

УДК 636.22.28:612.622.089.67

UDC 636.22.28:612.622.089.67

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ЭФФЕКТИВНОСТИ СУПЕРОВУЛЯЦИИ У
ЛАКТИРУЮЩИХ И ВЫБРАКОВАННЫХ
КОРОВ, СОХРАННОСТЬ ТЕЛЯТ-ДВОЕН**

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE
EFFECTIVENESS OF SUPER OVULATION IN
BOTH LACTATING COWS AND REJECTED,
SECURITY OF CALVES-TWINS**

Воробьев Дмитрий Николаевич
соискатель

Vorobyev Dmitri Nickolaevich
competitor

Мамукаев Матвей Николаевич
д.с.-х.н., к.б.н., профессор

Mamukaev Matvey Nickolaevich
Dr.Sci.(Agrc.), professor

Мугниева Лариса Алексеевна
к.с.-х.н., доцент
*Горский государственный аграрный университет,
г. Владикавказ, Россия.*

Mugnieva Larisa Alekseevna
Cand.Agrc.Sci., associate professor
*Gorskiy State Agrarian University, Vladikavkaz,
Russia.*

Приводятся материалы по разработке технологии эмбриотрансплантации и получения одинаковых и двойневых телят, использования для вызывания суперовуляции у доноров фолликулогенеза гормональных препаратов ФСГ-супер и фоллотропина и приживаемости эмбрионов, трансплантированных в контрлатеральный и ипсилатеральный рог матки, а так же показатели роста одинаковых и двойневых телят-трансплантантов в онтогенезе

The article deals with the development of embryotransplantation and obtaining single and twin calves use of hormonal preparations FSH-Super and follotropin to provoke donors to super ovulation of folliculogenesis and embryos survival which were transplanted intocontralateral and ipsilateral uterine horn. Parameters of single and twin calves-transplantators' growing in ontogenesis are also considered

Ключевые слова: ТРАНСПЛАНТАЦИЯ,
ЭМБРИОНЫ, ФСГ-СУПЕР, ПОЛОВОЙ ЦИКЛ,
СУПЕРОВУЛЯЦИЯ, ОПЛОДОТВОРЯЕМОСТЬ

Keywords: TRANSPLANTATION, EMBRYOS,
FSH-SUPER, SEXUAL CYCLE,
SUPEROVULATION, INSEMINATION

Введение

Крупный рогатый скот относится к одноплодному виду животных. Многоплодная стельность у коров и телок может быть результатом одновременного созревания и овуляции нескольких овариальных фолликулов (полиовуляция) или одного. Одноплодная зигота на ранних стадиях развития разобщается на две части, которые обособляются и продолжают развиваться самостоятельно в отдельные плоды (полиэмбриония), в итоге которого появляются монозиготные близнецы. Они одного пола, генетически и фенотипически схожи. Рождение близнецов у крупного рогатого скота установлено в 10% случаев однополых двоен. Дизиготные близнецы могут быть как одного, так и разного пола [4, 6, 8].

Несмотря на низкую наследуемость, проводились исследования по выведению линий с 10 и 20% отелов двойнями, используя современные методы биотехники размножения. Многоплодие у крупного рогатого скота – выраженный породный признак, следовательно, то число двойневых отелов в определенной степени можно регулировать выбором породы. В ходе генеалогического анализа, многие исследователи выявили родственные группы коров с многочисленными проявлениями многоплодных отелов. Среди потомства коров с двойневыми отелами число дочерей, отелившихся двойнями, в 1,9-2,5 раза больше, чем в потомстве коров, не имевших двоен [1, 9, 10].

В настоящее время апробированы и предложены различные приемы гормонального вызывания многоплодных стельностей. Первоначально на яичники предлагалось воздействовать в фолликулярную фазу полового цикла.

Для снижения изменчивости интервала между введением гонадотропина и началом охоты вызывание многоплодия проводили в синхронизированный прогестероном или гестагенами половой цикл, а сочетания инъекций прогестерона с последующим введением СЖК вызывало многоплодие у 31% обработанных коров.

Проявление многоплодия у коров подвержено возрастной изменчивости: сравнительно низкая частота у первотелящихся в последующем повышается до 5-6 отелов, а затем сохраняется примерно на одном уровне или снижается [2, 7].

Из средовых факторов, влияющих на проявление у коров предрасположенности к многоплодию, определены только сезон года и условия кормления. Круглогодичное полноценное кормление способствует более полной реализации наследственных задатков многоплодия у коров, что обработка мясных коров ГСЖК (600-750 МЕ) после гестагенной

синхронизации повышала оплодотворяемость на 10%, частоту многоплодия - на 10% и выход телят - на 20%.

Материал и методы исследования

Для получения эмбрионов у коров-доноров методом суперовуляции проведен анализ использования гипофизарных препаратов с различным соотношением ФСГ и ЛГ: фоллитропина и ФСГ-супер. В качестве доноров использовались клинически здоровые лактирующие (не менее 60 дней после отела) и выбракованные коровы в возрасте 5-8 лет, живой массой 550-650 кг, с удоем по наивысшей стандартной лактации 7-9,5 тыс. кг молока, жирностью более 3,8%. Гормональные обработки доноров (табл. 1).

Таблица 1 – Схема гормональной обработки и подготовки коров-доноров

| День полового цикла | фоллитропин (400 мг) | | ФСГ-супер (1000 ИЕ) | |
|------------------------------------|------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| | 8 ⁰⁰ ч. | 20 ⁰⁰ ч. | 8 ⁰⁰ ч. | 20 ⁰⁰ ч. |
| 0-й | Половая охота у донора | | Половая охота у донора | |
| 10-11-й | 70 мг | 70 мг | 160 ИЕ | 160 ИЕ |
| 11-12-й | 60 мг | 60 мг | 140 ИЕ | 140 ИЕ |
| 12-13-й | 40 мг | 40 мг | 120 ИЕ | 120 ИЕ |
| | эстрофан 500 мкг | эстрофан 250 мкг | эстрофан 500 мкг | эстрофан 250 мкг |
| 13-14-й | 30 мг | 30 мг | 80 ИЕ | 80 ИЕ |
| 14-15-й или 0-й день цикла (охота) | - | Осеменение | - | Осеменение |
| 1-й день цикла | Осеменение | - | Осеменение | - |
| 7-й день цикла | Извлечение эмбрионов | | | |

Для извлечения эмбрионов из рогов матки использовали среду Дюльбекко или раствор Хенкса с добавлением фетальной сыворотки (10

мл/л) или бычьего сывороточного альбумина (0,05г/л) и антибиотиков (ампициллин, 100 ИЕ/мл и гентамицин, 12 мкг/мл).

На извлечение эмбрионов из рогов матки донора затрачивали 800-900мл среды. После проведения процедуры извлечения эмбрионов в полость матки коров-доноров вводили смесь антибиотиков (ампициллин, 500 тыс. ЕД + гентамицин, 20 мг) в 30-50 мл среды Дюльбекко или раствора Хенкса, а внутримышечно – 500 мкг простагландина F_{2α}.

Флаконы с промывной жидкостью отстаивали (20-30 минут) и по принципу сифона удаляли верхний слой жидкости, оставляя 70-90 мл с осевшими на дно эмбрионами, разливали в две предварительно расчерченные чашки Петри (Ø 120 мм), затем проводились исследования качества эмбрионов под микроскопом .

В каждой группе изучили эффективность вызывания суперовуляции в зависимости от характеристик коров-доноров – лактирующие (разовые) и выбракованные. У выбракованных коров-доноров (n=17) проведены исследования по изучению результативности вызывания суперовуляции стандартным ФСГ-супер в комплексе с натуральным ЛГ – овогон-тио (ВНИИПиФ, Россия) в соотношении по активности 1000:200 ИЕ.

Результаты исследований

Исследования эффективности суперовуляции у выбракованных и лактирующих коров-доноров показали, что выбракованные коровы в качестве доноров эмбрионов частично снижают показатели метода суперовуляции, и существует зависимость эмбриопродуктивности от применяемого гонадотропного препарата. Выбракованные коровы после обработок фоллитропином и ФСГ-супер реагировали суперовуляцией в 88 и 82% случаев, а лактирующие – 95 и 100%. Реакция суперовуляции в среднем составила 10,7 и 9,3, 11,2 и 13,1 желтых тел соответственно (табл. 2).

Таблица 2 – Эффективность вызывания суперовуляции у выбракованных и лактирующих коров фоллтропином и ФСГ-супер

| Показатели | Выбракованные коровы | | Лактирующие коровы | |
|--------------------------------------------------------|----------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | ФСГ-супер | фоллтропин | ФСГ-супер | фоллтропин |
| Обработано коров, гол. | 29 | 17 | 21 | 20 |
| Реагировало суперовуляцией, гол./ % | 24/82,1 | 15/88,2 | 21/100 | 19/95 |
| Реакция суперовуляции, желтых тел, М±m | 9,3±0,8 | 10,7±1,4 | 13,1±1,1 | 11,2±1,5 |
| неовулировавших фолликулов, М±m | 0,0 | 0,9±0,4 | 0,0 | 1,1±0,3 |
| Вариабельность числа овуляций, % | 40 | 49 | 37 | 57 |
| Положительных по извлечению доноров, гол./ % | 24/100 | 15/100 | 21/100 | 18/94,7 |
| В среднем на донора извлечено всего эмбрионов, М±m | 7,4±0,8 | 8,7±1,4 | 10,3±1,4 | 9,3±1,6 |
| в т. ч. пригодных к использованию, М±m | 4,9±0,6 | 6,4±0,8 | 8,1±1,1 | 6,7±1,3 |
| непригодных к использованию, М±m | 2,5±0,5 | 2,3±0,6 | 2,2±0,6 | 2,6±0,9 |
| из них дегенерированных и отставших в развитии, М±m | 0,9±0,2 | 1,1±0,5 | 1,3±0,4 | 0,8±0,6 |
| неоплодотворенных яйцеклеток, М±m | 1,6±0,4 | 1,2±0,4 | 0,9±0,3 | 1,8±0,5 |
| Оплодотворяемость, % | 78,4 | 86,2 | 91,3 | 80,7 |
| Выход пригодных эмбрионов, % | 66,2 | 73,6 | 78,6 | 72,0 |
| Период от извлечения до проявления половой охоты, дней | – | – | 19,2 | 27,8 |
| Период от извлечения до плодотворного осеменения, дней | – | – | 32,7* | **48,9 |
| Сервис-период, дней | – | – | 138 | 167 |

В группе выбракованных коров по выходу пригодных эмбрионов лучшие результаты отмечены после инъекции фоллтропина –(73,6%) чем при введении ФСГ-супер (66,2%). При обработке фоллтропином, по сравнению с ФСГ-супер, получено на 33% меньше неоплодотворенных яйцеклеток на 33% ввиду более высокого уровня оплодотворяемости (86,2

против 78,4%). В группе лактирующих доноров более высокий выход пригодных эмбрионов, получен после введения ФСГ-супер – 78,6% (8,1 из 10,3), а количество яйцеклеток увеличилось в 2 раза (1,8 против 0,9) на фоне снижения оплодотворяемости (80,7 против 91,3%), наблюдалось разрастание интерстициальной ткани яичников, образование кист и увеличение периода восстановления половой цикличности (на 8,6 дней), сервис-периода на 29 дней (табл.3).

После морфологической оценки эмбриопродукции выбракованных и лактирующих коров-доноров установлено, что независимо от применяемых гонадотропинов признанные пригодными эмбрионы в основном были представлены поздними морулами и ранними бластоцистами. На их долю от общего эмбриосбора в группах приходилось от 60 (фоллтропин) до 92% (ФСГ-супер), что свойственно периоду их извлечения (7-ые сутки после осеменения доноров).

По числу доноров с отсутствием качественных эмбрионов между группами существенных различий не наблюдалось (4,8-8,4%). В целом в группе лактирующих коров 5 и более эмбрионов получено от 55,6-66,6% доноров, а в группе выбракованных – от 45,8-53,3%, что указывает на бóльшую чувствительность к введению гонадотропинов и интенсивность отбора среди лактирующих доноров.

Таблица 3 – Стадии развития и качественная характеристика эмбрионов.

| Показатели | Выбракованные | | Лактирующие | |
|---------------------------------------|---------------|------------|-------------|------------|
| | ФСГ-супер | Фоллтропин | ФСГ-супер | Фоллтропин |
| Стадия развития пригодных эмбрионов | | | | |
| Морула ранняя, n/% | - | 2 / 2,0 | - | 6 / 5,0 |
| Морула поздняя, n/% | 60 / 50,9 | 56 / 55,4 | 92 / 53,8 | 41 / 34,5 |
| Бластоциста ранняя, n/% | 49 / 41,5 | 25 / 24,6 | 37 / 21,6 | 40 / 33,6 |
| Бластоциста поздняя, n/% | 9 / 7,6 | 11 / 11,0 | 42 / 24,6 | 20 / 16,8 |
| Бластоциста экспондированная, n/% | - | 7 / 7,0 | - | 12 / 10,1 |
| Всего | 118 / 100 | 101 / 100 | 171 / 100 | 119 / 100 |
| Качественная характеристика эмбрионов | | | | |
| Отличные, n/% | 70 / 59,3 | 56 / 55,5 | 123 / 71,9 | 66 / 55,5 |
| Хорошие, n/% | 30 / 25,4 | 28 / 27,7 | 41 / 23,9 | 31 / 26,0 |
| Удовлетворительные, n/% | 18 / 15,3 | 17 / 16,8 | 7 / 4,2 | 22 / 18,5 |
| Всего, n/% | 118 / 100 | 101 / 100 | 171 / 100 | 119 / 100 |

У доноров обеих групп наблюдалась высокая вариабельность выхода качественных эмбрионов, которая обусловлена индивидуальными особенностями животных к индуцированию суперовуляции.

Таким образом, существует зависимость эмбриопродуктивности от применяемого гонадотропного препарата: для лактирующих коров-доноров предпочтительнее использовать ФСГ-супер (13,1 желтых тел и 8,1 пригодных эмбрионов на донора), а для выбракованных – фоллтропин (10,7 и 6,4 соответственно). При вызывании суперовуляции фоллтропином наблюдалось разрастание интерстициальной ткани яичников, не редко

образование кист и увеличение периода восстановления половой цикличности (в среднем на 8,6 дней) и сервис-периода (на 29 дней). У лактирующих доноров, использование филлтропина, менее эффективен. Для ФСГ-супер свойственно получение эмбрионов с большей стадийной синхронностью развития, особенно при индивидуальном учете эмбриопродукции доноров, что свидетельствует о синхронности вызванных множественных овуляций.

С точки зрения жизнеспособности будущего потомства, некоторые исследователи сообщают, что телята-двойни, развивавшиеся в одном маточном рогу, могут приводить к осложнениям отелов и высокой смертности близнецов после рождения. В случае развития двух зародышей в одном рогу матки ограничивается использование полости матки и, если плоды благополучно вынашиваются, они обычно имеют более низкую живую массу. Напротив, если зародыши пересаживаются в каждый рог матки, то по мере развития плодов каждому из них достаточно пространства и поступления питательных веществ через плаценту, поскольку в обоих рогах образуется гораздо большее количество плацентомов. Это способствует получению близнецов с относительно большей живой массой, тем не менее, утверждают, что различные способы трансплантации зародышей не препятствуют нормальному протеканию стельности, вынашиванию двоен и не снижают жизнеспособность получаемого приплода [3, 5].

При исследований натальных и постнатальных потерь телят-двоен в зависимости от различных способов индуцирования двойнености у коров-реципиентов установлено, что в случае унилатерального размещения двух плодов в полости матки, 16,7-20% телят рождаются мертвыми ввиду возникающих осложнений во время отела. При билатеральном размещении плодов случаев мертворождения среди близнецов не отмечено (табл. 4).

Таблица 4 – Сохранность телят-двоен в зависимости от способов их получения

| Показатели | Пересадка эмбрионов | | | | |
|---------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| | не осемененным коровам | | | осемененным коровам | |
| | по одному в каждый рог матки | двух в контрлатеральный рог матки | двух в ипсилатеральный рог матки | одного в контрлатеральный рог матки | одного в ипсилатеральный рог матки |
| Размещение плодов в полости матки | Билатеральное | Унилатеральное | | Билатеральное | Унилатеральное |
| Число отелов двойней | 8 | 5 | 7 | 11 | 6 |
| Получено мертворожденных телят-двоен, n / % | - | 2/20,0 | - | - | 2/16,7 |
| Родилось живых телят | 16 | 8 | 14 | 22 | 10 |
| Сохранность (возраст, месяц): 1 гол. /% | 15/93,7 | 7/87,5 | 12/85,7 | 21/95,5 | 8/80,0 |
| 3 гол. /% | 15/93,7 | 6/75,0 | 11/78,6 | 21/95,5 | 7/70,0 |
| 6 гол. /% | 15/93,7 | 6/75,0 | 10/71,4 | 21/95,5 | 6/60,0 |
| 9 гол. % | 15/93,7 | 6/75,0 | 10/71,4 | 21/95,5 | 6/60,0 |
| 12 гол. % | 15/93,7 | 6/75,0 | 10/71,4 | 21/95,5 | 6/60,0 |

На протяжении первого месяца жизни сохранность двоен, развивавшихся в одном маточном рогу, составила 80,0- 87,5%, а развивавшихся билатерально – 95,5-93,7%, то есть уровень падежа был в 2-3 раза ниже. Вероятно, это связано с последствиями трудных отелов или меньшей живой массой при рождении близнецов, развивавшихся внутриутробно в одном рогу матки.

Аналогичная динамика жизнеспособности телят-трансплантантов сохраняется последующие возрастные периоды. В группах телят, размещенных билатерально по одному эмбриону в контрольный рог матки до 12 месячного возраста отхода не наблюдалось и сохранность составила в конце опыта соответственно 93,7% и 95,5%.

В группах телят-трансплантантов, полученных при пересадке эмбрионов унилатерально двух в контрольный и двух в ипсилатеральный рог матки, а также одного в ипсилатеральный рог матки сохранность к 12 месячному возрасту был ниже по сравнению с группой молодняка, полученного при билатеральной пересадке одного эмбриона в контрольный рог матки, в группе телят, полученных при унилатеральной пересадке двух эмбрионов в коллатеральный рог матки, двух в ипсилатеральный рог матки и одного в ипсилатеральный рог матки соответственно на 25,0%; 28,6% и 40,0%.

При использовании метода трансплантации эмбрионов для получения телят-двоен существует возможность не только выбора реципиентов, но и способа пересадки. Для снижения натальной и постнатальной смертности близнецов индуцирование двойневы стельности у реципиентов необходимо проводить способами, обеспечивающими билатеральное размещение эмбрионов.

Таким образом, на протяжении первого месяца жизни сохранность двоен, развивавшихся в одном маточном рогу, составила 80,0-87,5%, а развивавшихся билатерально – 93,7-95,5%, то есть уровень падежа был в 2-4 раза ниже. Для высокой сохранности близнецов после рождения следует делать выбор в пользу способов трансплантации, позволяющих размещать зародыши, а, следовательно, и плоды, в обоих рогах матки реципиентов.

Список использованной литературы:

1. Зоранян В.А. О некоторых биохозяйственных особенностях многоплодия крупного рогатого скота //С.-х. биология. 1983. №5. – С. 93-96.
2. Инструкция по искусственному осеменению коров и телок. Мн. 1999. 54 с.
3. Методические рекомендации по отбору и использованию высокопродуктивных коров - доноров эмбрионов/ В.Л. Мадисон, В.И. Лебедев, А.П. Дронин и др. Дубровицы: ВИЖ, 1993. 27 с.
4. Методические рекомендации по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота /БелНИИЖ; Сост. И.И. Будевич, В.С. Антонюк, Н.Ф. Жук и др. – Мн. 2004. 33 с.
5. Нежданов А.Г., Скрипицын Ю.А., Терновых СВ. Эффективность гормональной индукции полиовуляции у коров// Ветеринария. 2002. №10. С. 35-38.
6. Прокофьев М.И. Регуляция размножения сельскохозяйственных животных. Л.: Наука. 1983. 264 с.
7. Решетникова Н.М. Фолликулогенез крупного рогатого скота при гормональной регуляции и различных формах нарушения воспроизводительной функции// Биология воспроизведения и биотехнологические методы разведения сельскохозяйственных животных/ Научн. труды ВНИИплем - М, 1989.С.73-83.
8. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. - Мн.: Высшая школа, 1967. 328с.
9. Рябых В.П. Основные направления повышения эффективности суперовуляции у коров-доноров//Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных, Всесоюзное совещание, Алма-Ата, 17-20 октября 1989г., тезисы докладов/ Алма-Ата:Наука, 1989. 36. с
- 10.Эрнст Л.К., Сергеев Н.И. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных. М.: Агропромиздат, 1989. 301 с.