

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВІДТВОРЕННЯ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

*Методичні рекомендації до виконання лабораторної роботи з розділу
біотехнології “Складання гормонограм для стимуляції суперовуляції
у корів-донорів”*

Київ 2012

УДК 636.082.4: 591.044

Викладено методики використання гормональних препаратів та складання гормонограм при індукції суперовуляції у корів-донорів та підготовки реципієнтів до пересадження ембріонів.

Розраховані для студентів зооінженерного факультету.

Рекомендовано навчально-методичною радою зооінженерного факультету Національного аграрного університету

Укладачі: В.І.Шеремета, Г.С.Тараненко, В.О.Опанасенко

Рецензенти: професор кафедри технології виробництва молока та яловичини О.Т.Бусенко, доцент кафедри розведення с-г. тварин ім. М.А.Кравченко М.П.Журавель.

Навчальне видання

Біотехнологія відтворення сільськогосподарських тварин

Методичні рекомендації до виконання лабораторної роботи з розділу біотехнології “Складання гормонограм для стимуляції суперовуляції у корів-донорів”

Спеціальність 6.130200- зооінженерія

Укладачі: Шеремета Віктор Іванович, Тараненко Григорій Семенович, Опанасенко Володимир Олександрович

Відповідальний за редагування та випуск доц. В.І.Шеремета

Зав. видавничим центром А.П.Колесніков

Редактор З.І.Маренець

Підписано до друку Формат 60x84 1/16

Ум. друк. арк..1.0.

Обл.-вид.арк..0.9. Тираж 100 пр.

Видавничий центр НАУ.

03041, Київ, вул. Героїв Оборони 15.

Вступ

Сучасна селекційна робота з виведення нових порід великої рогатої худоби та удосконалення існуючих неможлива без використання біотехнологічних методів відтворення, зокрема трансплантації ембріонів, який забезпечує отримання від високопродуктивних корів значної кількості нащадків, у тому числі бугайців для племінної оцінки з метою поліпшення генетичної структури поголів'я, а також прискорення створення племінних репродукторів.

Підґрунтям методу трансплантації є суперовуляція у донорів. **Суперовуляція - чисельна овуляція фолікулів на яєчнику самиць, ріст та дозрівання яких стимульовано екзогенними гонадотропними гормонами**

Ефективність методу трансплантації залежить значною мірою від виходу придатних до пересадження ембріонів після стимуляції суперовуляції у корів-донорів. Одною з причин, що знижує цей процес є велика варіабельність рівня суперовуляції, коли на одну і ту ж дозу гонадотропного гормону донори не реагують поліовуляцією (20-30%) або, навпаки гіперчутливі, що супроводжується утворенням великої кількості неовульованих фолікулів. Відмічене явище варіабельності реакції суперовуляції у корів-донорів до цього часу недостатньо біологічно обґрунтоване.

Другою суттєвою причиною незначного виходу придатних ембріонів є порушення обмінних процесів у організмі донорів, зумовлених негативними змінами в нейроендокринній регуляції статевого циклу і морфофункціональному стані репродуктивних органів, що супроводжується порушеннями у розвитку та зниження життєздатності зародків.

Третя причина, яка суттєво впливає на вихід придатних до пересадження ембріонів це є технологічна дисципліна практичного втілення складеної гормонограми та точного виявлення жовтого тіла на яєчнику самиць при ректальних дослідженнях і статевої охоти у донорів та реципієнтів.

Препарати для стимуляції суперовуляції

Біологічною основою суперовуляції є стимуляція екзогенними та ендогенними гонадотропними гормонами більшої кількості дозрівання фолікулів, що ростуть до графових та їх овуляція. Існує декілька схем індукції суперовуляції. Досить поширені схеми, які поєднують у собі використання гонадотропних гормонів разом з препаратами аналогами простагландіну $F_{2\alpha}$ (ПГ). Серед гонадотропних гормонів розрізняють дві групи: препарати фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), що виділені з гіпофізу свиней, та гонадотропін, отриманий шляхом ліофільного висушування сироватки кобил, відібраної на 90-140 день жеребності .

Препарати групи ФСГ (ФСГ_{-п}, ФСГ_{-с}, фолікотропін, фолітропін, грофолон та інші) вводять внутрішньом'язово на 8-12-й день статевого циклу, впродовж 3-5 днів з 12-годинним інтервалом у загальній дозі 32-50 мг, або одиниць Аморі (1 мг = 1 одиниці Аморі). У цьому разі від початку обробки дозу препарату в кожній ін'єкції поступово зменшують. Наприклад, при 4-денній схемі обробки загальну дозу ФСГ- 50 мг розводять у 14 мл фізіологічного розчину і ділять на окремі дози, які відразу використовують або заморожують. Розморожувати необхідно один раз. Часті заморожування та розморожування призводять до втрати препаратом активності, яку в дозі регулюють об'ємом згідно зі схемою гормональної обробки донора (табл. 1).

1 Схема введення ФСГ коровам-донорам, мл

День статевого циклу	Ранок	Вечір	Всього
10	2,5	2,5	5
11	2,0	2,0	4
12	1,5 + ПГ	1,5	3
13	1,0	1,0	2

Примітка: ПГ- аналог простагландіну $F_{2\alpha}$

Тривале введення дрібними дозами препаратів групи ФСГ пов'язане з тим, що в печінці донорів через 12 годин вони інактивуються, руйнуються і виводяться з організму. Тому, для підтримання в крові певного рівня екзогенного ФСГ треба вводити в організм тварини його строго з інтервалом 12 годин.

Препарати групи ГСЖК (гонадотропін, фолігон, прегмагон та інші) вводять внутрішньом'язово однократно у дозі 2000-5000 І.О. на 10-14-й день статевого циклу. Рівень суперовуляції залежить від дози препарату. Але при високому рівні овуляції поряд із збільшенням виходу яйцеклітин підвищується кількість непридатних ембріонів до пересадження, а придатних майже не зростає. Тому в більшості випадків ГСЖК використовується в дозі 2000-2500 І.О. За рахунок наявності в препаратах групи ГСЖК сіалових кислот ці гонадотропіни не руйнуються в печінці і тривалий час залишаються в крові, що створює несприятливі умови для запліднення яйцеклітин та розвитку ембріонів. Тому, для збільшення виходу придатних ембріонів при стимуляції поліовуляції ГСЖК використовують сироватку з антитілами до СЖК.

Отже, з 8 по 14-й день статевого циклу у корів-донорів за допомогою екзогенних гонадотропних гормонів можна стимулювати фолікулогенез, внаслідок якого фолікули, що ростуть, перетворюються в граафові, та дозрівають яйцеклітини. Для їх овуляції, як відомо, необхідний пік ЛГ, який в цей період статевого циклу неможливий через пригнічення його виділення з гіпофізу під впливом значного рівня в крові концентрації прогестерону. Регресію жовтого тіла, а значить і зниження концентрації в крові прогестерону, викликають препаратами - аналогами гормону простагландину $F_{2\alpha}$ (естрофан, ремофан, еструмат, аніпрост, клатропростін, ензапрост та інші). Їх вводять внутрішньом'язово в дозі 500-750 мг клопростенолу через 48 годин після ін'єкції ГСЖК або на 3-4 день обробки ФСГ однократно в дозі 500 мг або двократно вранці 500 та ввечері 250 мг клопростенолу. Після введення препарату статева охота у донорів настає через 36-72 години.

Осіменяють донорів 2-3 рази ректо-цервікальним способом подвійною дозою сперми (у дозі 15 млн спермійів з прямолінійно-поступальним рухом (ППР)). Сперму вводять у тіло матки. Ф.І. Осташко із співавторами (1990) з метою збільшення кількості запліднених яйцеклітин та поліпшення якості ембріонів, рекомендують починати осіменяти донорів через 48-50 годин після обробки ПГ з інтервалом 22-24 годин і припиняти його за 94-96 годин до вимивання, причому на кожне осіменіння використовувати сперму з кількістю 6-10 млн. активних спермійів із ППР у дозі.

На 7-8-й день після першого осіменіння (нульовий день статевого циклу) проводять вимивання ембріонів хірургічним або нехірургічним способом.

Відлік днів статевого циклу починають із нульового, за який приймається день, коли відбувається овуляція, але оскільки її візуально виявити не можна, то початковим вважають день появи статевої охоти, яку визначають за рефлексом нерухомості.

Підготовка реципієнтів

Отримані ембріони необхідно трансплантувати реципієнтам або заморозити. Ембріони пересаджують відповідно підготовленим реципієнтам. Суть підготовки полягає в тому, що статеві цикли реципієнтів та донорів повинні бути синхронізовані. Це значить, що в календарний день, коли вимиваємо ембріони, реципієнти повинні мати однаковий день статевого циклу з донором, від якого пересаджують зародки, тобто - 7-8-й. Значить, реципієнти в день першого осіменіння донорів повинні також проявляти статеву охоту. Слід пам'ятати, що на одного донора необхідно підготувати 5-7 реципієнтів. Відомо декілька способів підготовки реципієнтів:

Перший спосіб полягає у відборі реципієнтів за спонтанною (природною) статевою охотою. Для цього в день осіменіння донорів проводять виявлення статевої охоти у телиць. У цьому разі бажано проводити ректальні дослідження яєчників на наявність на них фолікулів.

Другий та інші способи ґрунтуються на використанні гормональних препаратів, особливо аналогів простагландину F_{2α}. Науковими дослідженнями встановлено, що аналоги ПГ зумовлюють регресію жовтого тіла при введенні їх самицям на 5,6-15 день статевого циклу (фаза жовтого тіла). Тому, ін'єктування аналогів ПГ телицям, у яких ректально виявили на яєчнику жовте тіло стимулює через 48-72 години прояв статевої охоти у 60-80% тварин. Отже, щоб синхронізувати статеві цикли донора та реципієнта, треба в день введення донорам аналогів ПГ також ін'єктувати їх телицям із жовтими тілами на яєчнику. Але у цьому випадку на одного донора необхідно 15-20 телиць злучного віку.

Третій спосіб дає можливість при меншій кількості телиць збільшити число реципієнтів, у яких синхронізований статевий цикл з донорами. Для цього використовують правило 11-и днів. В Інструкції з використання аналогів ПГ записано, що при стимуляції статевої охоти у самиць, у яких невідомий день статевого циклу і не проводилися ректальні дослідження яєчників гормон вводять двічі. Другу ін'єкцію ін'єктують на 11-й день після першої. При складанні гормонограми другу ін'єкцію ПГ планується проводити одночасно з обробкою донорів, а першу розраховують відлічивши 10 днів назад.

Складання гормонограм

Нині найбільш поширені гормонограми для стимуляції суперовуляції пов'язані з використанням гонадотропних гормонів та простагландинів.

Перед складанням гормонограми слід вивчити, які для цього використовуються препарати та правила їх введення, а також не слід плутати дні статевого циклу самиць із календарними днями, які не збігаються між собою.

Гормонограма –І. Одна з простих схем складання гормонограми ґрунтується на виявленні спонтанної статевої охоти в донора. У нас є ФСГ-п, який ми будемо ін'єктувати 4 дні поспіль. На рис. 1 показано, що у донора з

донору дві ін'єкції ФСГ та одну естрофану (аналог ПГ). При складанні гормонограм приймають, що після введення аналога ПГ статевая охота у тварин проявляється через 48 годин. Значить 21 липня у донора буде статевая охота і треба осіменяти його згідно з вимогами, записаними вище. Крім того, 21 липня також буде нульовим днем статевого циклу, відраховуючи від цього календарного дня 7-8 днів статевого циклу, визначаємо календарний день коли будемо вимивати ембріони, а саме – 28 або 29 липня. У більшості випадків вимивають ембріони на 7-й день статевого циклу. Отримані ембріони пересаджуємо реципієнтам, дні статевих циклів яких синхронізовані з днями донора. Синхронізацію проводимо використовуючи перші два способи, що описані вище. Тобто, за прописом першого, треба 21 липня виявляти у телиць злучного віку статеву охоту, або за другим, 19 липня вводимо аналоги ПГ телицям, у яких ректально виявлені жовті тіла на яєчнику.

Недоліками даної гормонограми є:

1. Необхідність постійного контролю статевої охоти у донорів, що на практиці не завжди можливо;
2. День вимивання може припасти на св'ятковий або вихідний день;
3. У обробку потрапляє в основному один донор і у випадку відсутності суперовуляції буде втрачено безрезультатно один місяць робочого часу.

Гормонограма – II. Для подолання цих недоліків рекомендована гормонограма стимуляції суперовуляції в корів-донорів з використанням двох ін'єкцій аналогів ПГ. Суперовуляцію стимулюємо ФСГ-п, який ін'єкуємо 5 днів поспіль.

Складання даної гормонограми починаємо з планування дня вимивання ембріонів. Найкраще ембріони вимивати посередині тижня (вівторок-четвер), а втім це персональна справа керівника лабораторії трансплантації, яка зумовлена виробничою необхідністю. Наприклад, вибираємо, що будемо вимивати ембріони у вівторок 26 жовтня (рис.2). Це буде 7-й день статевого циклу донора. Знаходимо на який календарний день припадає 0-й день циклу, відраховуючи 7 днів назад, і він припадає на 19 жовтня. Тобто в цей день треба

РПГ-2 (17)*-дні першої та другої ін'єкції реципієнтам ПГ; /26/ - день вимивання та пересадження ембріонів.

Для цієї гормонограми статеві цикли донорів та реципієнтів синхронізуємо за третьою схемою. Це значить, що 17 жовтня телицям будемо вводити другу ін'єкцію аналога ПГ, а термін першої визначаємо використавши правило 11 днів, тобто відрахувавши їх назад від календарного дня другої ін'єкції, що припадає на 7 жовтня.

Практичне втілення даної гормонограми. Наприклад, маємо 20 донорів та 25 телиць злучного віку. Другого жовтня після ректальних досліджень відбираємо 3-5 донорів з жовтими тілами на яєчнику і проводимо першу ін'єкцію естрофана. Усім телицям 7 жовтня вводимо перший раз естрофан і у статеву охоту прийде 15 тварин (60%). Далі 14 жовтня знову проводимо ректальні дослідження оброблених донорів і відбираємо тих, що мають жовті тіла і починаємо вводити їм ФСГ. Телицям та донорам 17 жовтня вводимо другу дозу естрофана, крім того останнім ще ін'єкуємо ФСГ. Через 36- 48 годин після ін'єкції другого естрофана виявляємо статеву охоту у донорів, яких осіменяємо (19-20 жовтня), а у телиць тільки фіксуємо час її прояву, в цілому серед них в охоті буде приблизно 20 (80%) тварин, що цілком достатньо при вимиванні ембріонів у 3-4 донорів. Далі 26 жовтня вимиваємо і пересаджуємо ембріони телицям, яких вибрали у реципієнти.

Гормонограма III. В обробці донорів використовують три ін'єкції аналога ПГ. Третя ін'єкція ПГ буде перед осіменінням донорів. Друга для визначення календарного дня початку обробки донорів ФСГ (див. гормонограму II). День першої обробки донорів аналогом ПГ розраховуємо, використавуючи правило 11 днів, тобто від дня другої ін'єкції відраховуємо назад 10 днів. Перша ін'єкція робиться з метою збільшення числа донорів з жовтими тілами в день, коли треба вводити другу дозу аналогу ПГ. Всі інші роботи в даній гормонограмі аналогічні гормонограмі II.

Недоліком даної гормонограми є те, що у донорів три рази переривається статевий цикл, що може в майбутньому викликати порушення відтворної функції.

У таблиці 3 подано різні схеми гормональної обробки корів-донорів

3. Схеми гормональної обробки для індукції суперовуляції у корів-донорів

День статевого циклу	Назва препарату	Доза
1	2	3
Схема 1		
2	Вітамін А Вітамін Е Калій йодистий	150000 МЕ 100 мг 100-200 мг
10-12	ГСЖК Вітамін А Вітамін Е	2500-3000 И.Е. 75000 МЕ 50 мг
12-14 14-16 21-23	Простагландин Охота і осіменіння Нехірургічне вимивання ембріонів	500-30 мкг-мг
Схема 2		
2	Вітамін А Вітамін Е	150000 МЕ 100 мг
10-12	ГСЖК Вітамін А Вітамін Е	2500-3000 И.Е. 75000 МЕ 50 мг
12-14 14-16 21-23	Простагландин Охота і осіменіння Гонадотропин релізінгормона при другому осіменінні Нехірургічне вимивання ембріонів	500-30 мкг-мг 1-2 мг
Схема 3		
2	Вітамін А Вітамін Е	150000 МЕ 100 мг
10-12	ГСЖК Вітамін А Вітамін Е	2500-3000 И.Е. 75000 МЕ 50 мг
12-14 14-16 21-23	Простагландин Охота і осіменіння антисироватка ГСЖК Нехірургічне вимивання ембріонів	500-30 мкг-мг 2 мл

1	2	3
	Схема 4	
8	ФСГ-п	10мг
9	ФСГ-п	10 мг
10	ФСГ-п	10 мг
11	ФСГ-п	10 мг
12	Простагландин ФСГ-п	500-30 мкг-мг 10 мг
13	Охота і осіменіння	
20	Нехірургічне вимивання ембріонів	
	Схема 5	
8-10	ФСГ-п	12мг
9-11	ФСГ-п	10 мг
10-12	ФСГ-п	6 мг
	Простагландин	500-30 мкг-мг
11-13	ФСГ-п	4 мг
13-14	Охота і осіменіння	
19-21	Нехірургічне вимивання ембріонів	
	Схема 6	
8-10	ФСГ-п	15мг
9-11	ФСГ-п	12 мг
10-12	ФСГ-п	10 мг
	Простагландин	500-30 мкг-мг
11-13	ФСГ-п	5 мг
12-14	Охота і осіменіння	
19-21	Нехірургічне вимивання ембріонів	
	Схема 7	
10	ФСГ-п	12мг
11	ФСГ-п	9 мг
12	ФСГ-п	7 мг
	Простагландин	500-30 мкг-мг
13	ФСГ-п	4 мг
14	Охота і осіменіння	
21	Нехірургічне вимивання ембріонів	
	Схема 8	
10-12	ФСГ-п	14мг
11-13	ФСГ-п	13 мг
12-14	ФСГ-п	12 мг
	Простагландин	500-30 мкг-мг
13-15	ФСГ-п	11 мг
14-16	Охота і осіменіння	
21-22	Нехірургічне вимивання ембріонів	

Правила практичного втілення гормонограм. При практичному втіленні складеної гормонограми треба:

1. Слідкувати за статевою охотою у донорів та реципієнтів після введення ПГ.
2. Перед першим введенням ФСГ або ГСЖК провести ректальні дослідження на предмет виявлення жовтих тіл на яєчниках донорів. Донори у яких не виявлені жовті тіла вибувають з подальшої обробки, бо його відсутність свідчить про ановуляторний цикл, а значить і про неможливість стимуляції поліовуляції (суперовуляції).
3. Перед вимиванням ембріонів проводити ректальні дослідження для виявлення рівня суперовуляції. Кількість жовтих тіл відповідає кількості статевих гамет самиць або ембріонів які повинні бути вимиті з рогів матки.
4. Після введення другої ін'єкції ПГ реципієнтам слідкувати у них за статевою охотою вранці і ввечері впродовж трьох днів, що враховується при пересадженні ембріонів. Бластицисту бажано пересаджувати реципієнтам, які перші прийшли в статеву охоту.
5. Перед пересадженням ембріонів у реципієнтів ректально досліджують наявність на одному з яєчників жовтого тіла. Ембріон пересаджують у той ріг матки, з боку якого знаходиться жовте тіло на яєчнику. Телиці без жовтого тіла на яєчнику вибувають із реципієнтів.

Список літератури

1. Яблонский В.А. Трансплантация эмбрионов у сельскохозяйственных животных.- Кишинев, 1988.- 96 с.
2. Завертяев Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота.- Л.: Агропромиздат, 1989.-255 с.
3. Квасницкий А.В., Мартыненко Н.А., Близнюченко А.Г. Трансплантация эмбрионов и генетическая инженерия в животноводстве.- К.: Урожай,1988.-260
4. Прокофьев М.И. Регуляция размножения сельскохозяйственных животных.- Л.: Наука, 1983.- 263 с.