

ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

УДК 619:618.1-07

С.В. Федотов, Е.Е. Олейникова, С.Г. Яковлев, Е.А. Муха
S.V. Fedotov, Ye.Ye. Oleynikova, S.G. Yakovlev, Ye.A. Mukha

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ТЕЛОК-ФРИМАРТИН

FERTILITY DETERMINATION IN FREEMARTIN HEIFERS

Ключевые слова: антимюллеров гормон, телки-фримартины, бесплодие, крупный рогатый скот, половые гормоны.

Воспроизводство и выбраковка продуктивных животных являются основными факторами, которые влияют на численность коров в стаде. Своевременное определение фертильности у ремонтного молодняка с последующей выбраковкой проблемных телок будет способствовать снижению прямых экономических потерь при разведении молочного скота. С целью установления гормонального статуса телок-фримартин мы определили в сыворотке крови концентрации половых гормонов (прогестерон, эстрадиол-17 β , тестостерон) и Мюллер-ингибирующего гормона. Проведённые нами исследования уровня антимюллерова гормона (АМГ) с помощью иммуноферментного анализа в сыворотке крови доказали возможность ранней оценки фертильности у телок. Этот метод позволит провести раннюю выбраковку телок-фримартин из продуктивного стада. Введение тестирования на уровень антимюллерова гормона методом ИФА в обязательную гинекологическую диспансериза-

цию крупного рогатого скота в животноводческих предприятиях является целесообразным и эффективным.

Keywords: Anti-Müllerian hormone (AMH), freemartin heifers, infertility, cattle, sex hormones.

Reproduction and culling of productive animals are the main factors that affect the number of cows in a herd. Timely determination of fertility in replacement young cattle with the subsequent culling of problem heifers will help to reduce direct economic losses in dairy cattle breeding. In order to determine the hormonal status of freemartin heifers, we determined the concentration of sex hormones (progesterone, estradiol-17 β , testosterone) in blood serum and AMH. The studies of the AMH levels by using enzyme-linked immunosorbent assay in blood serum proved the possibility of early evaluation of fertility in heifers. This method will enable early culling of freemartin heifers from the productive herd. The introduction of testing for the AMH level by ELISA in the mandatory gynecological examination of cattle on cattle farms is an appropriate and efficient measure.

Федотов Сергей Васильевич, д.в.н., проф., каф. диагностики болезней, терапии, акушерства и репродукции животных, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина. E-mail: serfv@mail.ru.

Олейникова Елена Евгеньевна, аспирант, каф. диагностики болезней, терапии, акушерства и репродукции животных, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина. E-mail: serfv@mail.ru.

Яковлев Сергей Гарриевич, студент, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина. E-mail: serfv@mail.ru.

Муха Евгения Александровна, студент, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина. E-mail: serfv@mail.ru.

Fedotov Sergey Vasilyevich, Dr. Vet. Sci., Prof., Chair of Animal Disease Diagnostics, Obstetrics and Reproduction, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin. E-mail: serfv@mail.ru.

Oleynikova Yelena Yevgenyevna, post-graduate student, Chair of Animal Disease Diagnostics, Obstetrics and Reproduction, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin. E-mail: serfv@mail.ru.

Yakovlev Sergey Garriyevich, student, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin. E-mail: serfv@mail.ru.

Mukha Yevgeniya Aleksandrovna, student, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin. E-mail: serfv@mail.ru.

Введение

В настоящее время в Российской Федерации существует объективная необходимость увеличения численности маточного поголовья и повышения уровня их репродуктивного потенциала. Решению этой проблемы препятствует широкое распространение в крупных и средних животноводческих предприятиях различных форм бесплодия крупного рогатого скота. Для исключения негативных последствий бесплодия на производственные показатели в молочном скотоводстве необходимо своевременно проводить гинекологические диспансеризации маточного поголовья и ремонтных телок [2].

При постановке диагноза ветеринарные специалисты должны исключить все формы временного или постоянного бесплодия, в т.ч. врожденные аномалии (инфантилизм, фримартинизм, уродства и т.д.) [3].

Фримартинизм наблюдается преимущественно у крупного рогатого скота при рождении разнополых двоен. В период внутриутробного развития двух плодов между сосудами хорионов образуются анастомозы, приводящие к образованию общей плацентарной системе. Мужские гормоны начинают образовываться раньше, и при поступлении их в организм телочки происходит подавление фертильности. Такие телки, как правило, остаются бесплодными, у них наблюдается мужской тип развития [1].

В случае если анастомозы у разнополых двоен развиваются позднее 75-80-го дня стельности, то после рождения и до половой зрелости визуальных изменений в развитии половых органов у телочек не диагностируют. В связи с этим необходимо таких телочек тщательно исследовать с целью определения их пригодности к племенному использованию.

Для этого, наряду с клиническими методами, целесообразно использовать и лабораторную диагностику, в частности определение уровня антимюллерова гормона (АМГ). Антимюллеров гормон является одним из основных индикаторов нормального функционирования половых желёз [4, 10].

В организме самки АМГ продуцируется гранулезными клетками растущих фолликулов от стадии первичных, достигая максимума в малых антральных, и практически исчезает в фолликулах, приближенных к графову пузырьку [5, 7].

Антимюллеров гормон является маркером яичникового резерва. Биологические эффекты АМГ реализуются при действии на се-

рин/треониновые рецепторы двух типов: АМГР-1, АМГР-П. Результатом взаимодействия с рецепторами служит образование сложного рецепторного комплекса, оказывающего свое влияние после соединения с ядром клетки [8].

По данным некоторых авторов, антимюллеров гормон, или Мюллер-ингибирующий гормон, способен снижать чувствительность гранулезных клеток яичников к фолликулостимулирующему гормону, задерживая фолликулы на стадии малых антральных [9]. Такое заключение позволяет нам определить тест на уровень АМГ в сыворотке крови крупного рогатого скота как информативный.

Целью работы явилось определение фертильности телок-фримартинов по уровню антимюллерова гормона.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные работы проводились на кафедре диагностики болезней, терапии, акушерства и репродукции животных ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина» и в ЗАО «Совхоз имени Ленина» Ленинского района Московской области.

ЗАО «Совхоз имени Ленина» – многопрофильное сельскохозяйственное предприятие. Животноводство представлено 2 фермами, на которых содержатся около 460 черно-пестрых голштинизированных коров, а общее поголовье вместе с ремонтным молодняком составляет 1050 гол.

Основные технологические процессы на молочных фермах полностью автоматизированы, доение осуществляют 8 роботов. Коровы имеют круглосуточный доступ к корму при помощи станций «Lely Cosmix» и специального роботопододвигателя корма «Lely Juno», при этом концентрированный корм задается индивидуально для каждого животного. Повышенной лактации коров способствует система «Light for Cows» (Lely L4C), способная задавать нужную длину светового дня. Контроль за технологией осуществляется по средствам программного обеспечения Lely T4C и приложению для мобильных устройств Lely T4C InHerd.

Объектами исследований были телки-фримартинины и клинически здоровые телки, рожденные в 2018-2019 гг. Вес фримартинов и контрольных телок на время экспериментальных работ составлял от 360 до 400 кг, а возраст – 16-18 месяцев. Для определения концентрации

Антимюллерова гормона (АМГ) использовали сыворотки крови телок. Отбор крови производился из хвостовой вены вакуум-содержащими системами BD Vacuutainer. Центрифугировали при 2500 оборотах, в течение 10 мин., далее аликвотировали сыворотку крови и исследовали ее методом иммуноферментного анализа.

Для постановки ИФА мы использовали тест «Ansh Labs bovine АМН» производства США. Перед постановкой реакции мы добавили в сыворотку крови телок-фримартин разбавитель в соотношении 1:20; затем внесли по 50 мкл исследуемой сыворотки в лунки планшета и 50 мкл буфера для анализа АМГ.

В течение 120 мин. при комнатной температуре на шейкере встряхивали со скоростью 600-800 об/мин. Затем промыли 5 раз раствором А1 и добавили 100 мкл RTH-конъюгата антителобiotин АМГ в каждую лунку.

В течение 60 мин. при комнатной температуре на шейкере встряхивали со скоростью 600-800 об/мин., после промыли и внесли 100 мкл АМГ стрептавидин-ферментного конъюгата-RTU.

Быстро встряхивали (600-800 об/мин.) на шейкере в течение 30 мин. и промывали. В экспериментальные лунки добавляли 100 мкл раствора хромогена ТМВ и встряхивали при 600-800 об/мин. на шейкере с орбитальными микропланшетами, в течение 10-12 мин. при комнатной температуре.

Вносили 100 мкл раствора для остановки реакции в каждую лунку, используя пипетку с повторителем. Затем помещали планшет в считывающее устройство для ИФА, установленное на длину волны 450 нм.

По калибровочной кривой определяли концентрацию Антимюллерова гормона (АМГ) в сыворотке крови телок-фримартин.

Половые гормоны в сыворотке крови экспериментальных телок определяли в ИФА с использованием тест-систем российского производства.

Результаты исследований и их обсуждение

Воспроизводство и выбраковка продуктивных животных являются основными факторами, которые влияют на численность коров в стаде. Своевременное определение фертильности у ремонтного молодняка с последующей выбраковкой проблемных телок будет способствовать

снижению прямых экономических потерь при разведении молочного скота.

В условиях животноводческих ферм ЗАО «Совхоз имени Ленина» были подобраны телки-фримартин с целью выявления возможной фертильности. Контролем являлись клинически здоровые телки, полученные от коров при одноплодной стельности.

С целью установления гормонального статуса телок-фримартин мы определили в сыворотке крови концентрации половых гормонов (прогестерон, эстрадиол-17 β , тестостерон) и Мюллер-ингибирующего гормона (табл.).

Из данных таблицы следует, что содержание эстрадиола 17 β в крови телок-фримартин за все время исследований в среднем составило $41,8 \pm 10,1$ пМ/л; в контрольной группе этот показатель находился в пределах $100,8 \pm 11,9$ пМ/л, в то время как уровень тестостерона у фримартинов превышал данный показатель у клинически здоровых животных на 57,2%.

При определении концентрации прогестерона установлено, что содержание гормона в сыворотке крови клинически здоровых телок и фримартинов была примерно одинаковое – $1,0 \pm 0,6$ против $1,3 \pm 0,4$ нМ/л.

В свою очередь, уровень антимюллерового гормона у телок-фримартинов составил $94,7 \pm 14,1$ пг/мл, что в 4,1 раза ниже, чем аналогичный показатель в сыворотке крови ремонтных телок.

На протяжении всего эксперимента мы ставили диагноз на наличие половой охоты у контрольных телок и телок-фримартинов. При этом мы применяли систему SCR Heatime® H, основанную на непрерывном контроле за двигательной активностью коров и телок, что позволяло диагностировать возбуждение полового цикла в режиме реального времени. Для исключения ложной половой охоты мы ввели двухчасовой интервал в считывающие устройства и закрепили передающую антенну при входе на кормовые площадки.

При наличии половой охоты мы искусственно осеменяли ремонтных телок ректоцервикальным способом. В результате после первого осеменения оплодотворилось 12 клинически здоровых ремонтных телок (80,0%), после второго – 2 (13,3%) и 1 телка (6,7%) после третьего. В свою очередь, у всех телок-фримартинов мы не наблюдали стадию возбуждения, соответственно, они остались яловыми.

Репродуктивная способность и концентрация половых гормонов в сыворотке крови телок-фримартин и клинически здоровых ремонтных телок и (n=15)

Показатели	Молодняк крупного рогатого скота	
	телки-фримартины	клинически здоровые телки
Антимюллеров гормон, пг/мл	94,7±14,1	378,5±12,8
Прогестерон, нМ/л	1,0±0,6	1,3±0,4
Эстрадиол 17β, пМ/л	41,8±10,1	100,8±11,9
Тестостерон, нМ/л	2,8±0,5	1,2±0,5
Оплодотворение после 1-го осеменения, гол/%	-	12/80,0
Оплодотворение после 2-го осеменения, гол/%	-	2/13,3
Оплодотворение после 3-го осеменения, гол/%	-	1/6,7
Не оплодотворилось, гол/%	15/100	-

Изучение уровня антимюллерова гормона показало, что его количество напрямую коррелирует с фертильностью крупного рогатого скота независимо от периода эстрального цикла.

Так, при достаточно высоких концентрациях АМГ (378,5±12,8 пг/мл) в сыворотке крови фертильность была признана достаточно высокой. Весь клинически здоровый полученный при одноплодной стельности ремонтный молодняк был успешно осеменен.

При сниженных концентрациях антимюллерова гормона телки-фримартины оказались бесплодными, даже после проведения гормональной стимуляции (Co-Synx) и введения спермодоз без клинического проявления половой охоты.

Таким образом, при концентрации АМГ в сыворотке крови ниже 100 нг/мл телки не способны к плодотворному осеменению, тогда как высокий уровень антимюллерова гормона (более 380 нг/мл) позволяет успешно оплодотворять животных с первой попытки.

Заключение

Определение уровня АМГ в сыворотке крови крупного рогатого скота может применяться наряду с другими диагностическими тестами для отбора ремонтного молодняка, тем самым повышая репродуктивные характеристики стада.

В процессе исследований обнаружена взаимосвязь между уровнем АМГ в сыворотке крови исследуемых животных и их способностью к плодотворному осеменению. Предлагаемый метод позволяет обнаруживать телок-фримартин даже в первые месяцы их жизни, что может существенно уменьшить затраты на содержание проблемных животных.

Таким образом, введение тестирования на уровень антимюллерова гормона методом ИФА

в обязательную гинекологическую диспансеризацию крупного рогатого скота в животноводческих предприятиях является целесообразным и эффективным.

Библиографический список

1. Авдеенко, В. С. Биотехника воспроизводства с основами акушерства животных / В. С. Авдеенко, С. В. Федотов. – Москва: Инфра-М, 2016. – 455 с. – Текст: непосредственный.
2. Федотов, С. В. Симптоматическое бесплодие коров, вызванное половыми инфекциями / С. В. Федотов, В. П. Дегтярев, Г. М. Удалов. – Текст: непосредственный // Ветеринария. – 2015. – № 5. – С. 36-39.
3. Федотов, С. В. Диагностика и профилактика симптоматического бесплодия у коров / С. В. Федотов, Н. С. Белозерцева, И. М. Яхаев. – Текст: непосредственный // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2016. – № 11 – С. 118-123.
4. Durlinger, A. (2002). Anti-Mullerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the Mouse Ovary. *Endocrinology*. 143. 1076-1084. Doi: 10.1210/en.143.3.1076.
5. Pellatt L., Hanna L., Brincat M., et al. (2007). Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 (1): 240-245. Doi:10.1210/jc.2006-1582.
6. Nilsson, E.E., Schindler, R., Savenkova, M.I., Skinner, M.K. (2011). Inhibitory actions of Anti-Müllerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. *PLoS one*. 6 (5), e20087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020087>.
7. Kavya, K.M., Sharma, R.K., Jerome, A., et al. (2017). Anti-Müllerian hormone and antral follicular count in early and delayed pubertal Murrah buffalo

heifers. *Livestock Science*. 198. Doi: 10.1016/j.livsci.2017.02.013.

8. Fleming, R., Harborne, L., MacLaughlin, D., et al. (2005). Metformin reduces serum Müllerian-inhibiting substance levels in women with polycystic ovary syndrome after protracted treatment. *Fertility and Sterility*. 83. 130-6. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.05.098.

9. Grossman, M., Nakajima, S., Fallat, M., Siow, Y. (2008). Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertility and sterility*. 89. 1364-70. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.066.

10. Yang, M., Cushman, R., Fortune, J. (2017). Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. *Molecular Human Reproduction*. 23. 1-10. Doi: 10.1093/molehr/gax010.

References

1. Avdeenko, V.S. Biotekhnika vosproizvodstva s osnovami akusherstva zhivotnykh // V.S. Avdeenko, S.V. Fedotov. – Moskva: Infra-M. 2016. – 455 s.

2. Fedotov, S.V. Simptomaticheskoe besplodie korov, vyzvannoe polovymi infektsiyami // S.V. Fedotov, V.P. Degtyarev, G.M. Udalov // Veterinariya. – 2015. – No. 5. – S. 36-39.

3. Fedotov, S.V. Diagnostika i profilaktika simptomaticheskogo besplodiya u korov // S.V. Fedotov, N.S. Belozertseva, I.M. Yakhaev // Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2016. – No. 11 – S. 118-123.

4. Durlinger, A. (2002). Anti-Mullerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the

Mouse Ovary. *Endocrinology*. 143. 1076-1084. Doi: 10.1210/en.143.3.1076.

5. Pellatt L., Hanna L., Brincat M., et al. (2007). Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 (1): 240-245. Doi:10.1210/jc.2006-1582.

6. Nilsson, E.E., Schindler, R., Savenkova, M.I., Skinner, M.K. (2011). Inhibitory actions of Anti-Müllerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. *PloS one*. 6 (5), e20087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020087>.

7. Kavya, K.M., Sharma, R.K., Jerome, A., et al. (2017). Anti-Müllerian hormone and antral follicular count in early and delayed pubertal Murrah buffalo heifers. *Livestock Science*. 198. Doi: 10.1016/j.livsci.2017.02.013.

8. Fleming, R., Harborne, L., MacLaughlin, D., et al. (2005). Metformin reduces serum Müllerian-inhibiting substance levels in women with polycystic ovary syndrome after protracted treatment. *Fertility and Sterility*. 83. 130-6. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.05.098.

9. Grossman, M., Nakajima, S., Fallat, M., Siow, Y. (2008). Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertility and sterility*. 89. 1364-70. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.066.

10. Yang, M., Cushman, R., Fortune, J. (2017). Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. *Molecular Human Reproduction*. 23. 1-10. Doi: 10.1093/molehr/gax010.



УДК 619:615:618.7

А.И. Ашенбреннер, Ю.А. Хаперский, Н.Ю. Беляева, Ю.А. Чекункова
A.I. Aschenbrenner, Yu.A. Khaperskiy, N.Yu. Belyayeva, Yu.A. Chekunkova

ИНФОРМАТИВНАЯ ЦЕННОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА КОРОВ ПРИ ПРОГНОЗЕ ПОСЛЕРОДОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

THE INFORMATIVE VALUE OF COW IMMUNE STATUS INDICES IN PREDICTING POSTPARTUM DISEASES IN COWS

Ключевые слова: прогностическая информативность, послеродовые заболевания, гематологический статус, иммунологические показатели, НСТ-тест, иммунокомпетентные клетки.

Keywords: predictive informative value, postpartum diseases, hematological status, immunological indices, Nitroblue tetrazolium reduction test (NBT), immunocompetent cells.