УДК 636.2:612.621:591.147:57.017.642

ДОБІР КОРІВ-ДОНОРІВ ЕМБРІОНІВ ШЛЯХОМ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІЇ ЯЄЧНИКІВ ШКІРНОЮ АЛЕРГІЧНОЮ РЕАКЦІЄЮ

М. М. Шаран

Інститут біології тварин УААН

Наведено дані про результати вивчення алергічної реакції на введення статевих гормонів коровам. Встановлено залежність шкірної реакції з гормональним профілем крові, функціональним станом статевих органів, кількісними і якісними показниками ембріопродуктивності у корів-донорів. Показано, що внутрішньошкірне введення стероїдних гормонів може бути важливим додатковим діагностичним тестом для виявлення патології яєчників у корів з метою раціоналізації відбору потенційних донорів ембріонів.

Ключові слова: ШКІРНА РЕАКЦІЯ, СТЕРОЇДНІ ГОРМОНИ, КОРОВИ-ДОНОРИ, ЕМБРІОПРОДУКТИВНІСТЬ, СТАТЕВІ ОРГАНИ

Однією з основних проблем впровадження трансплантації ембріонів у практику виробництва є варіабельність реакції яєчників корів-донорів на суперовуляторну обробку. Аналіз численних даних показує, що тільки 30 % корів регулярно дають добру реакцію, а біля 30 % корів взагалі не відповідають множинною овуляцією на гормональні обробки [1]. Причини такої варіабельності в індексі суперовуляції навіть при одній і тій же дозі гонадотропіну поки що не з'ясовані.

Різні дослідники намагались покращити результати суперовуляції шляхом застосування різних критеріїв відбору корів-донорів. Спроби селекціонувати «добрі» і «погані» корови-донори методом пробних суперовуляцій успіху не мали, так як повторення результатів було вкрай низьким (r=0,3) [2]. У багатьох публікаціях пропонується прогнозувати результати суперовуляції у корів за рівнем естрадіолу і прогестерону в крові [3, 4] і в молоці [5] корів-донорів. Одна група дослідників [4, 6, 7] пропонує прогнозувати результати суперовуляції за рівнем вищезгаданих гормонів після гонадотропної обробки. Хоч кореляція між ембріопродукцією і рівнем гормонів у деяких дослідженнях дуже висока, однак практичне використання цих даних незначне, оскільки прогнозування результатів суперовуляції після введення гонадотропінів не призводить до економії фінансових, трудових та інших ресурсів.

Інші автори [8–11] вказують на можливість прогнозування результатів суперовуляції до гонадотропної обробки. Вони рекомендують оцінювати функціональний стан яєчників за динамікою вмісту естрадіолу-17β в периферійній крові на 6–7-й день статевого циклу та відбирати корів-донорів, у яких концентрація естрадіолу-17β в крові на 6-й день статевого циклу становить 2,3 нг/мл і знижується на 7-й день в 1,5–4,5 рази у порівнянні до вихідного рівня 6-го дня. Не дивлячись на високу точність, методика дозволяє прогнозувати результати суперовуляції тільки у визначені дні стадії збудження статевого циклу, що в умовах практики не зовсім зручно.

Необхідно відмітити, що майже всі вищезгадані автори у своїх дослідженнях використовували лабораторні методи визначення концентрації естрадіолу-17β і прогестерону в біологічних рідинах, які вимагають значних витрат часу і досить складні для виконання в умовах виробництва. При використанні цих методів дослідник може одержати інформацію, яка його цікавить, тільки після гонадотропної обробки, що для практики незручно.

У зв'язку з вищевказаним метою наших досліджень було вивчити місцеву реакцію на внутрішньошкірне введення статевих гормонів коровам, дослідити взаємозв'язок шкірної

реакції з гормональним профілем крові, функціональним станом статевих органів, кількісними та якісними показниками ембріопродуктивності у корів-донорів.

Матеріали і методи

Дослідження проведені на коровах української чорно-рябої молочної породи віком 4–7 років, живою масою 450–500 кг.

Метод відбору корів базується на шкірній реакції тварини при введенні препаратів. Він є модифікацією способу визначення функції яєчників жінок шляхом внутрішньошкірного введення гормонів [12]. Коровам внутрішньошкірно у верхній третині шиї після підготовки (вистригання шерсті, дезінфекційної обробки) одноразово, окремо вводили: 1 % розчин прогестерону, 0,1 % олійний розчин естрадіолу-дипропіонату і 0,05 % олійний розчин естрону (фолікуліну) по 0,02 пг/мл.

Через 25 хвилин проводили клінічне обстеження, яке полягало у візуальному і пальпаторному дослідженні місця введення гормонів: відмічали наявність чи відсутність потовщення складки шкіри, набряку, почервоніння. В той же час проводили клініко-гінекологічні дослідження, визначали функціональний стан яєчників з діагностикою жовтого тіла, фолікулів, а також таких найбільш поширених патологій як фолікулярна і лютеїнові кісти, персистентне жовте тіло, гіпофункція яєчників. Паралельно проводили визначення концентрації прогестерону, естрадіолу-17β та естрону в плазмі крові піддослідних корів імунологічних методом [13].

Перед гормональною обробкою коровам з гінекологічною патологією провели лікування згідно загальноприйнятих схем з використанням сучасних досягнень ветеринарної медицини і фармакології. Наступним етапом була гонадотропна обробка досліджуваних корів з метою викликання множинної овуляції, нехірургічне вимивання ембріонів та їх морфологічна оцінка, які виконували за загальноприйнятими методиками [14]. Гормональну обробку проводили за стандартною 4-денною схемою, використовуючи фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) «Фолікотропін» чеського виробництва.

Завершили експеримент співставленням результатів біохімічних, радіоімунологічних, гінекологічних та біотехнологічних досліджень після їх статистичної обробки.

Результати й обговорення

Аналізуючи результати шкірних реакцій на введення окремих гормонів слід відзначити, що при персистентному жовтому тілі позитивну реакцію (виражений набряк, потовщення складки шкіри, гіперемія, свербіння, в окремих випадках поверхневі некрози) спостерігали при введенні прогестерону (80,0 %) при від'ємній реакції на ін'єкції естрадіолу (88,0 %) та фолікуліну (48,0 %) (табл. 1).

Таблиця 1

Функціональний стан яєчників і шкірна реакція у корів

Функціональний стан яєчників	Кількість корів	Шкірна реакція на гормони		
		Прогестерон	Естрадіол	Естрон (фолікулін)
Персистентне жовте тіло	25	+ (20)	– (22)	– (12)
Лютеїнова кіста	15	+ (12)	– (11)	+ (9)
Фолікулярна кіста	30	– (21)	+ (29)	+ (20)
Гіпофункція яєчників	30	– (26)	– (22)	– (21)

Жовте тіло	12	+ (8)	– (7)	– (5)
Фолікул	10	– (6)	+ (6)	+ (5)

Примітка. + — позитивна реакція; – негативна реакція.

Наявність такої гінекологічної патології як лютеїнові кіста супроводжувалась позитивною реакцією на введення прогестерону (80,0 %) і фолікуліну (60,0 %) і відсутності реакції на естрадіол (73,3 %). При фолікулярних кістах відмічали позитивні шкірні реакції на ін'єкції естрогенів (естрадіол (96,7 %) і фолікулін (66,7 %), в той час як вираженої чутливості шкіри на прогестерон не встановлено (86,7 %).

При жовтому тілі у більшості випадків спостерігали позитивну реакцію на прогестерон (66,7 %) і негативну на естрадіол (58,3 %) і фолікулін (41,7 %). Однак, залежність шкірної реакції від функціонального стану виражена слабше, ніж при персистентному жовтому тілі і не є закономірною. Аналогічну картину спостерігали при наявності фолікула в яєчнику — у цьому випадку спостерігали позитивну реакцію шкіри на естрадіол (60,0 %) і естрон (50,0 %), від'ємну на прогестерон (60,0 %).

Найменш інтенсивну шкірну реакцію спостерігали при гіпофункції яєчників. У цьому випадку реакції на введення прогестерону, естрадіолу і фолікуліну були від'ємними.

Результати внутрішньошкірних проб значною мірою підтверджуються дослідженням концентрації стероїдних гормонів у крові піддослідних корів (табл. 2). Так, при персистентному жовтому тілі спостерігається високий рівень прогестерону (7,6±1,2 нг/мл) на фоні низького рівня естрогенів (естрадіол — 2,3±0,5 нг/мл, естрон — 0,7±0,08 нг/мл). Лютеїнові кісти супроводжуються аналогічними співвідношеннями досліджуваних гормонів, однак концентрація прогестерону вища на 60,5 %, естрадіолу — на 47,8 % та естрону — в 2 рази.

Таблиця 2

Вміст статевих гормонів у крові корів

Функціональний стан яєчників	Досліджувані гормони в крові		
	Прогестерон	Естрадіол	Естрон
Персистентне жовте тіло	7,6±1,2	2,3±0,5	0,7±0,03
Лютеїнові кіста	12,2±5,5	3,4±1,5	1,5±0,5
Фолікулярна кіста	1,5±0,5	26,3±4,0	5,6±0,5
Гіпофункція яєчників	1,2±0,05	2,2±0,05	0,4±0,01
Жовте тіло	2,6±0,14	0,9±0,12	0,5±0,08
Фолікул	1,2±0,22	8,6±0,95	3,2±0,26

Зовсім протилежну картину спостерігали при фолікулярних кістах. Тут концентрація прогестерону становила 1,5±0,5 нг/мл, що у 5–8 разів менше у порівнянні з кістами лютеїнового походження. В той же час концентрація естрадіолу була найвищою (26,3±4,0 нг/мл), що у 7,7–11,4 рази вище, ніж при персистентних жовтих тілах і лютеїнових кістах. Рівень естрону також був вищий відповідно у 3,7–8 рази. Найнижчі концентрації стероїдних гормонів виявлені при гіпофункції яєчників, що підтвердилося і відсутністю алергічних реакцій на введення цих гормонів.

Слід відзначити, що при інтенсивнішій шкірній реакції співвідношення між естрогенами і прогестероном більш виражене.

Таким чином, порушення продукції статевих гормонів і підвищена чутливість до них відіграють важливу роль в патогенезі функціональних порушень яєчників. В той же час внутрішньошкірне введення стероїдних гормонів може бути важливим додатковим діагностичним тестом для виявлення патологій яєчників у корів, з метою раціоналізації відбору потенційних донорів ембріонів.

Аналізуючи результати гормональної стимуляції множинної овуляції, кількісні і якісні показники ембріопродуктивності, слід відзначити, що найкращі результати одержали у корів з жовтим тілом яєчника. Це підтверджує думку ряду вчених про необхідність використання корів з жовтим тілом як донорів ембріонів [15–17]. У цій групі корів одержано 5,55±0,72 морфологічно якісних ембріони на донора, що становить 83,3 % від загальної кількості вимитих (табл.3).

Приблизно такі ж результати отримали у корів з наявним фолікулом у яєчнику. У цій групі тварин рівень множинної овуляції був найвищий — 9,28±1,05 жовтих тіл, кількість якісних ембріонів — 75 % або 5,14±0,65 на донора.

Таблиця 3

Ембріопродуктивність корів-донорів з різним функціональним станом яєчників

Показники	Функціональний стан яєчників					
	персис-тентне жовте тіло	лютеїнова кіста	фоліку-лярна кіста	гіпо-функція	жовте тіло	фолікул
Кількість корів, n	18	11	20	22	12	10
Прореагувало су-перовуляцією, n–%	9–50,0	6–54,5	11–55,0	13–59,1	9–75,0	7–70,0
Рівень поліовуляції, M±m	7,44±0,86	7,33±0,92	6,82±0,75	8,15±0,9	9,11±1,02	9,28±1,05
Одержано ембріонів, всього	38	30	47	79	60	48
З них: морфологічно якісних, n–%	29–76,3	17–56,7	38–80,9	53–67,1	50–83,3	36–75,0
дегенерованих, n–%	6–15,8	8–26,7	4–8,5	19–24,1	8–13,3	9–18,7
яйцеклітин, n–%	3–7,9	5–16,6	5–10,6	7–8,8	2–3,3	3–6,3
В т.ч. на донора, всього, M±m	4,22±0,65*	5,00±0,68	4,27±0,55*	5,85±0,66	6,67±0,72	6,85±0,80
морфологічно якісних	3,22±0,39**	2,83±0,32**	3,45±0,37*	4,07±0,24*	5,55±0,72	5,14±0,65
дегенерованих	0,67±0,08	1,33±0,12*	0,66±0,08	1,46±0,15*	0,89±0,09	1,28±0,17
яйцеклітин	0,33±0,05	0,83±0,15**	0,83±0,19**	0,54±0,12*	0,22±0,03	0,43±0,09*

Примітка. * — $p<0,05$; ** — $p<0,01$

Оскільки при доборі донорів необхідною умовою є наявність жовтого тіла яєчника, то групу корів з жовтим тілом вважатимемо контрольною. Порівнюючи результати множинної овуляції та ембріопродуктивності корів з різною патологією яєчників до контролю, слід відзначити, що у всіх дослідних групах тварин ці показники значно нижчі. Так, кількість морфологічно якісних ембріонів на донора статистично достовірно нижча при наявності персистентного жовтого тіла, фолікулярної і лютеїнової кіст та гіпофункції ($p<0,05–0,01$). При цьому найнижчі результати одержані у корів з лютеїновою кістою — 2,83±0,32 ембріони. Одночасно, у дослідних групах спостерігається збільшення кількості дегенерованих ембріонів та незапліднених яйцеклітин, що може свідчити про порушення внутрішньояєчникових процесів, пов’язаних з фолікулогенезом та овуляцією.

Висновки

1. Внутрішньошкірне введення стероїдних гормонів (прогестерону, естрадіолу-дипропіонату і фолікуліну) може бути важливим додатковим діагностичним тестом для виявлення патології яєчників у корів з метою підвищення ефективності відбору потенційних донорів ембріонів.

2. Результати внутрішньошкірних проб відповідають окремим патологіям яєчників і корелюють з концентрацією стероїдних гормонів у крові піддослідних корів. При персистентному жовтому тілі спостерігається високий рівень прогестерону (7,6±1,2 нг/мл) на фоні низького рівня естрогенів. Лютеїнові кісти супроводжуються аналогічними співвідношеннями досліджуваних гормонів, однак концентрація прогестерону вища на 60,5 %, естрадіолу — на 47,8 % та естрону — у 2 рази.

3. Використання корів з патологією яєчників як донорів ембріонів з економічної точки зору нерентабельне через низький рівень ембріопродуктивності (у 2 рази менша, ніж у клінічно здорових тварин) та додаткові витрати на лікування гінекологічних захворювань.

M. M. Sharan

SELECTION OF COW-DONORS WITH ALLERGENIC METHODS FOR OVARIAN FUNCTION ASSESSMENT

S u m m a r y

The finings of the study of allergenic reaction on sexual hormones injection in cows have been shown. Revealed the correlation between the skin reaction and hormonal blood plateau, functional state of reproductive organs, quantitative and qualitative indices of embryoproductivity in cow donors. Has been shown, that intracutaneus injection of steroid hormones can be an important diagnostic test for revealing of ovarian pathology in cows in order to optimize the selection of potential embryo-donors.

The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Science of Ukraine

1. *Рябых В. П.* Суперовуляция — фактор, сдерживающий трансплантацию эмбрионов. Теоретические аспекты возможного решения проблемы /О мерах по повышению эффективности и улучшению организации более широкого использования биотехнологии в племенном животноводстве // Тез. док. II Респ. науч.-производ. конф. —Львов, 1988. — С.73–74.

2. *Saumande J., Chupin D., Mariana J. C., Ortavant R., Mauleon P.* Factory affecting variability of ovulation rates after PMSG stimulation — in: Srenan, J. M. /ed/, Control of reproduction in the cow // The Hague, Martinus Niohoff. — 1978. — P. 198–224.

3. *Смыслова Н. И.* Результаты суперовуляции коров-доноров в зависимости от исходного гормонального фона // Трансплантация эмбрионов у крупного рогатого скота. Таллин. — 1986. — С.13–15.

4. *Royagi J., Swazumi J., Wachi H.* Studies on superovulation with PHSG and FSH in cows : Hormone bewels of plasma steroid and resulls of embryo recovery // Japan. J. anim Reprod. — 1987. — V. 33. — № 4. — P. 167–172.

5. *Bislanski A.* Ovarian response and control and progesterone blood levels in superovulated heifers treated eith dexametasoni //Dept. of Herd. Mod. and Theriogen. Western College of Vet. Med.University of Saskethewan-Saskaton. Canada. 1986, P.82

6. *Федосова Н. Х., Бобрик В. М.* Некоторые факторы, влияющие на приживляемость эмбрионов // В сб.: Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота. — Жодино. —1989. — С.61–62.

7. *Mullins S., Mac Donnell H. F., Gordon L.* Effects of superovulation treatments on plasma progesterone, oestradiol and luteinising hormone profifiles and on embryo production in heifers following artificial insemination // II international congress on animal reproduction and artificial insemination. — Dublin. — 1993. — P. 490–561.

8. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. Anim Reprod Sci. 2002 Jan 23;69(1–2):1–8.

9. *Хилькевич С. Н.* Приживляемость эмбрионов при нехирургической персадке // Животноводство. — 1986. — № 10. — С.46–47.

10. *Свитоюс А. Г., Сергеев Н. И.* Результаты гормонального вызывания суперовуляции у коров-доноров фоллитропином // Применение трансплантации эмбрионов в селекции с.-х. животных. — Дубровицы. — 1988 — С.23–26.

11. *Рябых В. П.* Эндокринологические аспекты регулирования процессов фолликулогенеза и суперовуляции у крупного рогатого скота // В сб.: Трансплантация эмбрионов круп. рог.скота. — Жодино. — 1989. — С.82–84.

12. *Говорухина Е. М.* Способ определения функции яичников. — 1980. — АС 724127. — Бюл. № 12.

13. *Резников А. Г.* Методы определения гормонов. — К.: Наук. Думка. — 1980. — 400с.

14. Довідник з репродуктивної біотехнології великої рогатої худоби / Буркат В. П., Влізло В. В., Кравців Р. Й. та ін. — Львів, 2004. — 150с.

15. *Konig S., Bosselmann F., von Borstel U. U., Simianer H*. Genetic analysis of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. //J Dairy Sci. 2007 Aug;90(8):3945–54

16. *Завертяев Б. П.* Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. — Л.:Агропромиздат,1989. — 255 с.

17. *Эрнст Л. К., Сергеев Н. И.* Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных. — М.:Агропромиздат,1989. — 302 с.