. Sakaguchi, K. Kimura, T. Kuwayama, Y. Monji// *Reproduction, Fertility and Development.*–2011.–V.23.–№3.– P. 424–432.
103. Ireland, J.L.H. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle/ J.L.H. Ireland, D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, A.P.N. Themmen, F. Ward, P. Lonergan, G.W. Smith, G.I. Perez, A.C.O. Evans, J.J. Ireland// *Biology of reproduction* .–2008.–V.79.–P. 1219–1225.
104. Itami, N. Promotion of glucose utilization by insulin enhances granulosa cell proliferation and developmental competence of porcine oocyte grown in vitro/ N. Itami, Y. Munakata, K. Shirasuna, T. Kuwayama, H. Iwata// *Zygote.*–2017.–V.25.–P. 65–74.
105. Iwata, H. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes/ H. Iwata, H. Goto, H. Tanaka, Y. Sakaguchi, K. Kimura, T. Kuwayama, Y. Monji// *Reprod Fertil Dev.*–2011.–V.23.–P. 424–432.
106. Izadyar, F. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation/ F. Izadyar, W.J. Hage, B. Colenbrander, M.M. Bevers// *Mol. Reprod. Dev.*– 1998.– V. 49.– P. 444–453.
107. Izadyar, F. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development / F. Izadyar, B. Colenbrander, M.M. Bevers// *Mol. Reprod. Dev.*–1996.– V. 45.– P. 372–377.
108. Jolly, P.D. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrane granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes/ P.D. Jolly, P.R. Smith, D.A. Health, N.L. Hudson, S. Lun, L.A. Still, C.H. Watts, K.P. McNatty// *Biol. Reprod.* – 1997.– V.56.– P. 837–846.

109. Joudrey, E.M. Expression of growth hormone and its transcription factor, Pit-1, in early bovine development/ E.M. Joudrey, D. Lechniak, J. Petrik, W.A. King // *Mol. Reprod. Dev.* –2003. – V. 64.– P. 275–283.
110. Katarzyna, W.M. Prolactin gene polymorphism and somatic cell count in dairy cattle / W.M. Katarzyna, M. Kmic, J. Strzalaka // *Journal Animal Veterinary Advance.*–2008.– V.7 (1). –P.35–40.
111. Khatib, H. Validation of in vitro fertility genes in a Holstein bull population/ H. Khatib, R.L. Monson, W. Huang, R. Khatib, V. Schutzkus, H. Khateeb, J.J. Parrish// *Journal of Dairy Science.*–2010.– V. 93.–№5.–P. 2244-2249.
112. Ko, M. S. H. Embryogenomics of pre-implantation mammalian development: current status/ M.S.H. Ko// *Reproduction, Fertility and Development.*–2004.– V.16.–№1–2.– P. 79–85.
113. Kovacs, K. Associations between the AluI polymorphism of growth hormone gene and production and reproduction traits in a Hungarian Holstein-Friesian bull dam population / K. Kovacs, J. Voegyí-Csik, A. Zsolnai, I. Cyorkos, L. Fesus // *Arch.Tierz.* – 2006. –V.49. №3. – P.236–249.
114. Kudinov, A. Developing a genetic evaluation system for milk traits in Russian black and white dairy cattle/ A. Kudinov, J. Jarmo, E. A. Mäntysaari, I. Strandén, E.I. Saksa, M.G. Smaragdov, P. Uimari// *Agricultural and Food Science.*–2018.– V.27.–P.85–95.
115. Lebedeva, I.Y. Prolactin in follicular fluid and intracellular store calcium in follicular cells are related to morphological signs of ovarian follicle atresia in cows: work in progress/ I.Y. Lebedeva, V.Y. Denisenko, V. Lebedev, T. Kuzmina// *The-riogenology.*– 1998.– V.49. –№ 3. – P. 9–19.
116. Lechniak, D. In vitro maturation and fertilisation of bovine oocytes in relation to GH gene polymorphism (Leu/Val)/ D. Lechniak, T. Adamowicz, D. Stanislawski, D. Kaczmarek// *Reproduction Nutrition Development.*– 2002.–V.42.– №3.– P.275–280.
117. Leroy, J.L.M.R. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I the importance of negative energy balance and altered

- corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows/ J.L.M.R. Leroy, G. Opsomer, A. Van Soom, I.G.F. Goovaerts, P.E.J. Bols// *Reproduction in Domestic Animals*.–2008.–V.43.–№5.–P. 612–622.
118. Leroy, J.L.M.R. Fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows/ J.L.M.R. Leroy, A. Van Soom, G. Opsomer, I.G.F. Goovaerts, P.E.J. Bols// *Reproduction in Domestic Animals*.–2008.–V. 43.–№ 5.–P. 623–632.
119. Leroy, J.L. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro./ Leroy J.L., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., de Kruif A., Genicot G., Van Soom A. // *Reproduction*.- 2005.- V.130 N.4.- P. 485–495.
120. Lewin, H.A. Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing/ H.A. Lewin, K. Schmitt, R. Hubert // *Genomics*.– 1992.– V.13.– P. 44–48.
121. Loftus, R.T. Evidence for two independent domestications of cattle/ R.T. Loftus, D.E. Mac Hugh, D.G. Bradley// *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*.– 1994.– V. 91.– P. 2757–2761.
122. Lonergan, P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns/ P.Lonergan, D. Rizos, A. Gutierrez-Adan, T. Fair, Boland MP. // *Reprod Domest Anim*. – 2003.–V.38.–P.259–267.
123. Lonergan P., Fair T., Forde N., Rizos D. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 2016, 86(1): 270-277 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.040).
124. Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip TAM. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res*, 1989. 24:197–204.
125. Lu, K.H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro/ K.H. Lu, I. Gordon, M. Gallagher, H. McGovern // *Vet Rec*.–1987.–V.121.–P.259–260.

126. Lucy, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?/ Lucy, M.C. // *Journal of Dairy Science.*—2001.—V.84.—№6.— P.1277–1293.
127. Lucy, M.C. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production / M.C. Lucy, S.D. Hauser, P.J. Eppard // *Domest. Anim. Endocrinol.* – 1993.— V.10.— № 4.— P.325–333.
128. Santos, M.V.O. Influencia do corpo luteo sobre a recuperação de oocitos imaturos bovinos derivados de fêmeas post-mortem/ M.V.O. Santos, L.B.Q. Neta, A.A. Borges, A. Pereira // *HOLOS.*— 2017.—V.7.—№33.—P.278–283.
129. Simoni, M.J. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: Identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms/ M. J. Simoni, W. Gromoll, A. Hoppner, T. Kamischke, D. Krafft, E. Sthle// *J. Clin. Endocrinol. Metab.*—1999.—V.84.—P.752–755.
130. Machado, S.A. The variability of ovum pick-up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cows/ S.A. Machado, H.D. Reichenbach, M. Weppert, L.F. Matos, E. Wolf, P.B.D. Goncalvez P// *Theriogenology.*— 2006.— V.65.—P.573–583.
131. Malhi, P.S. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging/ P.S. Malhi, G.P. Adams, R.J. Mapletoft, J. Singh// *Reproduction.*— 2007.—V.134.—P.233–239.
132. Mangalam, H.J. A pituitary POU-domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally/ H.J. Mangalam, V.R. Albert, H.A. Ingraham // *Genes Dev.*—1989. – V.3.— P. 946–958.
133. Marques M.O., L.F. Nasser, R.C.P. Silva, G.A. Bó, J.N.S. Sales, M.F. Sá Filho, E.L. Reis, M. Binelli, P.S. Baruselli. Follicular dynamics and pregnancy rates in *Bos taurus* x *Bos indicus* embryo transfer recipients treated to increase plasma progesterone concentrations *Anim. Reprod.*, v.9, n.2, p.111-119, Apr./Jun. 2012
134. Martins, A. Follicular aspiration of calves oocytes by videoendoscopy: a successful approach to maximize in vitro bovine embryo production./ Martins, A. L.

- Takada, R.G. Abrahao, C.P. Freitas, R.S. Calegari// *Acta Scientiae Veterinariae*.–2007.–V.35.–P.1194–1195.
135. Matoba, S. 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.–V.26.– №2.–P.37–45.
136. Merton, J.S. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up in vitro production embryo-production program/ J.S. Merton, B. Ask, D.C. Onkundi, E. Mullaart, B. Colenbrander, M. Nielen// *Theriogenology*.–2009.–V.72.–№ 7.–P. 885–893.
137. Metin Kiyici J. Relationships between polymorphisms of growth hormone, leptin and myogenic factor 5 genes with some milk yield traits in Holstein dairy cows/ J. Metin Kiyici, K. Arslan, B. Akyuz, M. Kaliber, E.G. Aksel, M.U. Cinar// *International Journal of Dairy Technology*.–2018.–V.8.–P.1–7.
138. Meuwissen, T.H.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps/ T.H.E. Meuwissen, B.J. Hayes, M.E. Goddard // *Genetics*.–2001.– V.157.–№4.– P.1819–1829.
139. Meza, F.J.T. De la congelación de semen y la inseminación artificial a la aspiración folicular y fecundación in vitro, 1a Reunion Regional sobre Reproduccion Asistida en bovinos/ F.J.T. Meza, J.F. Souza, J.H. Rosales, H.R. Angel, A.P. Rodriguez, F.A.M. Lucero, A.R. Gonzalez// *La biotecnología de la reproducción en rumiantes y su aplicación en la ganadería Mexicana, Torreon Coah, Mexico*.–2018.
140. Mikkola, M. Commercial embryo transfer activity in Europe 2017, 34th Annual Meeting A.E.T.E. – Nantes, France, 7th – 8th September 2018.
141. Misrianti, R. Growth hormone gene polymorphism and its association with partial cumulative milk yields of Holstein friesian dairy cattle/ R. Misrianti, A. Anggraeni, E. Andreas, C. Sumantri// *Media Peternakan*. –2012.–V.35.–№3.–P.145–151.

142. Mitra A., Schelee P., Balakrishnan C.R. et al. Polymorphisms at growth-hormone and prolactin loci in Indian cattle and Buffalo // *J. Anim. Breed. Genet.* 1995. V. 112. P. 71-74.
143. Pirestani, A. Effect of ovarian cyclic status on in vitro embryo production in cattle/ A. Pirestani, S.M. Hosseini, M. Hajian, M. Forouzanfar, F. Moulavi, P. Abedi, H. Gourabi, A. Shahverdi, A.V. Taqi Dizaj, M.H. Nasr Esfahani // *Int J Fertil Steril.* –2011.–V.4.–№4.–P.172–175.
144. Moody, D.E. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene and assignment of PIT1 to bovine chromosome / D.E. Moody, D. Pomp, W. Barendse// *Anim Genet.*– 1995.– № 26.– P.45–47.
145. Morrish, F. Myc-dependent mitochondrial generation of acetyl-CoA contributes to fatty acid biosynthesis and histone acetylation during cell cycle entry/ F. Morrish, J. Noonan, C. Perez-Olsen, P.R. Gafken, M. Fitzgibbon, J. Kelleher, M. VanGilst, D. Hockenbery // *J Biol Chem.*– 2010.–V.285.–P. 36267–36274.
146. Munakata, Y. Polyacrylamide gel as a culture substrate improves in vitro oocyte growth from porcine early antral follicles/ Y. Munakata, R. Kawahara-Miki, K. Shirasuna, T. Kuwayama, H. Iwata// *Mol Reprod Dev.*– 2017.– V.84.–P.44-54.
147. Nivet, A.L. Changes in granulosa cells gene expression associated with increased oocyte competence in bovine/ A.L. Nivet, C. Vigneault, P. Blondin, M.A. Sirard // *Reproduction.*– 2013.– V.145.– № 6.– P. 55–65.
148. Ola S.I. Effects of gonadotropins, growth hormone, and activin on enzymatically isolated follicle growth, oocyte chromatin organization, and steroid secretion/ S.I. Ola, J.S. Ai, J.H. Liu// *Mol. Reprod. Dev.*– 2008.– V.75.– P.89–96.
149. Opiela, J. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP)/ J. Opiela, L. Katska-Ksiazkiewicz // *Reprod Biology.*–2013.–V.13.–P.177–183.
150. Patrizio, P. Molecular methods for selection of the ideal oocyte/ P. Patrizio, E. Fragouli, V. Bianchi, A. Borini, D. Wells// *Reproductive Biomedicine Online.*– 2007.–V. 15.–P. 346–353.

151. Penitente-Filho, J.M. Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes/J. M. Penitente-Filho, C. R. Jimenez, A. M. Zolini, E. Carrascal, J. L. Azevedo, C. O. Silveira, F. A. Oliveira, C.A.A. Torres// *Animal Science Journal*.–2015.–V.86.–№2.–P.148–152.
152. Peralta-Torres, J.A. Effect of season on follicular population, quality and nuclear maturation of bovine oocytes under tropical conditions/ J.A. Peralta-Torres, J.R. Ake-Lopez, J.C. Segura-Correa, J.R. Ake-Villanueva// *Anim Reproduction Science*.– 2017. –V.187.–P.47–53.
153. Pers-Kamczyc, E. Growth hormone exerts no effect on the timing of the first zygotic cleavage in cattle/ E. Pers-Kamczyc, E. Warzych, J. Peippo, D. Lechniak// *Theriogenology*.– 2010.– V.74.– № 4.–P. 581–595.
154. Pontes J.H.F. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm/ J.H.F. Pontes, K.C.F. Silva, A.C. Basso, A.G. Rigo, C.R. Ferreira, G.M.G. Santos, B.V. Sanches, J.P.F. Porcionato, P.H.S. Vieira, F.S. Faifer, F.A.M. Sterza, J.L. Schenk, M.M. Seneda// *Theriogenology*.–2010.–№ 74.– P.1349–1355.
155. Qiang Wang. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors/ Qiang Wang, Qing-Yuan Sun// *Reproduction, Fertility and Development*. – 2006.–V.19.–№1.–P. 1-12.
156. Renaville, R. Pit-1 gene *Hinf*I RFLP and growth traits in double-muscle Belgian Blue Cattle / R. Renaville, N. Gengler, I. Parmentier, F. Mortiaux, S. Massart, C. Bertozzi, A. Burny, D. Portetelle // *Journal of Animal Science*.–1997.–V.75. –P.146.
157. 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// *Reproductive Biology and Endocrinology*.– 2009.–V. 7.– № 1.–P. 340-344.
158. Rhodes, F.M. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers/ F.M. Rhodes, G. Death, K.W. Entwistle// *Animal Reproduction Science*.– 1995.–№38.–P.265–277.

159. Richards, J.S. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization/ J.S. Richards, D.L. Russell, R.L. Robker, M. Dajee, T.N. Alliston// *Mol Cell Endocrinology*.–1998.–V. 145.–№1.–P.47–54.
160. Rini Widyastuti, Mas Rizky A.A. Syamsunarno, Takdir Saili, and Arief Boediono. Oocyte Quality and Subsequent In Vitro Maturation of Sheep Oocyte-Cumulus Complex from Ovary with Presence and Absence of Corpus Luteum // *The Veterinary Medicine International Conference*. -2017. – P. 166-174.
161. Rubin, K.C.P. Influence of Nelore blood on the in vivo production of oocytes/ K.C.P. Rubin, J.H.F. Pontes, I. Nonato, J.C. Ereno, H. Pansard, M.M. Seneda// *Acta Scientiae Veterinariae*.– 2005.–V.33–P.183.
162. Singh, S. Effect of the presence of corpus luteum on oocyte recovery and subsequent in vitro maturation and fertilization in buffaloes/ S. Singh, O. P. Dhanda, R. K. Malik// *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*.–2001.–P.166–174.
163. Sartorelli E.S. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows/ E.S. Sartorelli, L.M. Carvalho, D.R. Bergfelt, O.J. Ginther, C.M. Barros // *Theriogenology*.– 2005.–V. 63.–P. 2382–2394.
164. Sartori, R. Metabolic and endocrine differences between *Bos Taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction/ R. Sartori, L.U. Gimenes, P.L.J. Monteiro, L.F. Melo, P.S. Baruselli, M.R. Bastos// *Theriogenology*.–2016.– № 86.– P. 32–40.
165. Sartori, R. Metabolic hormones and reproductive function in cattle/ R. Sartori, M.M. Guardieiro, R.S. Surjus, L.F. Melo, A.B. Prata, M. Ishiguro// *Animal Reproduction*.–2013.– № 10.–P.199–205.
166. Eimei, S. Morphodynamics of ovarian follicles during oogenesis in mice/ S. Eimei, K. Naoko, Y. Masaki // *Microsc. Res. and Techn.* – 2006. – V.6. – № 69. – P. 427–435.
167. Satrapa, R.A. Effect of ovarian superstimulation on expression of genes associated with the oocyte developmental competence of nelore cows/ R.A. Satrapa,

- E. Razza, A.G. Pupulim, C.M. Barros// *Reproduction Fertility and Development.*–2012.–V. 25.–№1.–P.255–259.
168. Schams, D. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals/ D. Schams, B. Berisha, M. Kosmann// *Domest. Anim. Endocrinol.* – 1999. – V.17. – P. 279–285.
169. Schlee, P. Growth hormone and insulin-like growth factor-I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes/ P. Schlee, R. Graml, E. Schallemberger// *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – V.88. – P. 497–500.
170. Segerson, E.C. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows/ E.C. Segerson, T.R. Hansen, D.W. Libby, R.D. Randel, W.R. Getz// *J Animal Science.*– 1984–V.59.–P.1026–1046.
171. Silva, J.R.V. Review: Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis/ J.R.V. Silva, J.R. Figueiredo, R. van den Hurk // *Theriogenology.*– 2009.– V.71.– P. 1193–1208.
172. Silva-Santosa, G.M.G. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle/ G.M.G. Silva-Santosa, L.S. Silotoa, M.F. Hertela, E.R. Andradea, M.I.B. Rubinb, L. Sturionc, F.A. Melo-Sterzad, M.M. Seneda // *Theriogenology.*–2011.–V. 76.–P. 1051–1057.
173. Sinha, Y.N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance / Y. N. Sinha // *Endocrine Review.* –1995. –V.16. –P.354–369.
174. Sirotkin, A.V. Effect of GH and IGF-I treatment on reproduction, growth, and plasma hormone concentrations in domestic nutria (*Myocastor coypus*)/ A.V. Sirotkin, D. Mertin, K. Suvegova// *Gen. Comp. Endocrinol.*–2003.–V.131.–P.296–301.
175. Snijders, S.E.M. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows/ S.E.M. Snijders, P. Dillon, D. O’Callaghan, M.P. Boland// *Theriogenology.*–2000.–V.53.–№4.–P.981–989.

176. Sosa, A.S.A. Genotyping of follicle stimulating hormone receptor gene in fertile and infertile buffalo/ A.S.A. Sosa, K.M. Mahmoud, H.M. Eldebaky, M.M.M. Kandiel // *GlobalVeterinaria*.–2015.–V.15.–№2.–P.163–168.
177. Spandorfer, S.D. Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss/ S.D. Spandorfer, O.K. Davis, L.I. Barmat, P.H. Chung, Z. Rosenwaks // *Fertil Steril*.– 2004.–V.81.–P.1265–1269.
178. Su, L. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up/ L.Su, S. Yang, X. He, X. Li, J. Ma, Y.Wang, G.A. Presicce, W. Ji// *Reproduction in domestic animals*.–2012.–V.47.–№2. – P.184–189.
179. Sugiyama, M. Addition of granulosa cell mass to the culture medium of oocytes derived from early antral follicles increases oocyte growth, ATP content, and acetylation of H4K12/ M. Sugiyama, M. Sumiya, K. Shirasuna, T. Kuwayama, H. Iwata // *Zygote*.– 2016–V. 24.–P.848–856.
180. Takeo, S. Effect of maternal age on the ratio of cleavage and mitochondrial DNA copy number in early developmental stage bovine embryos/ S. Takeo, H. Goto, T. Kuwayama, Y. Monji, H. Iwata // *J Reprod Dev*.– 2013.–V.59.–P.174–179.
181. Takeo, S. Age-associated changes in gene expression and developmental competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events/ S. Takeo, R. Kawahara-Miki, H. Goto, F. Cao, K. Kimura, Y. Monji, T. Kuwayama, H. Iwata // *Mol Reprod Dev*.– 2013.–V. 80.–P.508–521.
182. Thuy, N.T.D. Polymorphism of PIT-1 and prolactin genes and their effects on milk yield in holstein frisian dairy cows bred in vietnam/ N.T.D. Thuy, N.T. Thu, N.H. Cuong, L.V. Ty, T.T.B. Nguyen, D.V.A. Khoa// *Russian Journal of Genetics*.–2018.–V. 54.–№3.–P. 346–352.
183. Tilly, J.L. The role of apoptosis in development, function and dysfunction of the ovaries/ J.L. Tilly, J.K. Pru, B.R. Rueda// *The Ovary*.–2004.–V.19.–P.321–345.
184. Torner, H. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase

- activity/ H. Torner, N. Ghanem, C. Ambros, M. Holker, W. Tomek, C. Phatsara, H. Alm, M.A. Sirard, W. Kanitz, K. Schellander, D. Tesfaye// *Reproduction and Fertility*.–2008.–V.135.–P. 197–212.
185. Tripathi, S.K. Biochemical constituents of ovarian follicular fluid in ruminants and their significance in follicle and oocyte development/ S.K. Tripathi, M. Farman, S. Nandi, V. Girish Kumar, P.S.P. Gupta// *Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis*.–2015.– V.4.–№3.–P.49–56.
186. Van den Hurk, R. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes/ R. Van den Hurk, R. Abir, E.E. Telfer, M.M. Bevers// *Hum Reprod*.– 2000.–V.6.–P.457–474.
187. Vernunft, J.M. Corpus luteum development and its morphology after aspiration of a preovulatory follicle is related to size and steroid content of the follicle in dairy cows/ J.M. Vernunft, T. Weitzel, T. Viergutz// *Veterinarian Medicina*.– 2013.–V.58.–№4.–P.221–229.
188. Viana, J.H.M. Follicular dynamics in zebu cattle/ J.H.M.Viana, A.M. Ferreira, W.F. Sá, L.S.A. Camargo // *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. – 2000.– V.35.–P.2501–2509.
189. Viuff, D. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid/ D. Viuff, L. Rickords, H. Offenber, P. Hyttel, B. Avery, T. Greve, I. Olsaker, J.L. Williams, H. Callesen, P.D. Thomsen // *Biol Reprod*.–1999.–V.60.– 1273-1278.
190. Vliet, C.P. Morphology of immature bovine oocytes/ C.P. Vliet, A. M. Kruip, F. de Loos, C. van Vliet, P. van Maurik// *Molecular reproduction and development*. – 1989. – V.24.–№1–2.– P.197-204.
191. Wagtendonk-de Leeuw, A.M. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring/ A.M. Wagtendonk-de Leeuw, E. Mullaart, A.P. de Roos, J.S. Merton, J.H. den Daas, B. Kemp, L. de Ruigh // *Theriogenology*.– 2000.–V. 53.–P.575–597.

192. Ward, F.A. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology/ F.A. Ward, P. Lonergan, B.P. Enright, M.P. Boland// *Theriogenology*.–2000.–V.54.–№ 3.– P. 433–446.
193. Woollard, J. Rapid communication: Hinfl polymorphism at the bovine Pit-1 locus/ J. Woollard, C.B. Schmitz, A.E. Freeman// *J. Anim. Sci.*–1994.–№72.–P. 3267-3269.
194. Xia, P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality/ P. Xia// *Human Reproduction*. – 1997.–V.12.–P.1750–1755.
195. Xiang, R. Genome-wide comparative analyses of correlated and uncorrelated phenotypes identify major pleiotropic variants in dairy cattle/ R. Xiang, I.M. Mac Leod, S. Bolormaa, M.E. Goddard// *Scientific Reports*.–2017.–V.7.–№1.– P.248-253.
196. Xue, K. Effect of genetic variations of the POU1F1 gene on growth traits of Nanyang cattle / K. Xue, H. Chen, S. Wang, X. Cai, B. Liu, C.F. Zhang, .C.Z. Lei, X.Z. Wang, Y.M. Wang, H. Niu// *Acta Genetica Sinica*. – 2006. –V.33.–№10. – P.901–907.
197. Yamamoto, T. Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes/ T. Yamamoto, H. Iwata, H. Goto, S. Shiratuki, H. Tanaka, Y. Monji, T. Kuwayama// *Mol Reprod Dev*.– 2010.– V. 77.–P.595–604.
198. Yang, W. C. Polymorphisms in the 5' upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows/ W.C. Yang, S.J. Li, K.Q. Tang, G.H. Hua, C.Y. Zhang, J.N. Yu, L.G. Yang// *Animal Reproduction Science*.–2010.–V.119.–№3–4.–P. 172-177.
199. Yasemin, O.N.E.R. Associations between GH, PRL, STAT5A, OPN, PIT-1, LEP and FGF2 polymorphisms and fertility in Holstein-Friesian heifers/ O.N.E.R. Yasemin, O. Yilmaz, O.K.U.T. Hayrettin, A.T.A. Nezh, G.Yilmazbas-Mecitoglu, A. Keskin// *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*.–2017.–V.23.–№4.– P.527–534.

200. Yilmaz, O. 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 Journal of Veterinary and Animal Sciences.– 2016.– V. 40.– P.181–188.
201. Zhang, Z. MiR-31 and miR-143 affect steroid hormone synthesis and inhibit cell apoptosis in bovine granulosa cells through FSHR/ Z. Zhang, C.Z. Chen, M.Q. Xu, L.Q. Zhang, J.B. Liu, Y. Gao, H. Jiang, B. Yuan, J.B. Zhang// Theriogenology.–2019.– V. 123.– P. 45–53.
202. MiX99 Development Team (2015). MiX99: A software package for solving large mixed model equations. Release VIII/2015. Natural Resources Institute Finland (Luke). Jokioinen, Finland. URL: <http://www.luke.fi/mix99>
203. RStudio Team. RStudio: integrated development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. 2015. <https://www.rstudio.com/>. Accessed 27 Jul 2018.