

ПОПЕРЕДНЯ ОЦІНКА ВІВЦЕМАТОК НА ПРИДАТНІСТЬ ДО ГОРМОНАЛЬНОЇ ОБРОБКИ ЯК СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДИКИ МОЕТ

І.В. Лобачова, О.С. Жулінська

Досліджували можливість застосування цитологічного аналізу вагінального мазка для оцінки вівцематок на придатність до гормональної стимуляції суперовуляції. Виявлено, що висока частка функціональних клітин і низька пікнотичних в мазках на початку обробки з великою ймовірністю свідчать про непридатність тварини до стимуляції. Цитологічний профіль вагінальних мазків має сезонну залежність, що слід враховувати при інтерпретації результатів.

Ключові слова: вівця, суперовуляція, вагінальний мазок

Для прискорення генетичного прогресу у тваринництві набула широкого застосування методика МОЕТ (*multi ovulation embryo transfer*), основні елементи якої розроблені ще у 80-90-х роках минулого сторіччя. Проте певні проблеми залишаються. Так, у вівчарстві доволі складним питанням є великий відсоток тварин, які не реагують на гормональну обробку, тобто не виявляють позитивної суперовуляторної відповіді. Це знижує ефективність застосування гормональних препаратів. Дослідниками розроблено декілька прийомів [4, 5, 7], які сприяють зниженню частки нереагуючих тварин, але варіабельність реакції залишається поки що значною. Тому, питання розробки підходів збільшення передбачуваності реакції залишається актуальною.

Існує два можливих напрямки: по-перше, вдосконалення схем гормональної обробки, їх пристосування до індивідуальних особливостей тварин, по-друге, розробка заходів попереднього тестування для усунення із дослідів початково непридатних тварин.

Відомо, що реакція тварин на гормональну обробку певною мірою залежить від наявності якісного жовтого тіла на яєчниках тварини-донора на початку обробки [4]. Зокрема, прогестерон, який виділяється жовтим тілом, сенсibiliзуючи певні області головного мозку тварин, сповільнює виділення ЛГ-релізинг-фактору гіпоталамусом і сприяє регресії персистентних фолікулів [8].

На якість яєчників негативно впливає присутність на них великого неовуляторного фолікула на початку гормональної обробки

[6]. Вважається, що естрогени, які виділяються цим фолікулом, обумовлюють порушення розвитку дрібних антральних фолікулів, зменшуючи таким чином пул чутливих до стимуляції об'єктів, а також змінюють склад середовища матки.

Отже, одним з напрямків тестування тварин на придатність до гормональної обробки є виявлення присутності на яєчниках специфічних структур. Такий підхід широко застосовується у скотарстві - за допомогою ультразвукового обладнання або ректального дослідження яєчників. Але, у овець, через дрібні розміри тіла і фолікулів, пряме тестування жовтих тіл або великих фолікулів неможливе, а застосування ультразвукової техніки не завжди дає змогу з високою точністю діагностувати стан яєчників. Разом з тим, прогестерон, джерелом якого є жовте тіло, і естрогени, джерелом яких є фолікули, впливають не тільки на яєчники, але й на інші статеві органи, зокрема, слизові шари матки і піхви. Тож, за припущенням, зміна певних характеристик цих органів може слугувати побічним показником стану яєчників тварин.

Метою даної роботи є визначення можливості застосування розробленого цитологічного аналізу вагінального мазка для попередньої оцінки придатності вівцематок до гормональної стимуляції суперовуляції.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проведено на вівцематках асканійської тонкорунної породи дослідного господарства "Асканія-Нова". Гормональну обробку тварин на суперовуляцію розпочинали введенням внутрішньовагінальних песаріїв з гестагеном незалежно від дня статевого циклу. Перед встромлянням песаріїв у тварин брали вагінальні мазки. На 15-16-у добу обробки тваринам починали ін'єкувати гонадотропін ("ФСГ-супер", Росія, 6-ти разово через кожні 12 годин у загальній дозі 25 Арм.Од. або гонадотропін сироватки жеребої кобили, "Intergonan", "Intervet", Голандія, одноразово у дозі 1200-1500 ІД). На другу добу від початку введення гонадотропіна вагінальні песарії вилучали, на четверту - тварин тестували на наявність статевого збудження і осіменяли природно або штучно. На шосту-сьому добу після першого осіменіння лапароскопічно оглядали яєчники, проводили підрахунок кількості і оцінку якості жовтих тіл та вилучення ембріонів. За позитивну реакцію на гормональну обробку вважали наявність на обох яєчниках більше трьох жовтих тіл.

Вагінальні мазки отримували шляхом м'якого дотику ватно-марлевым тампоном до верхнього склепіння середньої частини піхви. Відразу після цього робили відбиток тампоном на предметному скельці, який фіксували у 96%-ному етиловому спирті. Забарвлення відбитків проводили за Гімза-Романовським. Підрахунок

епітеліальних клітин у мазку проводили візуально під біокулярним мікроскопом при збільшенні у 40 разів.

За морфологічними ознаками епітеліальні клітини вагінального мазка поділяли на чотири основні групи: функціональні, зруйновані, без'ядерні та пікнотичні. Групу функціональних клітин поділяли додатково на три підгрупи: базальні (молоді), проміжні та суперфіційні [1].

Результати досліджень обраховували статистично [3].

Результати досліджень. За результатами огляду яєчників усі тварини (n=28) незалежно від сезону, схеми і типу застосованого гонадотропіну були поділені на дві групи: позитивно та негативно реагуючі. Цитологічний аналіз вагінальних мазків на початку обробки показав, що у тварин, які у наступному реагували позитивно, частка функціональних клітин була вірогідно менша ($td=3,43$), ніж у тих, що негативно прореагували, а частка клітин з пікнозом більша ($td=1,99$) (табл. 1). За розподілом функціональних клітин по підгрупах різниці між тваринами не виявлено. Донори з кращою наступною реакцією проявляли також тенденцію до збільшення часток зруйнованих і без'ядерних клітин.

Таблиця 1. Розподіл клітин за основними групами у вагінальних мазках вівцематок, які реагували позитивно або негативно

Група доно-рів	n	Кількість жовтих тіл на яєчниках, шт.	Група клітин, % від загальної кількості			
			функціональні	зруйновані	без'ядерні	пікнотичні
позитивні	17	7,76± 1,16 ^a	58,82± 4,05 ^a	13,35± 9,84 ^a	11,76± 2,95 ^a	16,06± 3,24 ^a
негативні	11	2,18± 0,31 ^d	75,91± 2,9 ^b	9,91± 2,1 ^a	6,27± 2,58 ^a	7,91± 2,5 ^b

Примітка: дані в одній колонці вірогідно різняться між собою - a:b - $p<0,05$, a:c - $p<0,01$, a:d - $p<0,005$.

Як відомо, більшість порід овець належать до тварин, у яких статева активність суттєво змінюється протягом року. Для урахування впливу сезону року при аналізі залежності реакції від картини вагінальних мазків на початку обробки вказані групи тварин були додатково поділені на чотири підгрупи (табл. 2). Як і в попередньому, спостерігалася різниця між "позитивними" і "негативними" донорами за показниками функціональних і пікнотичних клітин, яка зберігалася як у весняні, так і в осінні місяці. Крім того, у весняних "позитивних"

донорів було вірогідно більше зруйнованих клітин, що свідчило про кращу естрогенну активність їх організму.

У наведених даних звертає увагу те, що частка пікнотичних клітин у “негативних” донорів весною була більшою за аналогічний показник “позитивних” донорів в осінні місяці. Для аналізу цього явища дані усіх тварин, незалежно від рівня реакції, за часом отримання мазків були поділені на дві групи (табл. 3). Як видно, частка пікнотичних клітин у “весняних” тварин вірогідно перевищувала аналогічний показник “осінніх” тварин. Показник функціональних і зруйнованих клітин між сезонами майже не різнився, а кількість без’ядерних клітин у “осінніх” тварин була невірогідно більша ($p > 0,05$). Серед функціональних клітин у “осінніх” тварин вірогідно зростала частка суперфіційних (зрілих) клітин (табл. 4).

Таблиця 2. Розподіл клітин за основними групами у вагінальних мазках вівцематок, які реагували позитивно або негативно у різні сезони року

Група доно-рив	n	Кількість жовтих тіл на яєчниках, шт.	Група клітин, % від загальної кількості			
			функці-ональні	зруйно-вані	без’я-дерні	пікно-тичні
весна						
позитивні	10	6,8± 0,58 ^a	58,3± 6,28 ^a	14,6± 3,44 ^a	6,6± 1,6 ^a	20,5± 4,59 ^a
негативні	5	2,2± 0,55 ^d	74,8± 3,45 ^b	6,4± 2,41 ^b	6,0± 3,74 ^a	12,8± 4,16 ^a
осінь						
позитивні	7	9,14± 2,85 ^a	59,57± 5,25 ^a	11,57± 3,91 ^a	19,14± 6,17 ^a	9,71± 3,71 ^a
негативні	6	2,17± 0,44 ^d	76,83± 5,05 ^b	12,83± 3,05 ^a	6,5± 4,19 ^a	3,83± 2,27 ^a

Примітка: порівняння проведено між групами тварин у межах сезонів року

Таблиця 3. Розподіл клітин за основними групами у вагінальних мазках вівцематок у різні сезони року

Час отримання мазків	n	Група клітин, % від загальної кількості			
		функціональні	зруйновані	без'ядерні	пікнотичні
весна	15	63,8± 4,68 ^a	11,87± 2,55 ^a	6,4± 1,49 ^a	17,93± 3,34 ^a
осінь	13	67,54± 4,24 ^a	12,15± 2,34 ^a	13,31± 4,02 ^a	7,0± 2,26 ^b

Таким чином, показники кількості без'ядерних і пікнотичних клітин у вагінальних мазках вівцематок є сезоннозалежними, що слід враховувати при інтерпретації результатів. Підвищення кількості без'ядерних клітин (табл. 3) і характер розподілу функціональних клітин за підгрупами (табл. 4) свідчить про кращу проліферативну активність статевих органів «осінніх» вівцематок.

Таблиця 4. Розподіл функціональних клітин за підгрупами у вагінальних мазках вівцематок у різні сезони року

Час проведення обробки	n	Підгрупи функціональних клітин, % від функціональних		
		базальні	проміжні	суперфіційні
весна	15	33,25±7,67 ^a	33,57±4,8 ^a	33,18±6,61 ^a
осінь	13	19,58±6,61 ^a	27,9±2,84 ^a	52,53±7,38 ^b

Таким чином, між показниками «позитивних» і «негативних» донорів спостерігається вірогідна різниця картини вагінальних мазків. Про що це може свідчити? Дослідження вагінальних мазків вівцематок протягом статевого циклу у дослідях Жулінської О.С. [1] виявило зниження частки функціональних клітин в овець з 8-ї по 13-у добу і підвищення частки пікнотичних клітин - з 6-ї по 15-у з максимумом на 6-8-у добу статевого циклу. Тож, у «осінніх» донорів зниження частки функціональних і підвищення пікнотичних клітин з великою вірогідністю свідчить про те, що тварини на початок обробки знаходилися на середині статевого циклу, тобто стадії, на якій клітини статевих органів закінчують проліферацію і переходять у режим максимальної секреції. У весняні місяці, коли зовнішній прояв статевої активності у тварин відсутній, але циклічна активність яєчників зберігається, загальне збільшення кількості пікнотичних (табл. 3) і зниження суперфіційних клітин (табл. 4) може свідчити про

певну неповноцінність процесів проліферації статевих органів, обумовлену саме сезоном.

Таким чином, такі показники, як підвищена частка функціональних і знижена частка пікнотичних клітин в вагінальних мазках вівцематок на початку обробки може слугувати показником непридатності тварин до гормональної обробки. Це підтверджується малим значенням коефіцієнта варіації першого показника - 9,23 у «весняних негативних» і 14,69 у «осінніх негативних» донорів. У «позитивних» тварин цей показник вищий і становить відповідно 32,39 і 21,6.

Як сказано раніше, одним із шляхів підвищення ефективності методики МОЕТ є впровадження нових, більш вдосконалих схем обробки. Зокрема, нами розроблена схема із застосуванням новокаїнової блокади, використання якої дозволяє не тільки підвищити рівень овуляції, але й покращити стан статевих органів, про що свідчить отримання повноцінних зародків у весняні місяці [2]. У таблиці 5 наведено дані щодо розподілу клітин у вагінальних мазках вівцематок, яких потім піддавали гормональній обробці з застосуванням або без застосування новокаїнової блокади.

Результати показують, що в групі «позитивних» донорів, схема яких включала в себе новокаїнову блокаду, на початку обробки кількість функціональних клітин була збільшена ($p > 0,05$), а пікнотичних вірогідно зменшена ($p < 0,05$) порівняно з «безблокадними» тваринами. Тож, можна припустити, що застосування новокаїнової блокади сприяло переведенню частини «проблемних» тварин у групу «позитивних» донорів. У групі «негативних» донорів вірогідної різниці між показниками підгруп тварин не спостерігалось. Разом з тим, вірогідна різниця за кількістю функціональних клітин між «позитивними» і «негативними» донорами незалежно від застосування ($t_d = 1,81$) або відсутності ($t_d = 2,225$) блокади зберігалася. Тож, цитологічний аналіз вагінального мазка дозволяє визначити можливий характер впливу додаткових заходів при гормональній стимуляції, що важливо при відпрацюванні схем обробок.

Таким чином, проведення аналізу вагінального мазка на початку гормональної обробки дозволяє з достатньою ймовірністю визначити початково непридатних тварин. Практичне застосування цього тесту буде сприяти підвищенню ефективності застосування методики МОЕТ.

Таблиця 5. Розподіл клітин за основними групами у вагінальних мазках вівцематок з різними типами обробки

Тип обробки	n	Кількість жовтих тіл на яєчниках, шт	Група клітин, % від загальної кількості			
			функціональні	зруйновані	без'ядерні	пікнотичні
ПОЗИТИВНІ						
з блокадою	1	8,31±	61,38±	14,23±	12,69±	11,69±
	3	1,47	4,3 ^a	2,96 ^a	3,81 ^a	2,76 ^a
без блокади	4	6,0±	50,5±	10,5±	8,75±	30,25±
		1,25	11,41 ^a	5,22 ^a	3,14 ^a	7,66 ^c
НЕГАТИВНІ						
з блокадою	5	1,8±	74,8±	12,0±	8,4±	4,8±
		0,55	6,04 ^a	3,69 ^a	4,92 ^a	2,61 ^a
без блокади	6	2,5±	76,83±	8,17±	4,5±	10,5±
		0,37	3,13 ^a	2,69 ^a	3,07 ^a	4,14 ^a

Примітка: порівняння проведено за типом обробки у межах груп донорів

Висновки. 1. Цитологічний аналіз вагінальних мазків вівцематок можна використовувати як додатковий тест придатності вівцематок до гормональної стимуляції суперовуляції.

2. Підвищена кількість у мазках функціональних і зменшена пікнотичних клітин слугує певним показником початкової непридатності вівцематок до гормональної обробки.

3. Показники відносної кількості без'ядерних і пікнотичних клітин сезонно залежні, що слід урахувувати про інтерпретації результатів тестування.

Список використаної літератури

1. Жулінська О.С. Цитовагінальний метод оцінки репродуктивної системи овець // Вісник аграрної науки. - 2007. - №4. - С. 75-78.
2. Лобачова І.В., Пікус Д.О., Туринський В.В. Застосування новокаїнової блокади для стимуляції суперовуляції у овець // Вісник аграрної науки. - 2005. - №12. - С. 34-37.
3. Плохинский Н.А. Биометрия. - Из-во Сиб. отд. АН СССР, Новосибирск, 1961. - 364 с.

4. Congie Y., Baril G., Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat // Theriogenology. - 2003. - V. 59, N1. - P. 171-188.
5. Gonzalez-Añover P., Encinas T., Garcia-Garcia R.M., Veiga-Lopez A., Cocero M.J., McNeilly A.S., Gonzalez-Bulnes A. Ovarian response in sheep superovulated after pretreatment with growth hormone and GnRH antagonists is weakened by failures in oocyte maturation // Zygote. - 2004. - V.12. - P. 301-304.
6. Gonzalez-Bulnes A., Santiago-Moreno J., Cocero M.J., Souza C.J.H., Groome N.P., Garcia-Garcia R.M., Lopez-Sebastian A., Baird D.T. Measurement of inhibinA and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments // Theriogenology. - 2002. - V. 57, N4. - P. 1263-1272.
7. Folch J., Ramon J. P., Cocero M. J., Alabart J. L., Beckers J. F. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes // Theriogenology. - 2001. - V. 55, N9. - P. 1777-1785.
8. Vinales C., Forsberg M., Bancharo Z.G., Rubianes E. Effect of long-term and short-term progesteron treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes // Theriogenology. - 2001. - V. 55, N4. - P. 993-1004.

УДК 633.2/.3.038:636.22/.28 + 636.32/.38

ПОЛІПШЕННЯ ПРИРОДНИХ КОРМОВИХ УГІДЬ ТА СТВОРЕННЯ НА НИХ ПАСОВИЩНИХ КОНВЕЄРІВ ДЛЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ І ОВЕЦЬ

В.М. Бова, О.Д. Гратило

Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова «Асканія-Нова» - Національний науковий селекційно-генетичний центр з вівчарства

Розглянуто питання створення пасовищ на природних кормових угіддях Присивашся. Підібрані багаторічні травосумішки з різними строками використання, які в поєднанні з однорічними кормовими культурами забезпечують конвеєрне надходження пасовищних кормів в весняно-літній та осінній періоди.

Ключові слова: природні кормові угіддя, поліпшення, багаторічні трави, однорічні кормові культури, пасовищний конвеєр

Серед заходів, спрямованих на створення міцної кормової бази в умовах богарного землеробства південного степу України, важливого