

ВЕТЕРИНАРИЯ И ЖИВОТНОВОДСТВО

УДК:636.082.4.612.018

¹Абай Г., ^{1,2}Алибаев Н.Н., ²Бекетауов О.

¹Южно-Казахстанский государственный университет им. М.Ауезова, г. Шымкент

²Юго-Западный научно-исследовательский институт растениеводства и животноводства, г. Шымкент

ПОЛУЧЕНИЕ СЫРОГО ГОНАДОТРОПНОГО ГОРМОНА

Аннотация

Данная статья посвящена получению сырого гонадотропного гормона из сыворотки жеребых кобыл (СЖК) разной очистки.

На выход сырого гонадотропина значительное влияние оказывает возраст и сроки жеребости кобыл-доноров. Наибольший выход сырого гонадотропина получен из сыворотки, полученной от 3-х, 5-и летних кобыл-доноров со сроком жеребости 65-80 дней, в среднем составил от 1569 до 2360мг, минимальный выход показала сыворотка, полученная от кобыл-доноров со сроком жеребости 40-45 дней.

Ключевые слова: сыворта жеребых кобыл, гонадотропин, жеребые кобылы, донор.

Введение

Использование гормональных препаратов на основе гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (СЖК) эффективно повышает многоплодие у сельскохозяйственных животных[1].

СЖК - это гормональный препарат, представляющий собой стерильную сыворотку, получаемую из крови здоровых кобыл в период от 40 до 90 дня жеребости[3].

Впервые о содержании гонадотропного гормона в сыворотке жеребых кобыл сообщили Н. Cole и G. Hart. По их данным у оплодотворенных кобыл гигантски возрастает в начале второго месяца жеребости содержание гонадотропного фактора в крови. Количество его достигает примерно такой же концентрации, как в гипофизе,-100-200 и даже 300м.е. в миллилитре, или 100-300 тыс. в литре. В это время в яичниках у жеребых кобыл образуется вторая партия желтых тел. Это гигантское возрастание продукции гормона, однако сравнительно не продолжительно: через 1^{1/2}- 2 месяца количество его начинает постепенно снижаться и к четвертому месяцу становится таким же, как у нежеребой кобылы [3].

Таким образом, кобыла в начале жеребости является мощным продуцентом одного из ценнейших гормонов. Однако, вследствие не совершенных методов определения гонадотропной активности, а также достоверно не изученных факторов прямо или косвенно влияющих на активность гонадотропина сыворотки, вопрос рационального использования животных реципиентов, улучшения качества, а также увеличения производства СЖК остается открытым, что в конечном итоге снижает экономическую эффективность использования препаратов, изготовленных на основе СЖК. Все это требует более детального изучения причин влияющих на гонадотропную активность СЖК, а также совершенствования традиционных и разработки новых методов определения гонадотропина в сыворотке крови жеребых кобыл, отбора продуцентов ГСЖК и получения сухих гормонов [6].

Материалы и методы

Работа была проведена на кафедре «Биотехнология» Южно-Казахстанского государственного университета им. М. Ауэзова, в лаборатории «Биотехнология» Юго-Западного научно-исследовательского института животноводства.

Объектом исследования послужили кобылы-доноры породы «джабе» в количестве 16 голов, разного возраста (3-10 лет) и в разные сроки жеребости (40-80 дней).

Материалом исследования послужили сыворотка жеребых кобыл (СЖК) и гонадотропин сыворотки жеребых кобыл.

Исследуемые животные были отобраны в частных крестьянских хозяйствах «Жанторе» и «Жайлау» Южно-Казахстанской области.

Препарат СЖК содержит гонадотропный гормон, который при введении животному стимулирует функцию половых желез, вызывает развитие дополнительных фолликулов при полноценном половом цикле и регулирует его фазы при некоторых формах бесплодия[2].

Заготовка сыворотки жеребых кобыл осуществляется в период с 40 по 80 день жеребости, когда в ней содержится максимальное количество гонадотропных гормонов.

Сроки жеребости кобыл-доноров определяли по дате случки. Через 40-45 дней после случки проводили диагностику жеребости кобыл на половозрелых самцах озерных лягушек[3].

Для проведения диагностики жеребости кобыл от каждой кобылы-донора было взято по 10 мл крови.

Гонадотропин крови жеребых кобыл вызывает появление спермиев в моче самцов озерных лягушек. Реакцию считают положительной, если в поле зрения микроскопа обнаруживают спермии у двух из трех подопытных самцов; отрицательной, если спермиев нет у всех трех лягушек[7].

После установления жеребости кобылы-доноры поступают для взятия крови.

Получение гонадотропина традиционными методами из СЖК осуществлялось путем осаждения балластных белков. Сыворотку смешивали с охлажденным до $-4 - 7^{\circ}\text{C}$ этиловым спиртом, разведенным 10М раствором уксусной кислоты и 4М раствором уксусно-кислого натрия в следующем объеме и соотношении масс. % А 15, 1-23, 5; Б 4,9-12,5; этиловый спирт остальное.

Гонадотропин осаждают, смешивая центрифугат с охлажденным до $-1-5^{\circ}\text{C}$ этиловым спиртом в соотношении 1: (1,25-1,50) в течение 1-2 час. Полученный осадок молочного цвета (гонадотропин) отделяем от поверхностной жидкости. С пробирок собираем осажденный влажный ГСЖК и растворяем в физиологическом растворе в коллоидной мельнице из расчета 1,0-1,5 кг сырой массы на 15-20 л. Стабилизируют добавлением 40-50 г/л аминокислоты. Осветляют раствор сепарированием, проводят коррекцию pH до 7,6-7,8, затем стерилизующую фильтрацию и лиофильное высушивание готового препарата.

В работе использованы наиболее известные способы осаждения балластных белков из СЖК. СЖК смешивали с охлажденным до $4-7^{\circ}\text{C}$ этиловым спиртом, разведенным 10 М раствором уксусной кислоты и 4М раствором уксуснокислого натрия в следующем соотношении:

- 10М раствор уксусной кислоты 19,3%,
- 4М раствор уксуснокислого натрия 8,7%
- этиловый спирт 72,0%.

Затем полученную смесь центрифугировали со скоростью 40 об/мин, после устанавливали pH 5,9-6,0, выдерживали 30 мин для осаждения балластных белков. После балластные белки отбрасывают, а центрифугат собирали в емкости для осаждение гонадотропина.

Соотношение гормонов в плазме крови определяли на микростриповом фотометре американского производства «Stat Fax 2100», предназначенного для иммуноферментного анализа. Подсчет результатов концентраций ФСГ и ЛГ в сыворотке обследуемого образца производили с помощью многоканального спектрофотометра при длине волны 450 нм.

Результаты исследований, полученные в процессе опытных работ, обрабатывали методом вариационной статистики [9].

Результаты исследований

Для осаждения сырого гонадотропина из сыворотки жеребых кобыл использовали также два способа.

1-способ, к объему центрифугата, полученного после очистки от балластных белков добавляли охлажденного до 5⁰С этилового спирта в соотношении 1:1,25. Смесь выдерживали для осаждения гонадотропина в течение 2 часа.

2-способ, к объему центрифугата, полученного после очистки от балластных белков добавляли охлажденного до 10⁰С этилового спирта в соотношении 1:1:1. Смесь выдерживают для осаждения гонадотропина в течение 6 часов.

Результаты получения сырой массы гонадотропина из сыворотки жеребых кобыл разного возраста с использованием двух способов приведены в таблице 1.

Таблица 1- Выход сырого гонадотропина из сыворотки крови жеребых кобыл разного возраста

Возраст доноров	I-способ	II-способ	Всего
	M±m	M±m	M±m
3	740,8±25,49	706,1±23,3	723,4±37,7
4	978,2±42,03	921,8±36,47	950,0±28,6
5	104,2±37,61	986,0±50,0	1003,6±31,5
6	997,2±55,84	1049,6±56,0	1023,4±100,0
7	1088,3±28,23	1087,0±57,71	1087,7±32,1
8	1005,9±42,83	1070,8±45,17	1038,3±32,0
9	954,9±49,32	965,0±58,58	959,9±38,3
10	933,3±47,33	978,8±52,52	956,0±35,7
В среднем	965,0±18,7	970,6±21,8	967,8±14,2

Как видно из данных таблицы 1, выход сырой массы гонадотропина из сыворотки, полученной от разных по возрасту кобыл-доноров было относительно равное.

В I способе выход сырого гонадотропина составил от 740,8±25,49 мг до 1088±28,23 мг., во II способе от 706,1±23,3 мг до 1087±57,71 мг.

Следует отметить, что выход сырого гонадотропина из сыворотки крови 3-х летних кобыл-доноров оказался низким, сыворотки крови 5-и, 7-и, 8-и летних кобыл-доноров показали более высокую результативность. Сыворотки крови оставшихся кобыл-доноров занимали промежуточное положение.

Выход сырого гонадотропина из сыворотки крови жеребых кобыл 3-х летнего возраста в среднем ниже от 226,6 до 364,3 г по сравнению с другими группами. Разница высокодостоверна (P<0,001).

При этом, высокий выход сырого гонадотропина показали сыворотки, полученные от доноров со сроком жеребости 60-75 дней, а низкий показатель отмечен в сыворотке доноров со сроком жеребости 40-45 дней.

Различия по выходу сырого гонадотропина между этими группами высокодостоверна.

Идентичная тенденция установлена по выходу сырого гонадотропина из сыворотки крови доноров с разными сроками жеребости (таблица 2).

Таблица 2- Выход сырого гонадотропина из сыворотки крови доноров с разными сроками жеребости

Возраст доноров	I-способ	II-способ	Всего
	M±m	M±m	M±m
40	802,6±32,54	722,7±36,8	762,7±26,52
45	851,7±37,03	850,2±41,5	851,0±27,85
50	925,5±40,6	911,6±45,3	918,5±30,50
55	944,5±58,2	969,5±46,5	957,0±37,42
60	1050,4±48,0	1073,9±61,3	1062,1±39,07
65	1115,5±40,9	1112,1±52,7	1113,8±33,40
70	1042,5±44,2	1081,6±50,0	1062,1±33,75
75	992,9±52,9	1041,7±60,2	1017,3±40,57
80	969,2±44,8	972,1±51,0	970,7±33,95
В среднем	965,0±18,7	970,6±21,8	967,8±14,2

Так, например, выход сырого гонадотропина из сыворотки крови доноров в зависимости от их сроков жеребости в первом способе составил в пределах от 802,6±32,54 мг до 1115,5±40,90 мг, а во втором способе – от 722,7±36,8 мг до 1112,1±52,7 мг.

В целом, между использованными методами получения сырого гонадотропина достоверных отличий не установлено. В среднем всего получено 139,364 г сырой массы гонадотропина.

Однако, следует отметить, что значительное влияние на выход сырого гонадотропина оказали сроки жеребости кобыл-доноров.

Выводы

Наибольший выход сырого гонадотропина получен из сыворотки, полученной от 3-5-и летних кобыл-доноров со сроком жеребости 65-80 дней и не зависимо от способов их получения в среднем составил от 1569 до 2360 мг, а минимальный выход показала сыворотка, полученная от кобыл-доноров со сроком жеребости 40-45 дней.

Выход сырой массы гонадотропина из сыворотки, полученной от доноров 6-8 лет со сроком жеребости 60-70 дней составил от 2204 мг до 2471 мг.

Высокий выход сырого гонадотропина показали сыворотки, полученные от доноров в возрасте 9-10 лет со сроком жеребости 55-65 дней. Выход сырого гонадотропина колебался в пределах от 2021 мг до 2334 мг.

Таким образом, на выход сырого гонадотропина, использованные способы существенного влияния не оказали, значительное влияние оказали возраст и сроки жеребости кобыл-доноров.

Литература

1. Бекетауов О., Алибаев Н.Н., Адилбеков Н. Биологические свойства СЖК в зависимости от дней жеребости донора-производителя //Проблемы экологии, аридного кормопроизводства и животноводства в Казахстане: матер. межд. науч.-практ. конф.-Шымкент: 2009. -С.221-222

2. Клинский Ю.Д. К вопросу о гормональной активности СЖК.-Овцеводство. – 1967. - №6. – С.24-27.

3. Падучева А.Л. Гормональные методы повышения плодовитости сельскохозяйственных животных.-Москва:Колос,1965.-с35-43.
4. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология.- Москва: Высшая школа, 2003.-с.191-195
5. Murphy BD (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. Centre de Recherche en Reproduction Animal, Faculté de Médecine Vétérinaire
6. Алибаев Н., Бекетауов О. Сущность проблемы сохранения генетических ресурсов каракульской породы овец, Алматы, 2002, №12, С.11-12.
7. Allen, W.R. A quantitative immunological assay for pregnant mare serum gonadotrophin.- J. Endocrinol. – 1969. - №43. – p. 581-591.
8. Омбаев А.М. О сохранении генофонда каракульских овец в Казахстане //Сборник научных трудов КазНИИК, Алматы, 1998, Т.22, С.3-7.
9. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии. Москва 1980

Абай Г., Алибаев Н.Н., Бекетауов О.

ШИКІ ГОНАДОТРОПТЫ ГОРМОННЫҢ АЛЫНУЫ

Шикі гонадотропинның шығуына буаз биелердің жасы мен буаздылығы маңызды ықпал етеді. Шикі гонадотроптың ең көп түсімі буаздық мерзімі 65-80 күн аралығындағы 3 және 5 жастағы донор-биелерінен, орташа есеппен 1569-нан 2360 миллиграммға дейін келді, ең төмен түсімі буаздық мерзімі 40-45 күн аралығындағы сарысу көрсетті.

Шикі гонадотроптың түсімі буаздық мерзімі 60-70 күн аралығында орташа есеппен 1569-нан 2360 миллиграммға дейін болды.

Жоғарғы шикі гонадотроптың түсімі буаздық мерзімі 55-65 күн аралығындағы 9 және 10 жастағы донор-биелерінің сарысуы көрсетті. Шикі гонадотроптың түсімі орташа есеппен 2021-нан 2334 миллиграммға дейін болды

Сөйтіп, шикі гонадотропинның шыға берісіне қолданған әдістер емес, буаз биелердің жасы мен буаздылығы маңызды ықпал етеді.

Кілт сөздер: буаз биелердің сарысуы, гонадотропин, буаз биелер, донор.

G. Abai, N.N. Alibaev, O. Beketauov

RECEIVING THE CRUDE GONADOTROPNY HORMONE

The greatest exit of a crude gonadotrophin is comes from the serum received from 3-5 years donor pregnant mares of 65-80 days and isn't dependent on ways of their receiving averaged from 1569 to 2360 mg, and the serum received from donor mares with term of a pregnant of 40-45 days showed the minimum exit.

The exit of crude mass of a gonadotrophin made of the serum received from donors of 6-8 years with term of a pregnant of 60-70 days from 2204 mg to 2471 mg.

The serums received from donors at the age of 9-10 years with term of a pregnant of 55-65 days showed a high exit of a crude gonadotrophin. The exit of a crude gonadotrophin fluctuated ranging from 2021 mg to 2334 mg.

Thus, on an exit of the crude gonadotrophin, the used ways had no essential impact, the age and terms of a pregnant of donor mares had considerable impact.

Keywords: pregnant mare serum (PMS), gonadotrophin, pregnant mares, donor.