УДК 636.2:612.64.089.67

**МЕТОД СТИМУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ ЯИЧНИКОВ**

**У КОРОВ-ДОНОРОВ**

**Ю.А. Горбунов, Н.Г. Минина, А.С. Дешко, А.А. Козел**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,

г. Гродно, Республика Беларусь

*(Поступила в редакцию 04.06.2010 г.)*

***Аннотация.*** *Доказаны оптимальные режимы метода акупунктурно-гормональной регуляции полиовуляции на основании достоверного снижения коэффициента рефракции (nД) течковой слизи на 0,0129, увеличения показателя глубины проникновения цервикальной течковой слизи на 25 мм (P<0,001), роста концентрации ФСГ в плазме крови коров-доноров до 14,91 нг/мл (P<0,05). Разработан метод акупунктурно-гормональной индукции полиовуляции фолликулов у коров после нормализации функции яичников, позволяющий увеличить число овуляций в расчете на одного донора на 2,4; снизить количество ановуляторных фолликулов на 0,5, получить дополнительно 1,6 эмбрионов, пригодных для трансплантации, а также 5 телят-трансплантантов на каждые 100 эмбриопересадок.*

***Summary.*** *The optimal modes of acupuncture-hormonal regulation of polyovulation based on the refraction coefficient (nD) of heat mucus reliable decrease by 0,0129, depth of cervical heat mucus penetration increase by 25 mm (P<0,001), cow-donors' blood plasm FSH concentration growth up to 14,91 ng/ml (P<0,05) have been proved. We have worked out the method of acupuncture-hormonal induction of follicle polyovulation among the cows after ovaries function normalization, which leads to the number of per donor ovulations growth by 2.4, to the number of anovulation follicles drop by 0.5, to extra 1.6 embryos suitable for transplantation and extra 5 calves-transplant per 100 embryotransplantation.*

**Введение.** В настоящее время большое распространение получило применение гормональных препаратов для регуляции воспроизводительной функции у коров-доноров эмбрионов. Широко используются гонадотропины, нейротропные препараты, простагландины, прогестагены и др. Однако применяемые медикаментозные методы не всегда эффективны, а в некоторых случаях оказывают побочное действие на организм животных, что приводит к гипертрофии яичников, снижению качества получаемых продуктов питания по причине накопления в организме остатков фармакологических средств. С другой стороны, наиболее эффективные препараты дорогостоящи и экономически невыгодны для хозяйств [4, 10].

В последние годы в медицине для профилактических, диагностических и стимулирующих функцию органов целей широкое применение получили такие методы, как иглоукалывание, ультразвуковое и лазерное воздействие [3]. Однако в животноводстве и, в частности, у коров-доноров физиотерапевтические методы биокоррекции репродуктивной функции посредством акупунктурного воздействия на биологически активные точки организма не отработаны. В этой связи перспективным представляется использование акупунктурного метода воздействия на организм животных аналогично тому, который распространен в практической медицине.

По данным А.В. Зенкина и др. [2], иглоукалывание и лазерное излучение оказывают нормализующее влияние на организм животного, способствуют восстановлению ослабленных функций органов, а также стимулируют регенеративные процессы. Авторы указывают на необходимость изучения вопросов, связанных с применением метода акупунктуры в животноводстве, дающих возможность уменьшить, а в некоторых случаях избежать негативного воздействия гормональных стимулирующих веществ, в основном импортного производства, на организм животных.

Проведение дальнейших научных исследований может быть направлено на изучение физиологических процессов, происходящих в организме генетически высокоценных коров-доноров эмбрионов, с целью более глубокого их понимания. В ряде стран становится актуальной разработка и практическое применение метода биокоррекции их репродуктивной функции [9].

Нерешенность этой проблемы в трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота и обусловила проведение исследований. В связи с этим целью исследований явилось научно обосновать и разработать метод повышения репродуктивной функции коров-доноров путём акупунктурно-гормональной регуляции полиовуляции фолликулов.

**Материал и методика исследований.** Исследования проведены в производственных условиях РУСП «Племзавод «Россь» Волковысского района Гродненской области в 2005-2008 годах. Лабораторные исследования выполняли в научно-исследовательской лаборатории УО «Гродненский государственный аграрный университет» и ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси» (г. Гродно). Объектом исследований служили коровы-доноры черно-пестрой породы в возрасте 1-7 лактации, живой массой 540-700 кг, удоем по наивысшей лактации от 8 до 11 тыс. кг молока, жирностью не менее 3,8%; свежеполученные и замороженно-оттаянные эмбрионы; телята-трансплантанты.

Предмет исследований – изучение степени эффективности воздействия лучом лазера и иглоукалыванием на БАТ организма коров–доноров. Подопытные группы животных формировались с учетом живой массы, физиологического состояния, возраста и породы и находились в одинаковых условиях кормления и содержания в соответствии с технологиями, принятыми в хозяйстве.

Для выполнения поставленных задач было проведено четыре научно-хозяйственных опыта. В первом опыте поиск БАТ (биологически активных точек), отражающих функцию половых органов, проводили ветеринарно-диагностическим прибором (ВДП) согласно наставления по применению [8]. Физико-биологические свойства течковой слизи, взятой у коров перед осеменением в стимулированную и спонтанную охоты, определяли с использованием двух объективных показателей: рефракции (Горбунов Ю.А. и др. [1]), а также по глубине проникновения сперматозоидов в цервикальной течковой слизи (Соколовская И.И., Скопец Б.Г. [6], в нашей модификации).

Во втором опыте осуществляли сравнительный анализ результативности вызывания полиовуляции животных 1 контрольной группы с использованием гонадотропина ФСГ-супер (Россия) в дозе 50 единиц по Арморовскому стандарту, а также дополнительным (животные опытных групп) магнито-инфракрасно-лазерным воздействием на БАТ № 35, 40, 41 и 45 аппаратом “Милта-МВ” (Россия) согласно инструкции по применению и иглоукалыванием на БАТ № 7, отражающих функцию половых органов. Для изучения влияния различных режимов магнито-инфракрасно-лазерного воздействия (ЛВ) и иглоукалывания (ИУ) на 5 БАТ организма животных было сформировано 4 группы коров-доноров по 16 голов в каждой (3 опытных и 1 контрольная). Обработку животных проводили согласно разработанных схем.

В третьем опыте - определяли оптимальную интенсивность дополнительного комплексного магнито-инфракрасно-лазерного воздействия и акупунктурного иглоукалывания на организм доноров в связи со способностью эмбрионов к криоконсервации, концентрацию гормонов ФСГ и прогестерона [5, 7]. Криоконсервацию эмбрионов осуществляли с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации (по И.П. Шейко и др. [8]).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Результаты исследований, направленных на выявление БАТ, связанных с функциональным состоянием половых органов коров, представлены в таблице 1.

Установлено, что по мере приближения предстоящих родов активизация в среднем зарегистрирована в 22-х точках акупунктуры (ТА) на теле животных, что составляет 38 % от числа исследованных. При этом максимальная их трансформация в зону повышенного электрокожного сопротивления, измеренная прибором ВДП, определена размером 49 мм, а минимальная – 24 мм (в среднем 33 мм) в то время как в контрольной (1 группа 60 – дней после отёла) – лишь 9 (Р< 0,01).

Таблица 1 – Количество БАТ, отражающих состояние половых органов при различной степени их функциональной активности

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группы; физиологическое состояние коров | Всего коров | Число ТА | Обнаружено активных точек | Размер БАТ, мм | |
| n / % | колеба-ния | в среднем |
| 1.(к) (60 дн. после отела) | 32 | 57 | 16±1,23 / 28 | 4-16 | 9±0,42 |
| 2.Опытная (20 дней до отела) | 22±1,70 / 38 | 24-49 | 33±1,82\*\* |
| 3.Опытная (в день отела) | 57±3,34\*/100 | 53-196 | 119±17,57\*\*\* |
| 4.Опытная (20 дн. после отела) | 19±1,53 / 33 | 16-53 | 44±2,39\*\* |
| 5.Опытная (перед извлечением эмбрионов) | 54±3,75\* / 95 | 84-122 | 97±4,54\*\*\* |

У животных 3-й опытной группы в день отела наблюдалось наибольшее количество активных точек – 57, размер которых колебался в пределах от 53 до 196 мм (в среднем 119 мм; Р< 0,001), что указывает на значительную физиологическую нагрузку на половые органы самки. В послеродовой период (4 группа) число БАТ у животных снизилось до 19, при установленных колебаниях в размерах от 16 до 53 мм и средней величине – 44 мм (Р< 0,01). Результаты проведённых исследований показали, что различное их количество отражает индивидуальные особенности инволюционного процесса в половых органах самок. Чем быстрее заканчивается их инволюция, тем большее количество точек ТА снижают свою активность.

Комплексное стимулирующее воздействие на организм коров с гипофункцией яичников проводили по схеме: акупунктурное иглоукалывание в БАТ №7 (в течение трёх дней) и последующее инъецирование агофоллина (на 4-й день) в дозе 3 мл. Это способствовало проявлению охоты дополнительно у 21% животных и выразилось в сокращении периода от начала обработки до проявления охоты на 5,2 дня (Р < 0,05).

Разработана схема акупунктурно-гормональной стимуляции полиовуляции фолликулов у коров-доноров после нормализации функции яичников. Результаты исследований показали, что её применение способствовало активизации роста и развития дополнительного количества фолликулов по сравнению с контрольной группой. Это выразилось в увеличении числа овуляций в расчете на 1 положительного донора на 2,4 (9,5 против 7,1; Р<0,05) при одновременном снижении случаев ановуляторного состояния фолликулов на 0,5 (Р < 0,01).

Оптимальный режим данной схемы подтверждён физико-биологическими показателями течковой слизи, взятой перед осеменением доноров, параметры которой составили: nД = 1,3356 (Р< 0,01) и глубина проникновения в неё спермиев – 67,1 мм (Р< 0,001). Таким образом, акупунктурно - гормональное воздействие на организм способствовало лучшему проявлению фолликулогенеза в яичниках коров опытной группы, что выразилось в дополнительном получении на 1 донора 2,1 эмбриона (6,6 против 4,5; P<0,05), в том числе 1,6 (Р<0,05) – пригодных для трансплантации.

Одной из задач исследований было изучение степени влияния различных режимов акупунктурно-гормонального воздействия на организм коров-доноров в связи с выходом полноценных эмбрионов и их приживляемостью у реципиентов, а также показателями крови и течковой слизи (таблица 2).

Таблица 2 – Выход эмбрионов в зависимости от режима акупунктурного воздействия

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группы | Количество положительных по извлечению доноров, гол / % | Получено эмбрионов и яйцеклеток на 1 реагировавшего полиовуляцией донора | | | | | |
| всего, n | из них пригодных для трансплантации, n/% | в т.ч. эмбрионов и яйцеклеток / % | | | |
| всего, n | из них пригодных для трансплантации, n/ % | дегенерированных, n/ % | яйцеклеток, n/ % |
| 1 (к)  n = 16 | 13/81 | 78 | 53/68 | 6,00±  0,39 | 4,08±0,69 / 68 | 0,80±0,57 / 13 | 1,12±0,45/ 19 |
| 2 опытная  n = 16 | 15/94 | 130 | 78/60 | 8,67±  0,31\*\*\* | 5,20±0,72 / 60 | 2,04±0,43 / 24 | 1,43±0,47/ 16 |
| 3 опытная  n = 16 | 13/81 | 121 | 77/64 | 9,31±  0,28\*\*\* | 5,92±0,79\* / 64 | 2,15±0,46 / 23 | 1,24±0,40/ 13 |
| 4 опытная  n = 16 | 15/94 | 113 | 69/61 | 7,53±  0,31\*\* | 4,60±0,68 / 61 | 1,60±0,60 / 21 | 1,33±0,44/ 18 |

Установлено, что в 1 контрольной группе получено 6,00 эмбрионов и яйцеклеток в расчете на одного донора, в то время как во 2, 3 и 4 опытных группах соответственно на 2,67 (P<0,001), 3,31 (P<0,001) и 1,53 (P<0,01) больше. Из них с оценкой «пригодные для трансплантации» составили: в 1 контрольной группе 68%, а во 2, 3 и 4-й опытных группах соответственно 60, 64 и 61%. Число дегенерированных эмбрионов, наоборот, в контрольной группе было меньше, чем во 2 и 3 опытных группах на 14 и 11 п.п., в 4-й больше на 3 п.п.

Результаты изучения показателей рефракции и глубины проникновения спермиев в течковой слизи, взятой у коров-доноров перед осеменением в связи с методом стимуляции полиовуляции, указывают, что во 2 и 3 опытных группах после обработки коров-доноров наблюдались достоверные изменения по показателю коэффициента рефракции (nД) слизи, взятой перед осеменением у коров-доноров.

Снижение nД составило по группам 0,0074 и 0,0098 (1,3466 против 1,3392 и 1,3368) соответственно (P<0,05 и P<0,01). Также установлено, что по показателю глубины продвижения спермиев в течковой слизи высоко достоверные различия установлены лишь в третьей опытной группе, где показатель был выше на 27 мм (68,7 против 42,2 мм; P<0,001). У животных четвертой опытной группы при использовании максимального воздействия на БАТ уровень изменения физико-биологических показателей цервикальной течковой слизи оставался близким к контрольной группе.

Следовательно, из изученных режимов наиболее соответствует готовности организма коров-доноров к зачатию вариант воздействия, характерный для 3 опытной группы, который обеспечивает дополнительный выход 1,84 пригодных для трансплантации эмбриона в расчете на одного донора (P<0,05).

Уровни прогестерона и ФСГ в период акупунктурно-гормональной обработки представлены в таблице 3.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Дни полового цикла | Группы животных | | | |
| 1 – контрольная, n=16 | 2 – опытная,  n=16 | 3 – опытная,  n=16 | 4 – опытная,  n=16 |
| ФСГ, нг/мл | | | | |
| 5-й день | 9,71±0,521 | 9,24±0,639 | 9,86±0,463 | 9,74±0,386 |
| 10-й день | 12,94±0,435 | 13,27±0,598 | 13,82±0,356 | 13,20±0,394 |
| 15-й день | 13,85±0,389 | 14,32±0,460 | 14,91±0,265\* | 14,08±0,434 |
| ПРОГЕСТЕРОН, нг/мл | | | | |
| 5-й день | 2,48±0,189 | 2,44±0,321 | 2,46±0,221 | 2,38±0,294 |
| 10-й день | 4,58±0,232 | 4,64±0,473 | 4,73±0,243 | 4,46±0,295 |
| 15-й день | 0,86±0,174 | 0,90±0,264 | 0,82±0,223 | 0,85±0,140 |

Таблица 3 – Гормональный состав крови коров-доноров

Установлено, что концентрация ФСГ в крови коров-доноров значительно изменяется в зависимости от режимов индукции полиовуляции. Статистически достоверный рост концентрации ФСГ установлен по группам на 15 день полового цикла, т.е. через 10 дней после начала обработки (непосредственно перед осеменением). Максимальное её значение отмечено при использовании режима обработки по 3 опытной группе и составило 14,91нг/мл (P<0,05), а также по второй опытной группе – 14,32 против 13,85 нг/мл в контрольной.

Одновременно проведены исследования по содержанию гормона прогестерона у животных 1 (контрольной), 2, 3 и 4 опытных групп. При этом установлено, что на 5-й день полового цикла, перед курсом гормональной и гормонально-акупунктурной обработки, показатели концентрации гормона имели одинаковый уровень и находились в пределах 2,38-2,48 нг/мл. На 10-й день указанные показатели возросли вдвое во всех группах с последующим снижением концентрации гормона в плазме крови коров-доноров на 15 день полового цикла.

Для установления степени влияния комплексного акупунктурно-гормонального метода индукции полиовуляции на выход эмбрионов сравнивали данные по двум группам животных – 1-й контрольной и 3-й опытной. Коров опытной группы предварительно, перед традиционным применением ФСГ, обрабатывали по оптимальной схеме комплексного акупунктурного воздействия. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Реакция полиовуляции и выход эмбрионов у коров-доноров в связи с комплексной акупунктурно-гормональной обработкой

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Показатели | Ед. изм. | Группы | |
| контрольная, традиционная обработка (ФСГ-супер) | опытная,  акупунктурная обработка + ФСГ-супер |
| Обработано коров | n | 16 | 16 |
| Количество положительных по извлечению доноров | n/% | 13/81 | 13/81 |
| Количество овуляций на донора | n | 8,6±0,81 | 10,1±0,93 |
| Количество ановуляторных фолликулов | n | 0,8±0,014 | 0,2±0,012\*\* |
| Общий выход эмбриопродукции на донора | n | 6,0±0,39 / - 3,3 | 9,3±0,28\*\*\* |
| в т. ч. пригодных к трансплантации | n/% | 4,08±0,51 / 68 | 5,92±0,69 / 64\* |

Установлено, что предварительное акупунктурно-гормональное воздействие на коров перед проведением традиционной гормональной обработки способствовало увеличению числа овуляций в расчёте на донора на 1,5 (10,1 против 8,6). Одновременно выявлено снижение случаев ановуляторного состояния фолликулов на 0,6 (0,2 против 0,8; Р<0,01), возрастание общего выхода эмбриопродукции на 3,3 (9,3 против 6,0; Р<0,001), в том числе пригодных к трансплантации зародышей на 1,84 (P<0,05) у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

При выяснении результативности применения акупунктурно-гормонального и традиционного методов воздействия на организм коров-доноров не установлено достоверных различий по показателю приживляемости свежеполученных эмбрионов у реципиентов (52% в опытной против 47% – в контрольной). Одновременно доказана возможность дополнительного получения 5 телят-трансплантантов на каждые 100 эмбриопересадок.

Для сравнительного изучения способности зародышей (полученных методом акупунктурно-гормональной индукции полиовуляции) к криоконсервации применили прогрессивный способ, предусматривающий использование высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации.

Исследования показали, что после размораживания пригодными для пересадки реципиентам оказалось 79,4% и 76,5% соответственно в контрольной и опытной группах. По результатам ректального обследования, проведённого через 3 месяца после пересадки, стельность установлена соответственно у 48,1 и 46,2% животных. Следовательно, применяя комплексный метод акупунктурно-гормональной обработки коров - доноров можно получать оптимальное количество эмбрионов для криоконсервации при сохранении их высокой оплодотворяющей способности.

**Заключение.** Метод регуляции репродуктивной функции у коров-доноров акупунктурно-гормональным методом способствует снижению себестоимости одного эмбриона на 48,7 тыс. руб., а также получению 5 телят-трансплантантов на каждые 100 эмбриопересадок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Способ определения оптимального времени осеменения крупного рогатого скота: пат. 1146036 СССР / Ю.А. Горбунов, В.С. Антонюк, В.В. Жаркин // Бюллетень “Открытия и изобретения”. – Москва, №11, 1985. – С. 19.
2. Зенкин, А.В. Практика применения безмедикаментозной терапии /А.В.Зенкин, Д.Н. Волойшников // Молочное и мясное скотоводство. – 2001. - №4. – С. 34-36.
3. Иноземцев, В.П. Лазеры – в ветеринарную практику / В.П. Иноземцев, И.И. Балковой // Ветеринария. - 1997. - №4. - С. 3-6.
4. Коронец, И.П. Эффективность гормональных методов повышения многоплодия крупного рогатого скота: автореф. дис. … канд. с.-х. наук: 06.02.01 / И.П. Коронец; БелНИИЖ. - Жодино, 1991. - 24 с.
5. Медведев, Г.Ф. Эндокринный статус коров-доноров эмбрионов в период вызова суперовуляции / Г.Ф. Медведев, Н.И. Гавриченко // Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве и растениеводстве: юбилейная Междунар. науч.-прак. конф. / АГАУ. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2003. - Ч. 3. - С. 237-243.
6. Соколовская, И.И. Зависимость эффективности осеменения коров от физико-биологических свойств цервикальной слизи в период течки / И.И. Соколовская, Б.Г. Скопец // Сельскохозяйственная биология. – 1986. - №12. – С. 17-18.
7. Холод, В.М. Справочник по ветеринарной биохимии / В.М. Холод, Г.Е. Ермолаев. - Москва: Урожай, 1988. - 168 с.
8. Шейко, И.П. Способ глубокого замораживания эмбрионов крупного рогатого скота / И.П. Шейко [и др.] // Патент № 9315 Национальный центр интелектуальной собственности РБ. – Минск, 2007.- С. 48.
9. Шейко И.П., Горбунов Ю.А., Зубова Т.У., Зацпин П.Ф. Метод диагностики патологии органов воспроизведения у коров и свиноматок: утв. научно-техническим советом Минсельхозпрода Респ. Беларусь 10.06.98. – Жодино, 1998. – 6 с.

10. Sagge, K. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and to interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum / K. Sagge [et al.] // Biology of Reproduction. - 1998. – Vol. 59. – P. 777-783.