

ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ ЕМБРІОПРОДУКЦІЇ У КОРІВ-ДОНОРІВ

М.К. Дібіров, В.М.Хмельков, Г.С.Тихона

Інститут тваринництва УААН

У статті розглянуто нові підходи при отриманні ембріонів, застосування яких дає змогу підвищити рівень ембріопродукції.

Запропоновано функціональну пробу для визначення придатності корів як донорів ембріонів та схему премедикації, що стимулює фолікулогенез напередодні гормональних обробок.

корови-донори, функціональна проба, премедикація, фолікулогенез, суперовуляція, естральний слиз

За останні 20 років в області трансплантації ембріонів великої рогатої худоби досягнуто значних успіхів. Однак світовий досвід свідчить про те, що існує великий ступінь варіабельності результатів із викликання суперовуляції та виходу повноцінних ембріонів. Використання фолікулостимулюючих препаратів (ФСГ та ГСЖК) дає тільки 80 % позитивних результатів з одержання множинної овуляції [1-5]. Сприяти інтенсивному фолікулогенезу під час індукції суперовуляції можна в період, що передує гормональній обробці корів-донорів, а саме шляхом премедикації організму різноманітними біологічно активними та нейротропними речовинами. Вони відновлюють й посилюють трофічні функції статевої сфери та налагоджують гіпоталамо-гіпофізарний зв'язок [2, 4]. Додавання до схем обробок корів-донорів хоріогонічного гонадотропіну, естрадіолу, прогестерону, гонадотропін-релізінг-гормону, вітаміну А підвищує рівень суперовуляції [3].

За даними літератури та нашими спостереженнями на результат гормональної обробки корів-донорів та приживлюваність ембріонів впливає стан ендометрію, а саме наявність або відсутність процесу запалення [6 - 7]. Крім того, відомо, що протягом статевого циклу властивості цервікального секрету змінюються у результаті морфологічних і функціональних перемін у статевому апараті, що є відображенням нейрогуморальних регуляторних процесів, які протікають в організмі самиці. Цервікальний секрет має визначену консистенцію, клітинний склад, здатність утворювати кристали у залежності від фази статевого циклу [8].

Метою досліджень була розробка та удосконалення методів добору корів-донорів для підвищення ембріопродукції самиць великої рогатої худоби.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили у дослідних господарствах "Гонтарівка" і "Українка Слобідська" ІТ УААН та господарствах Харківської області за наступною схемою.

1. Добір корів-донорів.

Добір корів проводили за клініко-гінекологічними показниками шляхом ректальної пальпації. При цьому визначали стан геніталій корів, а саме: розмір, консистенцію та характер поверхні яєчників, наявність та виразність жовтих тіл, стан матки. У першій серії дослідів було сформовано дві групи корів української червоно-рябої молочної породи у віці 6-8 років, з однаковим рівнем продуктивності та умовами утримання й годівлі. Для синхронізації еструса використовували естрофан, після чого виявляли тварин з ознаками статевої охоти, у яких відбирали проби тічкового слизу для постановки функціональної проби,

що включає в себе визначення прихованого ендометриту за методикою Г.М.Калиновського [9] з урахуванням його цитологічного складу.

Для цього у пробірку відміряли 4 мл 0,5 %- ного розчину оцтовокислого свинцю і по краплях додавали 20 %- ний їдкий натр до появи білого осаду (гідрату окису свинцю). Подальше додавання розчину лугу призводило до зникнення білого осаду. Потім у пробірку вносили 1,5-2 мл тічкового слизу й розміщували над полум'ям спиртівки. Потемніння одержаної суміші при нагріванні вказувало на наявність сірковмісних амінокислот (позитивна реакція), що характерно при субклінічному ендометриті. Прозорість суміші без забарвлення вказує на відсутність запального процесу (негативна реакція). У наших дослідах для додавання тих чи інших розчинів використовували одноразові шприці відповідного об'єму. Як джерело тепла застосовували спиртівку або сухе пальне.

Наступним етапом функціональної проби було визначення цитологічного складу естрального слизу з урахуванням феномену кристалоутворення, який визначали у корів протягом 5 статевих циклів. Для цього на чисте знежирене предметне скло наносили краплю цервікального слизу і краєм шліфованого предметного скла робили два тонких мазки. Після їх висихання при кімнатній температурі (18-20 °C) проводили фарбування одного з них за Романовським або метиленовим синім, а потім обидва мазки розглядали під мікроскопом при збільшенні у 100 разів. Наявність гнійних тілець свідчило про запальний процес.

Після штучного осіменіння дослідних тварин тримали на контролі, а через 2,5-3 місяці їх перевірили на тільність, наявність якої вказувала на ефективність застосування функціональної проби.

У другій серії дослідів корів-донорів на 10-12-у добу статевого циклу обробляли на суперовуляцію ФСГ за відомою 4-денною схемою, у дозі 50 мг. Після виявлення еструсу проводили відбір проб тічкового слизу для постановки функціональної проби та штучне осіменіння донорів ректо-цервікальним способом. На 7-8-у добу вилучали ембріони від тварин обох груп. За якістю ембріонів визначали ефективність застосування функціональної проби.

2. Премедикація гормонального оброблення корів-донорів за допомогою гормональних, нейротропних і вітамінних препаратів для підвищення суперовуляційної відповіді та виходу повноцінних ембріонів.

На першому етапі проведено модельні дослідження з оптимізації схем премедикації на коровах із частковим порушенням функції яєчників.

Коровам дослідної групи на 10-у добу циклу вводили внутрішньом'язово 10-15 мг ФСГ, через 48 годин - 500 мкг естрофану, одноразово або з повтором на 11-у добу. Після визначення 0-го дня циклу застосовували тетравіт та прозерин із карбохоліном у відомих терапевтичних дозах. Коровам контрольної групи препаратів не вводили. Ефективність попереднього уведення ФСГ та інших біологічно активних речовин оцінювали за різницею клініко-гінекологічного стану тварин обох груп. Для цього порівнювали розміри та консистенцію яєчників після використання біологічно активних речовин; реєстрували наявність статевої охоти та її виявлення за феноменами; спостерігали за станом матки та характеристикою слизової оболонки переддвір'я піхви. Перед штучним осіменінням коровам ін'єктували сурфагон (25 мг). На 75-90 добу після осіменіння здійснювали ректальну пальпацію геніталій корів для виявлення тільності, визначали рівень заплідненості по двох групах.

Подальші дослідження проводили безпосередньо на коровах-донорах як при фізіологічному, так і дисфункціональному стані яєчників. Була використана наступна схема: парентеральне уведення гонадотропного препарату (ФСГ у дозі

15 мг), жиророзчинних вітамінів (тетравіт - по 10 мл на 2-у і 8-у добу статевого циклу, а з 4-ї доби циклу - підшкірні ін'єкції розчинів 0,5 % прозерину та 0,1 % карбохоліну по 2 мл протягом 4-х діб).

Результати досліджень. Проведено аналіз 176 проб цервікального слизу корів, з яких 42 (23,9 %) проби були негативні, а 134 (76,1 %) – позитивні. За отриманими даними рівень заплідненості після осіменіння по групі корів із негативною і позитивною реакцією становив відповідно 47,6 % та 2,2 % ($p < 0,001$). Три тварини в групі з позитивною реакцією стали тільними, на нашу думку, унаслідок санагенезу (табл. 1).

Із наведених даних видно, що запропонована уніфікована методика дає змогу визначити наявність хронічного запального процесу ендометрію з достатньо високою точністю – у 97,8 % випадків.

Інтенсивність забарвлення дослідних проб після нагрівання до 100 °С була від світло-коричневого до темно-коричневого кольору, проте рівень заплідненості корів не залежав від цього показника.

Придатність корів до використання як донорів ембріонів визначали за результатом постановки уніфікованої функціональної проби також на двох групах тварин: дослідна – з негативною, контрольна – з позитивною реакцією.

Після гормональної обробки реакція суперовуляції становила у дослідній та контрольній групах 9,0 та 7,29 жовтих тіл на 1 донора, всього одержано ембріонів та яйцеклітин відповідно 6,43 та 4,43 (табл. 2).

1. Ефективність застосування функціональної проби

Групи тварин	Кількість проб цервікального слизу		Запліднилось корів	
	шт	%	голів	%
З негативною реакцією	42	23,9	20	47,6 ± 7,71
З позитивною реакцією	134	76,1	3	2,2 ± 1,27

2. Використання функціональної проби на коровах-донорах

Група тварин	Реакція суперовуляції, жовтих тіл	Одержано ембріонів та яйцеклітин, шт		
		Всього	у тому числі	
			повноцінних	дегенерованих та яйцеклітин
З позитивною реакцією	7,29 ± 1,3	4,43 ± 1,67	0,14 ± 0,14	4,29 ± 1,55
З негативною реакцією	9,0 ± 1,46	6,43 ± 1,36	4,0 ± 1,48	2,43 ± 0,92

Найважливішим показником гормональної обробки донорів є вихід повноцінних ембріонів, який при наявності запалення ендометрію становив 0,14 ембріона, а у випадку використання клінічно здорових корів – 4,0 придатних до пересадки ембріона.

Відповідно відрізнялась і кількість дегенерованих зародків та яйцеклітин. Так, частка останніх у першій групі становила 96,84 % від загальної кількості одержаних, а у другій – 37,8 % ($p < 0,05$). Одержані результати дають підставу вважати доцільним проведення аналізу естрального слизу напередодні гормонального оброблення і об'єктивніше визначити придатність тварин до використання як донорів ембріонів. А якщо враховувати вартість гонадотропних препаратів, то можна стверджувати про необхідність застосування цієї методики під час добору корів у кандидати донорів ембріонів.

Результати дослідів із вивчення цитологічного складу цервікального слизу, з урахуванням кристалоутворення, показали, що у геніталіях самиць безупинно відбувається регенерація і десквамація епітеліальних клітин та виділення слизу, але з різною інтенсивністю, в залежності від стадії статевого циклу. Під час тічки і статевої охоти (естрогенний фон) у більшості корів через канал шийки матки виділяється прозорий рідкий слиз, але у деяких із них він не витікає назовні, що утруднює визначення стадії циклу.

Дослідження цитологічного складу цервікального слизу показали, що перед тічкою у пофарбованих мазках стрічається багато лейкоцитів і десквамованих клітин епітелію, частина яких під час тічки втрачають ядра і стають лусочками. Разом із лусочками й епітеліальними клітинами в мазках слизу під час тічки стрічаються клітини крові, як наслідок найвищої напруги слизових оболонок статевих шляхів. Поступово в період урівноваження відбувається згасання всіх процесів, що характеризують статеву охоту, при цьому змінюється і клітинний склад: у мазку відмічається перевага лейкоцитів. У більшості корів у період еструсу у мазках переважно були присутні безбарвні, ороговілі, без'ядерні епітеліальні клітини (лусочки) ~ 80 %, при цьому вони були розташовані не поодинокі, а групами; незначна кількість ядерних епітеліальних клітин ~ 10 % та лейкоцитів ~ 10 %.

Нами відмічено, що протягом статевого циклу у цервікальному слизові корів стрічалися епітеліальні клітини та клітини крові, але постійно змінювалося їх співвідношення. За перевагою одного з видів клітин можна визначити стадію статевого циклу та її феномени: тічку, охоту та овуляцію.

Так, під час тічки більше всього було виявлено без'ядерних епітеліальних клітин (лусочок) разом із лейкоцитами. Лютеальна фаза статевого циклу характеризувалася наявністю великої кількості лейкоцитів. Протягом статевого циклу цитологічний склад слизу у корів не мав чітко вираженої картини клітинного складу у залежності від стадії. Тому для найбільш точного визначення придатності корів до штучного осіменіння та трансплантації ембріонів нами було використано, крім того, і феномен кристалоутворення. Утворення кристалів спостерігали при мікроскопії незабарвлених мазків слизу. При цьому під час тічки по всьому полю видно великі кристали, схожі на листя папороті. У кінці статевої охоти, коли слиз стає густий і мутний, у мазках видно кристали, проте дрібніші за розміром та у меншій кількості, причому за формою вони нагадують гілки дерев.

Зважаючи на вищевикладене, встановлено, що за допомогою феномену кристалізації можна визначити стадію статевого циклу, зокрема, наявність неповної охоти, особливо у випадках, коли її ознаки слабо виражені (рис .1).

За нашими спостереженнями за допомогою кристалізації та клітинного складу цервікального слизу можна визначити порушення в репродуктивних органах корів. Так, при проведенні мікроскопічного аналізу цервікального слизу від групи корів кандидатів у донори ембріонів у трьох випадках у нефарбованих мазках було зареєстровано кристали інших форм, які не схожі на листя папороті або гілки дерев, вони більше нагадували геометричні фігури. У пофарбованих мазках від цих корів було видно тіні епітеліальних клітин або голі ядра (лізована цитоплазма) та різні лейкоцити, у тому числі фагоцити та гнійні тільця. Нами було висунуто припущення про наявність прихованого ендометриту у цих тварин, що підтвердилося тестом за методикою Г.М. Калиновського (1975) визначення даної хвороби [9].



Рис.1. Розташування кристалів цервікального слизу під час тічки

В однієї корови спостерігали виділення дуже рідкого слизу без характерних ознак статевої охоти з повторенням її через 14 днів. Мікроскопія не пофарбованих мазків показала, що кристали були схожі на пір'я птахів. У пофарбованих мазках були поодинокі лусочки та епітеліальні клітини. Ці ознаки характеризують наявність неповноцінного статевого циклу, що було підтверджено ректальною діагностикою (ановуляторний цикл).

Відібрані за клініко-гінекологічними та лабораторними методами досліджень корови підлягали гормональній обробці на суперовуляцію. Але тварин, що за деякими ознаками (дисфункція яєчників) не відповідали існуючим вимогам до відтворення, попередньо обробляли біологічно активними та нейротропними речовинами для стимуляції фолікулогенезу. Одержані результати в дослідних господарствах "Гонтарівка" і "Українка Слобідська" ІТ УААН про те, що застосування за схемою малих доз ФСГ, тетравіту, прозерину з карбохоліном та сурфагону сприяє стимуляції репродуктивної функції корів та підвищує їх заплідненість на 42,7 %.

Заплідненість корів дослідних груп (з використанням схеми) після штучного осіменіння зареєстрована на рівні 72,7 % та 66,7 %, у той час коли тільки 30 % та 8,33 % корів контрольних груп (без використання схеми) стали тільними ($p < 0,001$). Це вказує на ефективність використаних у дослідженнях біологічно активних речовин, насамперед за фактом стимуляції фолікулогенезу і, як наслідок цього, проявом статевої охоти з реєстрацією яскраво виражених усіх її феноменів у дослідних групах. Застосування цієї схеми ефективне при відновленні репродуктивної функції корів (табл. 3).

3. Ефективність застосування схеми стимуляції фолікулогенезу у корів

Групи тварин	Всього корів, голів	Кількість тільних, голів	Заплідненість після осіменіння, %
Д/г "Гонтарівка"			
Дослід	22	16	72,7±9,50
Контроль	20	6	30,0±10,25
Д/г "Українка Слобідська"			
Дослід	18	12	66,7±11,11
Контроль	12	1	8,33±7,98

У подальшому дослідження проводили в умовах молочної ферми філії "Тригорівський" ДП АФ "Шахтар". Про активізацію фолікулогенезу свідчать збільшення розмірів яєчників у корів, що мали напередодні стимуляції ознаки

анафродизії. Прояв статевої охоти у досліді було зареєстровано у 70,4 % корів (n=54) проти 11,1 % у контролі (n=18). Методом ректальної пальпації було визначено рівень заплідненості тварин по групах: у досліді він становив відповідно 53,7 % після осіменіння, у контролі – 5,6 %.

На коровах-донорах дослідження проводили як при фізіологічному, так і дисфункціональному стані репродуктивних органів. Було використано 3 схеми (табл.4).

4. Результати гормональних обробок корів-донорів

n=6

Групи тварин	Реакція суперовуляції, жовтих тіл	Одержано ембріонів та яйцеклітин на донора				
		Всього	у тому числі			
			повноцінних, шт	%	дегенерованих та яйцеклітин, шт	%
Корови з нормальним фізіологічним станом						
Дослід (1 схема)	14,7	14,0	8,3	59,3±13,1	5,7	40,7±13,1
Дослід (2 схема)	10,0	10,3	3,0	29,1±14,2	7,3	70,9±14,2
Контроль	12,6	12,2	7,2	59,0±14,1	5,0	41,0±14,1
Корови з частковою дисфункцією яєчників із попередньою премедикацією						
Дослід (3 схема)	13,33	6,0	5,33	88,83	0,67	11,17±5,4
Контроль	5,75	5,0	2,25	45,00	1,75	55,0±15,1

При використанні 1-ої схеми (парентерально введення жиророзчинних вітамінів: тетравіт - по 10 мл на 2-у і 8-му добу статевого циклу; з 4-ої доби циклу - підшкірно ін'єкції розчинів 0,5 % прозерину та 0,1 % карбохоліну по 2 мл упродовж 4-х діб) реакція суперовуляції була на рівні 14,7 жовтих тіл і отримано 14 ембріонів та яйцеклітин на 1 донора, з яких 8,3 ембріона були повноцінними.

2-а схема - додатковий варіант 1-ї схеми, де на 2-гу та 9-ту добу циклу ін'єктували тканинний препарат у вигляді печінкової суспензії за Філатовим у дозі 20-30 мл. Рівень поліовуляції становив 10 жовтих тіл. Було отримано на 1 донора 10,3 ембріона та яйцеклітини, у тому числі повноцінних - 3,0.

3-я схема - призначена для тварин із дисфункціями репродуктивних органів гіпофізарного походження. Корови - кандидати в донори цієї групи попередньо підлягали обробці гонадотропним препаратом ФСГ, у дозі 15 мг, а після прояву ознак статевої охоти їм ін'єктували препарати згідно з 1-ою схемою, якою рівень суперовуляції становив 13,3 жовтих тіл на 1 донора. Отримано 6,0 ембріонів та яйцеклітин, з яких повноцінними були 5,3 ембріона.

У контролі-1 було отримано на 1 донора 12,2 ембріонів та яйцеклітин, у тому числі 7,2 повноцінних. Реакція суперовуляції відповідала рівню 12,6 жовтих тіл. У другій контрольній групі було відмічено найнижчий рівень суперовуляційної відповіді - 3,6 жовтих тіл і повну відсутність повноцінних ембріонів

Висновки:

1. Добір корів, придатних до штучного осіменіння та трансплантації ембріонів, необхідно проводити з урахуванням клініко-гінекологічного статусу тварин та результатів функціональної проби.

2. Доцільне попереднє введення фолікулостимулюючого гормону, у дозі 15 мг, як засобу премедикації гормональних обробок корів-донорів, що мають деякі функціональні порушення в яєчниках.

Бібліографічний список

1. Бугров А.Д. Трансплантация эмбрионов – метод размножения высокоценных животных // НТБ НИИЖ Л и П УССР. – Х., 1989. – №52.- С. 27-29.
2. Прокофьев М.И. Регуляция размножения сельскохозяйственных животных. – Ленинград: Наука, 1983. – 262 с.
3. Эрнст Л.К., Сергеев Н.И. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных - Москва: Агропромиздат, 1989. – 302 с.
4. Гордон А. Контроль воспроизводства сельскохозяйственных животных. - Москва: Агропромиздат, 1988. - С. 87-88, 101.
5. Мадисон В.В., Мадисон В.Л. Трансплантация эмбрионов в практике разведения молочного скота. - Москва: Агропромиздат, 1988. - С. 62-63.
6. Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных. Шипилов В.С., Зверева Г.В., Родин И.И., Никитин В.Я. - Москва: Агропромиздат, 1988. – С. 23.
7. Хомин С.П., Завирюха В.И., Шаловило С.Г. Влияние среды полости матки на результативность трансплантации эмбрионов.//Тезисы докладов республиканской научной конференции "Состояние и перспективы развития биотехнологии в животноводстве". – Х., 1988. – С. 107-108.
8. Панков Б.Г., Жаров А.В. Цитологическая диагностика состояния половых органов коров/ Доклады РАСХН. – Москва, 2003. - №3. – С. 43-47.
9. Косенко М.В. Диспансеризация в системе бесплодия и контроля воспроизводительной функции крупного рогатого скота. – К.: Урожай, 1989.- С. 248.

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ЭМБРИОПРОДУКЦИИ У КОРОВ-ДОНОРОВ

М.К.Дибиров, В.Н.Хмельков, Г.С.Тихона, Институт животноводства УААН

В статье рассмотрены новые подходы к получению эмбрионов, применение которых дает возможность повысить уровень эмбриопродукции.

Предложена функциональная проба для определения пригодности коров в качестве доноров эмбрионов и схема премедикации, стимулирующая фолликулогенез накануне гормональных обработок.

THE WAYS OF INCREASE OF EMBRYOPRODUCTION IN THE COW-DONORS

M.K.Dibirov, V.M.Chmelkov, G.S.Tichona, The institute of animal science, UAAS

New approaches to obtaining of embryos, application of which enables to promote the level of embryoproduction, are presented in the article.

It is offered the functional test for usefulness determination of cows as the embryos donors and scheme of premedication, which stimulate the folliculogenesis before the hormonal treatments.