

УКРАЇНЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН
УКРАЇНЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

На правах рукопису

ПАСИЦЬКИЙ МИКОЛА ДМИТРОВИЧ

УДК 636.2.082.42:577.17

ПІДВИЩЕННЯ ЯКОСТІ ЕМБРІОНІВ ТА ЇХ
ПРИЖИВЛЕНІСТЬ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ
03.00.13 - фізіологія людини і тварин

АВТОРЕЗЮМЕ

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

м. Львів, 1992



00816129 (R)

Робота виконана в лабораторії фізіології розмноження Інституту фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор Шавкун В.Д.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор Розгоні І.І., кандидат ветеринарних наук Довгопол В.С.

Ведуча організація - Інститут розведення і генетики тварин Української академії аграрних наук.

Захист дисертації відбудеться "30" серпня 1992 р. о 10 год. на засіданні спеціалізованої ради Д 020.І4.01 при Інституті фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Адреса Інституту: 290034, м.Львів-34, вул.В.Стуса,38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Автореферат розісланий "29" травня 1992 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради, канд.дат біологічних наук

В.С.Гобак

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН УРСР

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність теми. Значне збільшення виробництва сільськогосподарської продукції, зокрема, продукції тваринництва, неможливе без різкого збільшення продуктивності сільськогосподарських тварин. Це дасть можливість забезпечити зростаючі потреби населення нашої країни в повноцінних і доброякісних продуктах, а промисловість сировиною. Однак, при традиційних методах ведення тваринництва підвищення продуктивності - процес довготривалий. Тут необхідні принципово нові підходи в селекційно-племінній роботі, які б дали можливість забезпечити різке прискорення процесу генетичного адосконалення популяцій тварин. Таке прискорення можна одержати широким впровадженням в практику тваринництва сучасних досягнень генетики, біотехнології, зокрема методу трансплантації ембріонів. Основне призначення методу трансплантації ембріонів - інтенсивне розмноження високоцінного поголів'я по материнській лінії, що дає можливість одержувати багаточисельне потомство, скоротити інтервал між поколіннями, підвищити інтенсивність і якість відбору бугаїв-виробників, які ще в широкому масштабі - через штучне осіменіння - дозволять розповсюдити цінний генетичний матеріал.

Однак, відомі способи викликання суперовуляції у корів-донорів не дають можливості одержати поліовуляцію приблизно у 30% тварин /Madison B.M. /1989/ /. Індукування множиною овуляції не забезпечує достатнього виходу повноцінних ембріонів. Висока варіабельність і непередбаченість реакції яєчників на гонадотропіни, поява від'ємних факторів після дії гормональних препаратів на відтворвальну функцію тварин, робить відомі методи викликання суперовуляції нестабільними/.

В окремих роботах показано, що неповноцінна годівля великої рогатої худоби, особливо дефіцит в раціонах вітамінів та інших біологічно активних речовин, пригнічує гормональну функцію організму, порушує ритмічність статевих циклів і викликає ембріональну смертність /Сергеев М.І. /1987/ /.

У зв'язку з тим зростає актуальність дослідження по розробці методів підвищення кількості повноцінних ембріонів при викликанні поліовуляції та їх приживлення при трансплантації.

Мета і завдання досліджень. Мета досліджень: вдосконалення способів гормонального викликання суперовуляції у корів-донорів; визначення впливу деяких факторів на рівень полтовуляції і якість ембріонів; підвищення приживлення пересаджених ембріонів; порівняння приживлення ембріонів і півембріонів у реципієнтів.

Виходячи з того, були поставлені наступні завдання:

- вдосконалити існуючі методи викликання суперовуляції шляхом застосування найбільш ефективних гормональних препаратів в поєднанні з простагландинами та іншими речовинами;

- вивчити взаємозв'язок окремих факторів / ^в -каротину і загального холестерину / в сироватці крові з рівнем полтовуляції і виходом повноцінних ембріонів;

- вивчити можливість підвищення виходу повноцінних ембріонів і їх приживлення при введенні біологічно активних речовин в статеві шляхи донора і реципієнта;

- порівняти приживлення ембріонів і півембріонів.

Наукова новизна. Вдосконалено існуючі способи гормонального викликання суперовуляції у високопродуктивних корів, розроблено комплекс біологічно активних речовин, які підвищують функцію яєчників і слизової оболонки рогів матки, збільшують вихід якісних ембріонів, при цьому відмічається підвищення їх приживлення при трансплантації.

Практичне значення роботи. Вдосконалені методи викликання суперовуляції у корів-донорів, застосування яких дає можливість одержати більш стабільні результати виходу повноцінних ембріонів.

Запропоновано комплекс біологічно активних речовин, при введенні яких в статеві шляхи підвищується вихід доброякісних ембріонів і їх приживлення при трансплантації.

Апробація одержаних результатів. Основні положення дисертації викладені і одержали схвальну оцінку:

- на щорічних вчених радах Інституту фізіології і біохімії тварин Ужгородської академії аграрних наук;

- на XIII з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. І.П.Павлова /17-21 вересня, м.Харків, 1990 р./;

- на республіканській науковій конференції "Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку" /16-18 жовтня, м.Львів, 1990 р./;

- на семінарах-нарадах республіканської виробничо-наукової асоціації "Біотехнологія", 1990-1992 рр.

Об'єм роботи. Дисертація викладена на 109 сторінках машинописного тексту, включаючи 23 таблиці, 11 рисунків. Список літератури містить 273 джерела, в тому числі 161 іноземних авторів.

2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЕНЬ

Дослідження проводили на коровах чорно-рябої і голштинської порід 4-8 річного віку, живов масов 550-600 кг, з продуктивністю 6000-8000 кг молока за 305 днів лактації і телицях чорно-рябої породи 16-18 місячного віку агроторгового підприємства "Винниківське" Пустомитівського району, колгоспу ім. М. Шашкевича Буського, колгоспів "Комунар", "30-річчя Жовтня" Перемишлянського району Львівської області, дослідному господарстві "Гряда" Республіканського біотехнологічного центру науково-виробничого об'єднання "Еліта" Івано-Франківської області.

При відборі тварин визначали термін прояву охоти протягом двох статевих циклів, враховуючи при цьому період тривалості та інтервал між статевими циклами. Охоту визначали 3-4 рази на добу за чітко вираженим рефлексом нерухоності; під час вигулу в стійловий і літній періоди. При відборі враховували загальний стан здоров'я, годіваність, живу масу. Використовували тільки здорових тварин.

Для синхронізації охоти у корів-донсрів і телиць-реципієнтів застосовували простагландин групи F_2 -альфа /астрофан/ в дозі 500 мкг. При викликанні суперовуляції у піддослідних тварин використовували ФСТ-п /США/ в дозі 42 мкг, фолікотропін /ЧССР/ в дозі 480 МО, фолітропін виробництва Каунаського заводу в дозі 1000 ОД і ГСЖК /сифолцин/ Покровського заводу біопрепаратів в дозі 2500-3000 ІО /таблиця І/.

Для стимуляції функції слизової оболонки рогів матки у реципієнтів використовували комплекс біологічно активних речовин /на голову/: унітіол - 10 мкг, лактин - 100 ОД, естрофан - 250 мкг, димексид /ДМСО/ - до 30% концентрації, який вводили в статеві шляхи під час охоти.

Таблиця I

Схема обробки корів-донорів різними гонадотропінами

День естрального циклу	ГСМ виробництва						ГСМ	
	США /мг/		ЧССР /мг/		Литов./ОД/			/сифолц./
	вранці	ввечері	вранці	ввечері	вранці	ввечері		
ІО	7,5	7,5	80	80	150	150		
ІІ	6	6	80	80	150	150	2500-3000	
І2	5	5	40	40	150	150		
І3	естрофан 500мкг250мкг		естрофан 500мкг 250мкг		естрофан 500мкг250мкг		500мкг250мкг	
І4-0	2,5	2,5	40	40	100			
	Штучне осіменіння корів-донорів							

Коровам дослідної групи для індукції поліовуляції вводили внутрішньом'язево гонадотропіни розведені в 30% розчині димексиду.

Димексид, виробництва Львівського хімфармзаводу, очищений на спеціальних фільтрувальних установках, використовували в якості пенетратора гонадотропінів.

Піддослідних тварин осіменяли ректоцервікальним методом, через 48-50 годин після першого введення естрофану, при цьому застосовували подвійну дозу сперми, яка містила 25-30 млн. активних спермійів на одне осіменіння. Повторне осіменіння проводили через кожні 10-12 годин до закінчення статевої охоти.

Через 7 днів після першого осіменіння проводили вимивання ембріонів нехірургічним методом, їх пошук і морфологічну оцінку.

Перед вимиванням ембріонів ректально досліджували кількість жовтих тіл, неовульованих фолікулів і фолікулярних кіст в яєчниках.

В корів, у яких суперовуляцію індукували з використанням ГСМ, брали кров для визначення в динаміці концентрації прогестерону і естрадіолу, з такими інтервалами: перед введенням ГСМ,

перед введенням естрофану, в перший день штучного осіменіння донорів, на 4-й день після першого осіменіння і в день вимивання ембріонів.

Для вивчення взаємозв'язку між рівнями β -каротину і загального холестерину з результатами суперовуляції у корів, досліджували кров безпосередньо перед гормональною обробкою тварин.

В дослідках по вивченню впливу простагландину P_2 -альфа /естрован/ на процес овуляції і запліднення яйцеклітин, естрофан добавляли до сперми при штучному осіменінні корів-донорів у ранні встановлені нами дози - 0,2 мл.

При вивченні впливу біологічно активних речовин, які вводили в статеві шляхи телицям-реципіентам під час охоти на приживлення ембріонів, нами були проведені біохімічні дослідження сироватки крові підслідних тварин в нульовий день і на 7-й день статевого циклу.

Визначення загального холестерину в сироватці крові проводили за методом І лка, β -каротину - з використанням етилового спирту і петролейного ефіру за методом Іджіна в модифікації А.Петрунькіної. Загальний білок визначали за біуретовою реакцією, глікоген - методом Перлінгера, активність ферментів переамінування /АЛТ, АСТ/ в тканинах і крові - за методом Капетанакі К.Г., розчинні білки - за біуретовою реакцією. За методом Спіртіна А.С. визначали ДНК і РНК, вільні сульфгідрильні групи - за методом Старона Н.Т.

Визначення статевих гормонів у корів-донорів і телиць-реципієнтів проводили радіоімунологічним методом.

В завданні наших досліджень також входило одержання у виробничих умовах пізембріонів і порівняння їх приживлення з цілими ембріонами. Для поділу використовували ембріони відмінної і доброї якості, які досягли стадії розвитку пізньої морули або ранньої бастоцисти. Після морфологічної оцінки ембріони переносили у годинникові шкла в спеціально підготовленими заглибинами. Поділ ембріонів проводили за допомогою мікроманіпулятора ММ-І, на якому фіксували ріжучий інструмент власного виробництва.

Основна частина експериментального матеріалу оброблена біометрично за методикою М.А.Плохінського /1970/.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

3.1. Підвищення ефективності дії гонадотропних препаратів при індукції полівуляції у корів-донорів

3.1.1. Застосування ГСЖК разом з димексидом при викликанні суперовуляції у корів-донорів.

Таблиця 2

Результати реакції яєчників корів-донорів на введення ГСЖК, розведених різними середовищами

Показники	Контроль ГСЖК : Дослід	
	+ Фізірозчин	: ГСЖК+ДМСО
Оброблено корів.....	52.....	58.....
Кількість корів, у яких відмічена суперовуляція /п-%/.....	30-57.6.....	49-42.7.....
Наявність жовтих тіл всього	212	411
в т.ч. на одного донора	7.07±0.30	8.56±0.22
фолікулів всього	112	96
в т.ч. на одного донора	3.73±0.13	2.0±0.17
кістк всього	20	14
в т.ч. на одного донора	0.67±0.12	0.29±0.08

Проведеними дослідями по викликанню суперовуляції у корів-донорів з використанням ГСЖК /сифолжин/, розбавленого в 5 мл 30% розчину димексиду /таблиця 2/, встановлено, що із загального числа гормонально оброблених корів дослідної групи /58 гол./ суперовуляцією прореагувало 48 тварин, в той час, як в контрольній групі прореагувало 30 гол. з числа оброблених тварин /52 гол./, що на 25% менше, порівняно з дослідною групою. Ректальним дослідженням яєчників у корів перед вимиванням ембріонів було виявлено в дослідній групі 411 жовтих тіл, або 8.56±0.22 на одного донора, в контрольній число овуляцій склало 212, або на одного донора 7.07±0.30. Дослідна група тварин /ГСЖК розбавлений в ДМСО/ достовірно /P 0.001/ мала меншу кількість неовульованих фоліку-

лів 2.0 ± 0.17 на одного донора/ порівняно з контрольною. Така ж закономірність спостерігалася і по кількості фолікулярних кіст.

В результаті вимивання ембріонів у піддослідних тварин встановлено /таблиця 3/, що кількість позитивних донорів в групах /корови, у яких вимиті ембріони/ становила: в дослідній групі - 43 голови або 89,6% від числа корів, які реагували суперовуляцією, у контрольній - 19 голів /63,3%, що на 26,3 % менш порівняно з дослідною групою.

Таблиця 3

Результати суперовуляції у корів-донорів і якість ембріонів в залежності від середовища, що застосовується для розведення ліофілізованого препарату

Показники	: Контроль ГСЕК+ Дослід :		P
	фізрозчин	ГСЕК-ДМСО	
Оброблено корів	52	58	
Число овуляцій на донора	7.07 ± 0.30	8.56 ± 0.22	0.001
Позитивних донорів в групі	19	43	
Число ембріонів, одержаних на донора	3.69 ± 0.32	5.21 ± 0.16	0.001
З тому числі: якісних	2.53 ± 0.26	4.14 ± 0.17	0.001
дегенерованих	0.74 ± 0.15	0.47 ± 0.08	0.2
яйцеклітин	0.63 ± 0.16	0.63 ± 0.10	0.5
Розподілення відмінних ембріонів %/	32.1	42.3	

В дослідній групі корів-донорів середнє число вимитих ембріонів на голову складало 5.21 ± 0.16 . В контрольній одержано статистично достовірно /P 0.001/ менше зародків - 3.69 ± 0.32 .

Від однієї тварини дослідної групи одержано статистично достовірно більше /P 0.001/ повноцінних ембріонів / 4.14 ± 0.17 /

порівняно з контрольною, а також вимито на 10.2% більше ембріонів, чим в контрольній.

По кількості дегенерованих ембріонів і яйцеклітин нами не встановлено достовірної різниці між двома групами: донорів.

Для підтвердження вищезазначених результатів нами проведені дослідження по визначенню в динаміці концентрації прогестерону і естрадіолу І7-

Аналіз даних показав, що в крові тварин обох груп рівень прогестерону на 4-7 дні після осіменіння збільшується порівняно з нульовим днем. В дослідній групі корів-донорів він збільшується від 0.34 ± 0.3 мг/мл в день осіменіння до 2.7 ± 0.05 нг/мл на 4-й день після осіменіння, на 7.й день /вимивання ембріонів/ рівень прогестерону становив 2.14 ± 0.79 нг/мл. В той же час в контрольній групі збільшення концентрації прогестерону менш помітне: від 0.38 ± 0.09 нг/мл в день осіменіння корів, до 0.54 ± 0.08 нг/мл на 4-й день і до $0.88 \pm$ нг/мл на 7-й день.

В дослідній групі тварин рівень естрадіолу - І7-^β в день осіменіння був 13.36 ± 2.99 пкг/мл, на 4-й день він знизився до 3.78 ± 1.18 пкг/мл і на 7-й день після осіменіння він становив 3.68 ± 0.98 пкг/мл, в той час як в контрольній групі в день осіменіння він знизився до 4.08 ± 1.62 пкг/мл, а на 7-й день збільшився до 6.25 ± 3.12 пкг/мл, чого не спостерігалось в дослідній групі тварин.

Таким чином, результатами проведених досліджень показано, що введення ГСЖК, розчиненого в ДМСО, при індукції суперовуляції у корів-донорів збільшує кількість овуляцій, зменшує наявність неовульованих фолікулів і фолікулярних кіст, а також збільшує вихід ембріонів, в тому числі якісних, з розрахунку на одного донора.

3.1.2. Застосування ФСТ спільно з димексидом при індукції поліовуляції у корів-донорів.

Проведені дослідження по вивченню впливу різних середовищ, які застосовували для розведення гонадотропнів гіпофізарного походження /ХСТ/, на процес викликання суперовуляції у корів-донорів і вихід якісних ембріонів, показали /таблиця 4/, що при використанні ФСТ-п виробництва США для індукції поліовуляції у корів-донорів було одержано в дослідній групі по 11.43 ± 0.31 ову-

3.2. Взаємозв'язок між вмістом β -каротину та загального холестерину в крові з рівнем суперовуляції і якістю ембріонів у корів-донорів.

Визначення взаємозв'язку окремих біохімічних показників крові з реакцією донора на гормональну обробку, кількістю і якістю вимитих ембріонів, є одним з актуальних проблем методу трансплантації.

Ми визначали вихідні рівні β -каротину і загального холестерину перед суперовуляторною обробкою, співставляючи результати суперовуляції, а також кількість вимитих ембріонів, з вмістом в крові піддослідних корів вищевказаних біохімічних показників.

В результаті досліджень встановлено /таблиця 5/, що при високому рівні β -каротину в крові піддослідних тварин спостерігається більша кількість овуляцій на донора, а також більше вимитих ембріонів, в тому числі якісних. Так, від корів, у яких рівень β -каротину в крові становив до 200 мкг/%, було одержано 3.0 ± 0.49 овуляцій на донора і вимито 0.45 ± 0.26 ембріонів в тому числі по 0.3 ± 0.18 якісних, від корів, рівень β -каротину в крові яких становив від 400 до 600 мкг/%, одержали по 7 ± 0.49 овуляцій на голову, вимито 4.86 ± 0.40 ембріонів, в тому числі придатних до трансплантації 3.71 ± 0.26 . У тварин з рівнем

β -каротину 600 мкг/% і вище одержано відповідно по 8.14 ± 0.40 овуляцій, вимито 6.0 ± 0.22 ембріонів, в тому числі 4.86 ± 0.34 якісних.

Така ж закономірність спостерігається при визначенні загального холестерину в крові корів.

З представлених результатів /таблиця 6/ видно, що від корів з вмістом загального холестерину в крові від 110 до 130 мкг/% було одержано по 3.06 ± 0.62 овуляцій на голову і вимито по 0.72 ± 0.44 ембріона. В групі корів, вміст загального холестерину становив 131-160 мкг/%, встановлено 4.88 ± 0.78 жовтих тіл на донора і вимито по 2.44 ± 0.63 ембріона, з них 1.88 ± 0.48 якісних, що перевищує /Р 0.05/ попередню групу за кількістю овуляцій і загальним числом ембріонів, в тому числі якісних /Р 0.02/.

Таблиця 5

Взаємозв'язок між рівнем β -каротину в крові корів з результатами
поліовуляції і вимиванням ембріонів

Вміст каротину в крові корів /мкг/%	К-сть : тва- рин	К-сть ову- : лій на донора	одержано ембріонів								
			: Р	Всього		в тому числі					
				: Р	: Р	: Р	: Р	: Р	: Р	: Р	
				якісних		дегенера- ваних		яйцеклі- ти			
120-200	20	3.0±0.49	-	0.45±0.26	0.001	0.3±0.16	0.001	0.15±0.11	-	-	-
201-400	13	4.92±0.95	0.05	2.92±0.75	0.001	2.23±0.57	0.001	0.23±0.10	0.5	0.46±0.22	-
401-600	7	7.0±0.499	0.001	4.86±0.40	0.001	3.71±0.36	0.001	0.43±0.20	0.2	0.71±0.18	0.5
601-800	7	8.±4±0.40	0.001	6.0±0.22	0.001	4.85±0.34	0.001	0.57±0.30	0.05	0.57±0.20	0.5

Таблиця 6

Взаємозв'язок між рівнем загального холестерину в крові корів
з результатами полювання і вимивання ембріонів

Вміст холестерину в крові корів /мг/%	:к-сть тварин	:к-сть евуляцій на дою-ра	: одержане ембріонів								
			: всього	: P	: якісних -	: P	: дегенерованих	: P	: яйцеклітин	: P	
IIG-I30	13	3.06±0.62	-	0.72±0.44	-	0.50±0.30	-	0.06±0.06	-	0.17±0.12	-
I3I-I30	16	4.06±0.72	0.05	2.44±0.63	0.02	1.88±0.48	0.02	0.30±0.15	0.05	0.19±0.10	0.02
I3I-I35	13	7.43±0.64	0.001	5.46±0.22	0.001	4.33±0.24	0.001	0.46±0.14	0.01	0.54±0.14	0.05

В групі тварин, де вміст загального холестерину становив 161-195 мг/% одержано статистично достовірно / $P < 0.001$ / більше овуляцій, вимито ембріонів, в тому числі придатних для трансплантації порівняно з іншими групами тварин, де рівень загального холестерину був нижчий.

Одержані результати дають підставу зробити висновок про те, що визначення рівня β -каротину і загального холестерину в крові корів перед гормональною обробкою дає додаткову інформацію про можливість прогнозування результатів суперовуляції і одержання якісних ембріонів.

3.3. Вплив простагландину /естрофан/ на вихід повноцінних ембріонів при цервікальному введенні його із спермою бугаїв.

При вивченні впливу простагландину, що вводився з спермою бугаїв при штучному осіменінні корів-донорів, на рівень поліовуляції і якість ембріонів, суперовуляції у піддослідних тварин індукували гормоном ОСП-п/ОПА/ за схемою в таблиці 1.

Разом із спермою при штучному осіменінні корів-донорів дослідної групи, вводили 0.2 мл естрофану. Доза нами була попередньо встановлена. Контрольну групу тварин осіменяли без додавання в сперму естрофану.

В результаті проведених досліджень встановлено /таблиця 7/, що у корів-донорів контрольної групи кількість овуляцій на донора становила 11.43 ± 0.27 , в дослідній 11.57 ± 0.71 , кількість фолікулів 1.29 ± 0.12 і 1.41 ± 0.29 відповідно, число ембріонів, одержаних на одного донора, як в контрольній / 3.29 ± 0.27 /, так і в дослідній групах / 0.53 ± 0.27 / було майже однаковим. Кількість якісних ембріонів в дослідній групі / 6.23 ± 0.10 / була на 1.23 більше порівняно з контрольною / 5.0 ± 0.26 /. Одержана різниця статистично достовірна / $P < 0.001$ /.

Також статистично достовірно менше / $P < 0.001$ / було одержано яйцеклітин в дослідній порівняно з контрольною групою корів-донорів.

Додавання естрогану в сперму бугаїв при штучному осіменінні корів-донорів, мабуть, не впливає на вихід загальної кількості ембріонів, однак статистично достовірно збільшує вихід ембріонів придатних для трансплантації і зменшує кількість незапліднених яйцеклітин.

Таблиця 7

Рівень полівуляції та якість ембріонів при додаванні до сперми бугаїв прогестерону $2-2$ /естроган/ при осіменінні корів-донорів

Показники	:Контроль	:Дослід	:	P
Кількість корів	14	17		
Наявність овуляції всього	160	195		
в т.ч. на одного донора	$11,43 \pm 0,27$	$11,57 \pm 0,71$		0.5
Фолікулів всього	18	24		
в т.ч. на одного донора	$1,29 \pm 0,12$	$1,41 \pm 0,29$		0.5
Число ембріонів одержаних на донора всього	$8,29 \pm 0,27$	$8,53 \pm 0,27$		0.5
в т.ч. : якісних	$5,0 \pm 0,26$	$6,23 \pm 0,10$		0.001
дегенерованих	$2 \pm 0,26$	$1,71 \pm 0,14$		0.5
яйцеклітин	$1,29 \pm 0,2$	$0,66 \pm 0,17$		0.01

3.4. Вплив біологічно активних речовин, введених в статеві шляхи телиць-реципієнтів, на приживлення ембріонів

Наші дослідження були спрямовані на вивчення можливості підвищення приживлення ембріонів при трансплантації. Враховуючи те, що при підготовці реципієнтів випадає такий дуже надивий біологічний процес, як осіменіння, ми вводили в статеві шляхи телиць-реципієнтів під час статевої охоти біологічно активні речовини. З цієї метою використовували естроган, лактин, унітіал, димексид і вертву сперму.

Ід час статевої охоти у піддослідних телиць проводили біохімічні дослідження крові. Аналіз результатів досліджень показав, що немає помітної різниці між групами тварин по вмісту в сироватці крові вільних сульфгідрильних груп, імунних білків, активності трансаміназ /АЛТ, АСТ/ і загального білку в день статевої охоти.

Відмінності між групами реципієнтів по вище вказаних показниках білка виражені на 7-й день статевого циклу, тобто в день пересадки ембріонів. Так, вміст ЖН-груп в першій дослідній групі /тваринам вводили БАР із спермою/ становив 8.37 ± 0.52 мкг/мл, що на 1.08 мкг/мл більше порівняно з контрольною групою /не вводили досліджуваних препаратів/ і на 0.66 мкг/мл вище ніж в другій дослідній групі телиць /вводили тільки мертву сперму/.

Така закономірність спостерігається і по вмісту імунних білків та загального білку. Статистичне достовірно вищою була активність трансаміназ в першій і другій дослідній групах телиць, порівняно з контрольною.

Дослідження прогестерону в сироватці крові піддослідних тварин показали, що його рівень з першого по сьомий день статевого циклу підвищується майже в 10 разів /таблиця 8/, що ж стосується відмінностей у вмісті прогестерону між групами, то як видно з таблиці, ці відмінності біля помітні на 7-й день статевого циклу. В першій групі телиць рівень прогестерону на 7-й день статевого циклу був статистично вищий, порівняно з контрольною.

Таблиця В

Концентрація прогестерону в сироватці крові телиць-реципієнтів

групи тварин	Рівень прогестерону під час статевої охоти /нг/мл	: P ₁	: Рівень прогестерону на 7 день статевого циклу /нг/мл/	: P ₂
Контрольна група /n-4	0.20±0.02		2.34±0.06	
I дослідна група /n-4/	0.28±0.07	0.5	3.25±0.11	0.01
II дослідна група /n-4	0.23±0.002	0.5	2.59±0.19	0.5

Примітка: в цій таблиці і наступних цього розділу P_1 - ступінь достовірності різниць між контрольною і першою дослідною, P_2 - між контрольною і другою дослідною групою.

Проведеними біохімічними дослідженнями встановлено, що в слизовій оболонці рогів матки тварин дослідних груп рівень майже всіх показників вищий, порівняно з контрольними тваринами. Так, в ендометрії дослідних телиць вміст розчинного білку, ГНК, рівень глікогену, активність АСТ статистично достовірно вищі, ніж у контрольних телиць.

Здержані дані показали, що концентрація ДНК в слизовій оболонці ендометрія першої дослідної групи телиць була вища на 13%, в другій - на 15% порівняно з контрольною.

Гістоморфологічні дослідження слизової рогів матки піддослідних телиць показують, що за кількістю маткових залоз на одиницю площі спостерігається значна різниця між групами тварин /таблиця 9/. Якщо в слизовій оболонці матки контрольної групи телиць кількість маткових залоз на одиницю площі становила 3.2 ± 0.38 , то в першій дослідній групі - 9.28 ± 0.85 / $P_1 0.001$ /, а в другій - 4.47 ± 0.41 / $P_2 0.01$ /

Таблиця 9

Гістоморфологічні дослідження слизової оболонки рогів матки телиць-реципієнтів

Показники	контрольна група /п-4/	*Ідослідна група :п-4	**ІІ дослідна група :п-4/	***ІІІ дослідна група :п-2
Кількість маткових залоз в полі зору /шт/	3.2 ± 0.38	9.28 ± 0.85	4.44 ± 0.41	0.001 0.01
Висота епітелію маткових залоз /ммк/	$2949 \pm 03.27.60$	$3550 \pm 56 \pm 62.08$	3226.05 ± 104.64	0.01 0.001
Висота епітелію слизової оболонки матки /ммк/	3947.99 ± 75.13	5157.66 ± 131.30	3884.36 ± 74.38	0.01 0.01

Аналогічні відмінності між групами тварин відмічаються і при вимірюванні висоти покривного епітелію слизової оболонки матки і епітелію маткових залоз.

Після проведення досліджень по вивченню впливу БАР на слизову оболонку матки телиць, нами був проведений дослід по пересадці свіжоодержаних ембріонів реципієнтами, яким вводили в день охоти разом з мертвою спермою БАР.

В результаті проведеного досліду встановлено /таблиця ІО/, що в дослідній групі прореагувало 17 телиць /наявність жовтих тіл в яєчниках/, що на 4 тварини більше порівняно з контрольною групою. Після пересадки ембріонів, через 3 місяці було проведено ректальне дослідження реципієнтів на тільність. З 16 телиць дослідної групи, яким пересаджено ембріони, тільними стали 10 голів /62,5%, а в контрольній групі з 13 телиць тільними стали 6 голів /46,1/, або на 16,4% менше, порівняно з дослідною групою.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що введення реципієнтам в день прояву охоти мертвої сперми з добавленням до неї біологічно активних речовин, позитивно впливає на функцію органів розмноження. Відмічено збільшення кількості тварин з жовтими тілами в яєчниках і підвищення приживлення трансплантації ембріонів.

Таблиця ІО

Вплив БАР і мертвої сперми, введених в статеві шляхи реципієнтів, на функцію яєчників і приживлення ембріонів

Показники	: контрольна група	дослідна група : /мертва сперма+БАР/
Кількість телиць в групі	20	20
Прореагувало /наявність овуляції п-%/	13-65	17-85
Пересаджено ембріонів	13	16
Тільних реципієнтів	6	10
Процент приживлення	46,1	62,5

3.5. Порівняльна оцінка приживлення ембріонів і півембріонів

Враховуючи актуальність проблеми одержання монозиготних близнят нами був проведений експеримент по розділенню ембріонів та дослідженню їх приживлення у виробничих умовах. Для поділу відібрали відмінної і доброї якості 9 ембріонів, з яких одержали 16 півембріонів /88.8%, 2 одиночних і 7 монозиготних пар /14 половинок/.

В результаті проведеної телиціями-реципієнтами пересадки 16 цілих ембріонів після ректального дослідження було встановлено /таблиця II/ у 7 реципієнтів тільність, що становить 43% від загального числа пересаджених ембріонів.

Таблиця II

Результати приживлення пересаджених реципієнтам ембріонів і півембріонів

Показники	:Півембріони	: Цілі ембріони
Використано ембріонів	9	16
Пересаджено половинок і цілих ембріонів	16	16
Кількість реципієнтів/п-%/	5-31,25	7-43,7
Тільність реципієнтів від кількості цілих ембріонів /п-%/	5-55,5	7-43,75

При пересадці півембріонів виявили тільними 5 реципієнтів, що складає 31,25% від загального числа півембріонів і 55.5% від числа цілих ембріонів, що майже на 12% вище, порівняно з пересадкою нерозділених ембріонів.

В И С Н О В К И

1. Використання 30% розчину диметилсульфоксиду, як розчинника і пенетратора ГСЖК, поліпшує результати поліовуляції, збільшує вихід ембріонів, в тому числі придатних для трансплантації порівняно з ГСЖК, розведеного загальноприйнятим способом.

2. Використання 30% розчину димексиду при розведенні фолікулостимулюючих гормонів незалежно від їх виробництва, не впливає на результати суперовуляції і вихід якісних ембріонів.

3. Оптимальні результати суперовуляції, а також вихід якісних ембріонів, одержані при вмісті в крові корів-донорів 400-600 мкг/% β -каротину. При вмісті β -каротину нижче 200 мкг/% відмічені більш низькі результати поліовуляції і вихід ембріонів, придатних для трансплантації.

4. Задовільні результати поліовуляції одержані при мінімальному вмісті в крові корів-донорів загального холестерину 130 мг/%. Із збільшенням рівня загального холестерину до 160-190 мг/% значно збільшується кількість і підвищується якість ембріонів.

5. Додавання простагладину E_2 -альфа /естрофан/ до сперми при штучному осіменінні корів-донорів збільшує вихід повноцінних ембріонів і зменшує кількість незапліднених яйцеклітин.

6. Введення комплексу біологічно активних речовин /естрофан, лактин, унітіол, димексид/ під час охоти в статеві шляхи телиць-реципієнтів збільшує приживлення трансплантованих ембріонів на 16,4%.

7. Поділ ембріонів у виробничих умовах дозволяє одержати до 89% нормальних півембріонів, що приводить до збільшення тільних реципієнтів від загального числа вимитих ембріонів на 12%.

5. ПРАКТИЧНІ ПРОПОЗИЦІЇ

Для гормональної індукції суперовуляції у корів рекомендується використовувати ГСЖК, розведений в диметилсульфоксиді.

При відборі корів для використання в якості донорів рекомендується визначати в крові рівень β -каротину і загального

холестерину. Відбирати корті належить переважно з рівнем β -каротину в крові вище 400 мкг/% і загального холестерину більше 130 мг/%.

Для збільшення виходу якісних ембріонів і підвищення їх приживлення при трансплантації пропонується реципієнтам вводити в статеві шляхи розроблений комплекс біологічно активних речовин.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Павкун В.Д., Хавінзон А.Г., Скварук О.Г., Лесів М.М., Пасіцький М.Д., Андрушко О.Б., Вплив добавок біологічно активних речовин, введених в роги матки реципієнта, на функціональний стан ендометрію. Збірник матеріалів XII з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. І.П. Павлова, Т-2, м.Харків 17-21 вересня 1990 р. с. 187.

2. Лесів М.М., Пасіцький М.Д., Павкун В.Д., Амстиславський С.Я., Максимовський Л.А., Генетичні особливості проявлення суперовуляції, викликані гонадотропінами сироватки жеребних кобил. Тез. деп. респ. наук. конф. - м. Львів, 10-10 квітня 1990, с. 53-54.

3. Шоловило С.Г., Челецький М.М., Стефанів В.Д., Сенькус Л.Т., Кудла І.М., Пасіцький М.Д., Баран М.М., Відхилення заплідненості яйцеклітин у корті-донорів при багаторазових їх використаннях. Тез. деп. респ. наук. конф. - м. Львів, 10-10 квітня 1990, с. 60.

4. Павкун В.Д., Лесів М.М., Хавінзон А.Г., Любич Л.В., Пасіцький М.Д., Баран М.М., Шитик І.А., Тригуб О.А., Мікрохірургічне одержання півембріонів в умовах тваринництва /на рос. мові/. Тез. деп. наук. - виробн. конф. "Нові методи селекції і біотехнології в тваринництві" - Київ, 1991, с. 56-57.

5. Пасіцький М.Д., Павкун В.Д., Лесів М.М., Баран М.М., Залежність рівня поліовуляції і виходу якісних ембріонів від шитосту каротину в крові корті /на рос. мові/. Тез. деп. сесійських зборів. - Боровськ, 10-12 вересня 1991 р. , с. 101-102.

Подписано к печ. 21.05.92. Формат 60x84/16. Печать офсет. Бумага офсет.
Усл. п. л. I, 4. Усл. кр.-отт. I, 4. Уч.-изд. л. I, 0. Тираж 100 экз. Бесплатно.
Зак. 2736.

Областная книжная типография, 290000, Львов, ул. Стефаника, II.

466979

RECIBI ATHO

AB 25.553

