

ЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ ТА ПАРАТИПОВИХ ЧИННИКІВ ПРИ ОТРИМАННІ ЕМБРІОПРОДУКЦІЇ ВІД КОРІВ-ДОНОРІВ

О.Д. Бугров, І.В. Ткачова, Інститут тваринництва УААН

О.С. Погорелов, Харківський Національний аграрний університет ім. Докучаєва

Встановлено вплив чинників породності, інтервалу між вимиваннями ембріонів та типом гормонального препарату на вихід та якість ембріональної продукції у корів-донорів. Визначено величину факторіальної дисперсії кожного з вивчених чинників. Проведено порівняльну оцінку типів гормональних препаратів та їх дозування при отриманні ембріопродукції.

Ключові слова: поліовуляція, корови-донори, чинники, ембріопродукція, генетична група, гормональний препарат

VALUE OF GENETIC AND PARATYPICAL FACTORS AT THE EMBRYOPRODUCE RECEIPT FROM COWS-DONORS

A.D. Bugrov, I.V. Tkachova, Institute of animal science of UAAN

A.S. Pogorelov, Kharkov National Agrarian University by name Dokuchaev

Influencing of factors of breed, interval between washings of embryos and type of hormonal preparation on an output and quality of embryonic products at cows-donors is set. The size of factorial dispersion of each of the studied factors is certain. Comparative estimation of types of hormonal preparations and their dosage at the receipt of embryoproduce is conducted.

Keywords: polyovulation, cows-donors, factors, embryoproduce, genetic group, hormonal preparation.

УДК 636 2 082. 4-089.843

СПОСОБ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ РАСТВОРОВ ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

А.Д.Бугров, В.Н.Хмельков

Институт животноводства УААН

В.И. Шеремета

Национальный аграрный университет, Киев

В статье изложены результаты опытов по замораживанию и длительному хранению растворов фолликулостимулирующего гормона. Установлено, что длительное хранение ФСГ при -12°C и -196°C не снижает его биологическую активность. Предложен способ фасовки, замораживания и применения разовых доз раствора ФСГ в полимерных шприцах, исключающий потери препарата.

Ключевые слова: фолликулостимулирующий гормон, замораживание, донор, суперовуляция, эмбрион, сохранность.

Известно, что раствор препарата фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) теряет свою биологическую активность после разведения, начиная с 12 часов хранения в холодильнике при $2-4^{\circ}\text{C}$ [1]. Поэтому, для более длительного сохранения биологических свойств ФСГ при расфасовке рабочих растворов используют стеклянные флаконы или полиэтиленовые ампулы, которые размещают в морозильной камере [2-4]. Однако эти способы хранения растворов гонадотропных препаратов несовершенны, а главное – они не обеспечивают полного отбора препарата из контейнера после размораживания, из-за чего

возможны потери действующего начала. Кроме того, срок пригодности гонадотропинов, используемых при трансплантации эмбрионов, ограничен двумя годами. Поэтому актуальным вопросом является поиск способов длительного хранения ФСГ.

Цель исследований состояла в разработке способа длительного хранения растворов ФСГ при минусовых температурах ($-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) с обеспечением сохранности биологических свойств препарата и полноты введения животным. [4]

Материалы и методы исследований. Исследования проводили на коровах ОАО ПЗ “Червоний Велетень” Змиевского района Харьковской области, ГПЗ “Тростянець” Черниговской области. В качестве доноров эмбрионов использовали коров красно-пестрой украинской молочной породы в возрасте 5-9 лет, с интервалом после отела 80-90 дней. Были сформированы опытные и контрольные группы животных. Гормональную обработку коров для вызывания полиовуляции проводили на 10-12-й день полового цикла по схеме 1, согласно которой внутримышечно вводили ФСГ-п или ФСГ-супер в общей дозе 50 мг на протяжении 4-х дней утром и вечером, с интервалом 12 часов.

Для приготовления рабочего раствора ФСГ к сухому препарату добавляли 10 мл растворителя (физиологический раствор). В качестве емкостей для фасовки одноразовых доз препарата использовали восемь стерильных полимерных шприцов объемом 2 мл. Заполненные дозированным раствором шприцы маркировали согласно количеству препарата и размещали в вертикальном положении в морозильной камере при $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ или помещали в сосуд Дьюара с жидким азотом. Учитывая увеличение объема раствора во время замораживания для предотвращения при этом потерь препарата, в шприц набирали $0,1-0,2\text{ см}^3$ воздуха. Каждую дозу препарата перед использованием согласно схеме оттаивали при комнатной температуре, или в руке, а затем осуществляли внутримышечную инъекцию донору.

Животным опытных групп вводили препарат ФСГ, который хранился при минусовой температуре, а в контрольных группах использовали только что разбавленный препарат (опыт 1, 2) и хранившийся до двух суток при $2-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (опыт 3).

Схема. Гормональная обработка коров-доноров препаратами ФСГ

День полового цикла	Технологические этапы и инъекции препаратов	Общая доза, мг	Доза на одно введение			
			мг		мл	
			утро	вечер	утро	вечер
10-12-й	ФСГ	14,0	7	7	1,4	1,4
11-13-й	ФСГ	12,0	6,5	6,5	1,3	1,3
12-14-й	ФСГ	13,0	6,0	6,0	1,2	1,2
	простагландин	1	0,5	0,5	2,0	2,0
13-15-й	ФСГ	11,0	5,5	5,5	1,1	1,1
14-16-й	искусственное осеменение					
21-22-й	нехирургическое извлечение эмбрионов					

Коров-доноров осеменяли заморожено–оттаянной спермой с 20 млн. активных спермиев в дозе через 48 часов после введения простагландина (эстрофан) трехкратно (утром и вечером), с интервалом 12 часов. Эмбрионы получали на 7-й день после первого осеменения с помощью двухканального катетера, для чего использовали систему самотока, которая представляет собой две гибкие трубки длиной по 1,5 м, диаметром 4-5 мм, соединенные между собой тройником. Для вымывания применяли фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с

добавлением 1% фетальной сыворотки теленка. Поиск и морфологическую оценку эмбрионов проводили с помощью микроскопа МБС-10.

Результаты исследований. При решении поставленной цели научный поиск осуществлялся в направлении модификации способа хранения и введения коровам-донорам одноразовых доз ФСГ в виде раствора. Для этого были проведены опыты с использованием гонадотропинов ФСГ-п и ФСГ-супер, которые хранились при минусовых температурах. В табл. 1 приведены результаты индукции суперовуляции препаратом ФСГ- супер.

Из таблицы видно, что использование для индукции суперовуляции коров дозированных растворов ФСГ, хранившихся на протяжении одного месяца при температуре -196°C , способствовало получению полноценных эмбрионов на уровне 5,15 на донора как в опыте, так и в контроле ($n=13$). При хранении препарата при -196°C до 6 месяцев количество пригодных к пересадке эмбрионов в опытной группе ($n=8$) было на уровне 5,75, а в контроле ($n=8$) – 4,85 эмбриона в среднем на донора.

В производственных условиях ОАО ПЗ “Червоний Велетень” были проведены обработки коров-доноров на суперовуляцию препаратом ФСГ-п, одноразовые дозированные растворы которого хранились при -12°C (табл. 2).

1. Результаты гормональной обработки коров-доноров препаратом ФСГ-супер, который хранился при -196°C

Срок хранения ФСГ	Группы животных	Получено эмбрионов и яйцеклеток			
		Всего, шт(%)	в том числе ($M\pm m$)		
			полноценных шт (%)	дегенерированных, шт (%)	яйцеклеток шт(%)
1 месяц	Опыт ($n=13$)	106 (100)	67 (63,21 $\pm$ 4,68)	27 (25,47 $\pm$ 4,23)	12 (11,32 $\pm$ 3,08)
	На 1 донора	8,15	5,15	2,08	0,92
	Контроль ($n=13$)	112 (100)	67 (59,82 $\pm$ 4,63)	29 (25,89 $\pm$ 4,14)	16 (14,29 $\pm$ 3,31)
	На 1 донора	8,62	5,15	2,23	1,23
6 меся- цев	Опыт ($n=8$)	96 (100)	46 (47,92 $\pm$ 5,1)	39 (40,63 $\pm$ 5,01)	11 (11,46 $\pm$ 3,25)
	На 1 донора	12	5,75	4,88	1,38
	Контроль ($n=8$)	69 (100)	39 (56,52 $\pm$ 5,97)	18 (26,09 $\pm$ 5,29)	12 (17,39 $\pm$ 4,56)
	На 1 донора	8,6	4,88	2,25	1,5

2. Результаты гормональной обработки коров-доноров препаратом ФСГ- п, который хранился при -12°C

Группы животных	Уровень реакции суперовуляции, ж. т.	Получено эмбрионов и яйцеклеток						
		всего	В том числе					
			полноценных	%	дегенерированных	%	яйцеклеток	%
Опыт $n=3$	28	20,0	14,0	70,0 $\pm$ 10,25	5,0	25,0 $\pm$ 9,68	1,0	5,0
	На 1 донора 9,33	6,67	4,67		1,67		0,33	
Конт- роль $n=4$	43	24,0	16,0	66,67 $\pm$ 9,62	8,0	33,33 $\pm$ 9,62	0	0
	На 1 донора 10,75	6,0	4,0		2,0		0	

По результатам опытов после хранения ФСГ в морозильной камере при минус 12 °С получили положительный суперовуляционный ответ и полноценные эмбрионы. Уровень суперовуляции в опыте и контроле, в пересчете на одного донора, составил 9,3 и 10,8 желтых тел, соответственно. Количество пригодных к пересадке эмбрионов было 4,6 в опыте и 4,0 - в контроле.

Следующий эксперимент был проведен в ГПЗ “Тростянец”. В опыте использовали замороженный при –12 °С ФСГ-супер в одноразовых шприцах. В контроле дозированный ФСГ-супер хранили в холодильнике при 2-4 °С в течении двух суток (табл. 3).

3. Результаты применения сохраненного ФСГ-супер при –12 °С и 2-4 °С

Группы животных	Уровень реакции суперовуляции, желтых тел	Получено эмбрионов и яйцеклеток						
		Всего	в том числе					
			полноценных	%	дегенерированных	%	яйцеклеток	%
Опыт n=6	81	63	36	57,14 ±6,23	27	42,86 ±6,23	-	-
	На 1 донора 13,5	10,5	6,0		4,5	-	-	-
Контроль n=6	60	46	19	41,3 ±7,26	14	30,43 ±6,78	11	23,91
	На 1 донора 10,0	7,7	3,17		2,33	-	1,83	-

Уровень суперовуляции в пересчете на одного донора составил в опыте 13,5, а в контроле 10,0 желтых тел, что на 3,5 желтых тела ниже в сравнении с опытом ($p<0,05$). В то же время общее количество эмбрионов и яйцеклеток в опыте было соответственно 10,5 и 7,7; а полноценных – 6,0 и 3,17, что на 2,8 и 2,83 эмбриона меньше чем в контроле. Полученная разница по приведенным показателям статистически достоверна ($p<0,05$). Это свидетельствует о том, что хранение раствора ФСГ при 2-4 °С на протяжении двух суток снижает биологическую активность препарата на 26 %.

Экспериментальным путем установлено, что во время манипуляций, связанных с расфасовкой препарата ФСГ в виде раствора, как в стеклянные флаконы, так и в полиэтиленовые ампулы, и с последующим отбором в шприц для инъекции после оттаивания наблюдается потеря до 7 % общего объема. То есть из 10 мл раствора, содержащего 50 мг общей дозы ФСГ, потери составляют 0,7 мл (2-3,5 мг сухого вещества). Поэтому использование одноразовых полимерных шприцов в качестве контейнеров для хранения дозированного количества препарата ФСГ и последующей инъекции является более целесообразным.

На основе проведенных исследований было оформлено заявка на изобретение и получен патент [5].

Выводы:

1. Хранение одноразовых дозированных растворов препарата ФСГ как при –196 °С, так и при –12 °С обеспечивает полную сохранность его биологической активности после оттаивания.

2. Расфасовка дозированного раствора ФСГ в одноразовые полимерные шприцы, его замораживание и оттаивание с последующей инъекцией донору

предотвращает потери препарата и упрощает проведение гормональных обработок.

Библиографический список

1. Инструкция по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. - Москва, 1987.- С. 23.
2. Методичні рекомендації для науково-практичних і організаційних питань трансплантації ембріонів сільськогосподарських тварин / О.Д. Бугров, М.Д. Безуглий, Б.П. Коваленко та ін. «Технологія добору корів у «донори» та проведення гормональних обробок». - Харьков, 1998. – 14 с.
3. Методические указания по использованию французской технологии трансплантации эмбрионов. – Москва: Госпром СССР, 1986. – С.13-14.
4. Бугров А.Д., Ваврийчук Т.И., Хмельков В.Н., Карташов Н.И. Глубокое замораживания и длительное хранения фолликулостимулирующего гормона в жидком азоте // Мат. межд. научно-практ. конф., посв. 190-летию со дня рождения проф. Кулешова П.Н.– Х.: ХЗВИ. – 1995. - С.66.
5. Бугров А.Д., Хмельков В.Н., Ваврийчук Т.И. Длительное хранение фолликулостимулирующего гормона в жидком азоте // Нові методи селекції і відтворення високопродуктивних порід і типів тварин: Матер. міжн. науково-виробн. Конф. 29-30 травня 1996 р. / Національне об'єднання по племсправі.- К.,1996.- С.312.
6. Бугров А.Д., Шеремета В.И., Хмельков В.Н. “Способ хранения и введения гонадотропных гормонов животным”: Патент на изобретение UA 72804C2. Бюл. № 4 от 15.04.2005.

СПОСІБ ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ РОЗЧИНІВ ФОЛІКУЛОСТИМУЛЮЮЧОГО ГОРМОНУ

О.Д.Бугров, В.М.Хмельков, Інститут тваринництва УААН
В.І. Шеремета, Національний аграрний університет

У статті викладено результати дослідів зі заморожування та тривалого зберігання розчинів фолікулостимулюючого гормону. Встановлено, що тривале зберігання ФСГ при температурі -12°C і -196°C не знижує його біологічну активність. Запропоновано спосіб фасування, заморожування та застосування разових доз розчину ФСГ в полімерних шприцах, що виключає втрати препарату.

Ключові слова: фолікулостимулюючий гормон, заморожування, донор, суперовуляція, ембріон, збереженість.

LONG-TERM STORAGE METHOD OF FOLLICLE-STIMULATING HORMONE APPLICATION

A.Bugrov, V. Khmelkov, The institute of animal science, UAAS
N. Sheremeta, The national agrarian academy, Kyiv

This article highlights the net research results on freezing & long-term storage of follicle-stimulating hormone solutions. Long-term storage of follicle-stimulating hormone proved not to impair biological characteristic by -12°C & -196°C . Freezing & package technique was elaborated. Single dose injection procedure with follicle-stimulating hormone solution was developed. Hormone is supposed to be kept in the soft plastic syringes. Medicinal preparation losses are excluded by the soft plastic syringe hormone storage.

Key words: follicle-stimulating hormone, freezing, superovulation, embryo, and preservation.