

С. В. Федотов, Е. Е. Олейникова, С. Г. Яковлев, Е. А. Муха

## Определение репродуктивного потенциала у ремонтных телок

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

С целью установления гормонального статуса телок-фримартинов в сыворотке крови определены концентрации половых гормонов (прогестерон, эстрадиол-17 $\beta$ , тестостерон) и антимюллера гормона (АМГ).

Проведённые исследования уровня АМГ с помощью иммуноферментного анализа в сыворотке крови доказали возможность ранней оценки фертильности у телок. Этот метод позволит провести раннюю выбраковку телок-фримартинов из продуктивного стада. Изучение уровня АМГ показало, что его количество напрямую коррелирует с фертильностью крупного рогатого скота вне зависимости от периода эстрального цикла. При концентрации АМГ в сыворотке крови ниже 100 пг/мл телки не способны к плодотворному осеменению, тогда как высокий уровень антимюллера гормона (более 380 нг/мл) позволяет успешно оплодотворять животных с первой попытки. Весь клинически здоровый полученный при одноплодной стельности ремонтный молодняк был успешно осеменен. При сниженных концентрациях антимюллера гормона телки-фримартинки оказались бесплодными даже после проведения гормональной стимуляции (Co-Synx) и введения спермодоз без клинического проявления половой охоты.

Введение тестирования на уровень АМГ методом ИФА в обязательную гинекологическую диспансеризацию крупного рогатого скота в животноводческих предприятиях является целесообразным и эффективным.

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

**Авторы:**

**Федотов Сергей Васильевич** — доктор ветеринарных наук; e-mail: serfv@mail.ru;

**Олейникова Елена Евгеньевна** — аспирант; e-mail: serfv@mail.ru;

**Яковлев Сергей Гарриевич** — студент; e-mail: serfv@mail.ru;

**Муха Евгения Александровна** — студентка; e-mail: serfv@mail.ru.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина»; 109472, Россия, Москва, ул. Академика Скрябина, 23.

**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 [1].

При постановке диагноза ветеринарные специалисты должны исключить все формы временного или постоянного бесплодия, в т. ч. врожденные аномалии (инфантилизм, фримартинизм, уродства и т.д.) [2].

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 системы. Мужские гормоны начинают образовываться раньше, и при поступлении их в организм телочки происходит подавление

ние фертильности. Такие телки, как правило, остаются бесплодными, у них наблюдается мужской тип развития [3].

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

Для этого, наряду с клиническими методами, необходимо использовать и лабораторную диагностику, в частности определение уровня антимюллерова гормона (АМГ). Антимюллеров гормон является одним из основных индикаторов нормального функционирования половых желез [4, 5].

В организме самки АМГ продуцируется гранулезными клетками растущих фолликулов от стадии первичных, достигая максимума в малых антральных, и практически исчезает в фолликулах, приближенных к граафову пузырьку [6–8].

Антимюллеров гормон является маркером яичникового резерва. Биологические эффекты АМГ реализуются при действии на серин/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 [9].

По данным некоторых авторов [10], антимюллеров гормон или Мюллер-ингибирующий гормон способен снижать чувствительность гранулезных клеток яичников к фолликулостимулирующему гормону, задерживая фолликулы на стадии малых антральных. Такое заключение позволяет нам определить тест на уровень АМГ в сыворотке крови крупного рогатого скота как информативный.

**Цель исследований** — определение фертильности телок-фримартин по уровню антимюллерова гормона.

**Материалы и методы.** Экспериментальные работы проводились на кафедре диагностики болезней, терапии, акушерства и репродукции животных ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени 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 голов.

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 робота-подъемника 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 In-Herd.

Объектами исследований были телки-фримартин и клинически здоровые телки, рожденные в 2018–2019 гг. Для определения концентрации АМГ использовали сыворотки крови телок. Отбор крови производился из хвостовой вены вакуум-содержащими системами BD Vacuutainer. Центрифугировали при 2500 оборотах в течение 10 минут, далее алиquotировали сыворотку крови и исследовали ее методом иммуноферментного анализа.

Для постановки ИФА мы использовали тест «Ansh Labs bovine AMH» 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 минут при комнатной температуре на шейкере встряхивали со скоростью 600–800 об/мин. Затем промыли 5 раз раствором А1 и добавили 100 мкл RTH-конъюгата антитело-биотин АМГ в каждую лунку.

В течение 60 минут 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 минут 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 АМГ в сыворотке крови телок-фримартин.

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

**Результаты и 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 $\beta$ , тестостерон) и АМГ (табл. 1).

Из таблицы 1 видно, что содержание эстрадиола 17 $\beta$  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 фримартин 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 фримартин было примерно одинаковое —  $1,0 \pm 0,6$  против  $1,3 \pm 0,4$  нМ/л.

В свою очередь, уровень АМГ у телок-фримартин 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-фримартин. При этом мы применяли систему SCR Heatime<sup>®</sup> Н, основанную на непрерывном контроле за двигательной активно-

стью 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-фримартин мы не наблюдали стадию возбуждения, и, соответственно, они остались яловыми.

Изучение уровня АМГ показало, что его количество напрямую коррелирует с фертильностью крупного рогатого скота вне зависимости от периода эстрального цикла.

Так, при достаточно высоких концентрациях АМГ ( $378,5 \pm 12,8$  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 антимюллера гормона телки-фримартин 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 антимюллера гормона (более 380 пг/мл) позволяет успешно оплодотворять животных с первой попытки.

**Закключение.** 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.

**Таблица 1. Репродуктивная способность и концентрация половых гормонов в сыворотки крови телок-фримартин и клинически здоровых ремонтных телок (n=15)**

| Показатели                                 | Молодняк крупного рогатого скота |                           |
|--------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
|                                            | Телки-фримартин                  | Клинически здоровые телки |
| Антимюллеров гормон, (пг/мл)               | $94,7 \pm 14,1$                  | $378,5 \pm 12,8$          |
| Прогестерон, нМ/л                          | $1,0 \pm 0,6$                    | $1,3 \pm 0,4$             |
| Эстрадиол 17 $\beta$ , пМ/л                | $41,8 \pm 10,1$                  | $100,8 \pm 11,9$          |
| Тестостерон, нМ/л                          | $2,8 \pm 0,5$                    | $1,2 \pm 0,5$             |
| Оплодотворение после 1 осеменения, гол / % | —                                | 12/80,0                   |
| Оплодотворение после 2 осеменения, гол / % | —                                | 2/13,3                    |
| Оплодотворение после 3 осеменения, гол / % | —                                | 1/ 6,7                    |
| Не оплодотворилось, гол / %                | 15/100                           | —                         |

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

### Литература

1. Федотов С. В. Симптоматическое бесплодие коров, вызванное половыми инфекциями / С. В. Федотов, В. П. Дегтярев, Г. М. Удалов // Ветеринария. — 2015. — № 5. — С. 36–39.
2. Федотов С. В. Диагностика и профилактика симптоматического бесплодия у коров / С. В. Федотов, Н. С. Белозерцева, И. М. Яхаев // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. — 2016. — № 11. — С. 118–123.
3. Авдеенко В. С. Биотехника воспроизводства с основами акушерства животных // В. С. Авдеенко, С. В. Федотов. — М.: Инфра-М. 2016. — 455 с.
4. Durlinger A. L. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary / A. L. Durlinger, M. J. Gruijters, P. Kramer [et al.] // Endocrinology. — 2002. — Vol. 143. — P. 1076–1084.
5. Yang M. Y. Anti-Mullerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles / M. Y. Yang, R. A. Cushman, J. E. Fortune // Mol Hum Reprod. — 2017. — Vol. 2. — P. 282–291.
6. Pellatt L. Granulosa cell production of anti-Mullerian hormone is increased in polycystic ovaries / L. Pellatt, L. Hanna, M. Brincat [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metabol. — 2007. — Vol. 92. — P. 240–245.
7. Nilsson E. E. Inhibitory Actions of Anti-Mullerian Hormone (AMH) on Ovarian Primordial Follicle Assembly / E. E. Nilsson, R. Schindler, M. I. Savenkova, M. K. Skinner // PLoS One. — 2011. — Vol. 6. — № 5. — P. 20087.
8. Kavya K. M. Anti-Mullerian hormone and antral follicular count in early and delayed pubertal Murrah buffalo heifers / K. M. Kavya, R. K. Sharma, A. Jerome, S. K. Phulia, I. Singh // Livestock Science. — 2017. — № 198. — P. 89–92.
9. Fleming R. Metformin reduces serum Mullerian-inhibiting substance levels in women with polycystic ovary syndrome after protracted treatment / R. Fleming, L. Harborne, D. T. MacLaughlin [et al.] // Fertility and Sterility. — 2005. — Vol. 83. — P. 130–136.
10. Grossman M. Müllerian inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture / M. Grossman, S. Nakajima, M. Fallat, Y. Siow // Fertility and Sterility. — 2008. — Vol. 89. — P. 1364–1370.

---

Fedotov S., Oleinikova E., Yakovlev S., Mukha E.

## Determining the reproductive potential of repair heifers

**Abstract.** *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 heifers with subsequent culling of problem heifers will help reduce direct economic losses in breeding dairy cattle. When making a diagnosis, veterinarians should exclude all forms of temporary or permanent infertility, including Congenital anomalies (infantilism, freemartinism, deformities, etc.).*

*In order to establish the hormonal status of heifers-freemartin in the blood serum, the concentration of sex hormones (progesterone, estradiol-17 $\beta$ , and testosterone) and anti-Müllerian hormone (AMH) was determined.*

*Studies of the level of AMH using an enzyme-linked immunosorbent assay in blood serum have proven the possibility of early assessment of fertility in heifers. This method will allow early culling of Freemartin heifers from a productive herd. The study of AMH levels showed that its amount directly correlates with fertility in cattle, regardless of the period of the estrous cycle. When the concentration of AMH in the blood serum is below 100 pg / ml, heifers are not capable of fruitful insemination, while a high level of anti-Müllerian hormone (more than 380 ng / ml) makes it possible to successfully fertilize animals on the first attempt. All clinically healthy replacements obtained during a single pregnancy were successfully inseminated. At low concentrations of anti-Müllerian hormone, Freemartin heifers were sterile, even after hormonal stimulation (Co-Synx) and sperm doses were administered without clinical manifestation of sexual desire.*

*The introduction of testing for the level of AMH by the ELISA method in the mandatory gynecological clinical examination of cattle in livestock enterprises is expedient and effective.*

**Key words:** anti-muller hormone, heifers-fremartin, infertility, cattle, sex hormones.

*Authors:*

**Fedotov S.** — Dr. Habil. (Vet. Sci.); e-mail: serfv@mail.ru;

**Oleinikova E.** — post-graduate student; e-mail: serfv@mail.ru;

**Yakovlev S.** — student; e-mail: serfv@mail.ru;

**Mukha E.** — student; e-mail: serfv@mail.ru.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MBA named after K.I. Scriabin; 109472, Russia, Moscow, St. Academician Scriabin, 23.

## References

1. Fedotov S. V. Symptomatic infertility of cows caused by sexually transmitted infections / S. V. Fedotov, V. P. Degtyarev, G. M. Udalov // *Veterinary Medicine*. — 2015. — № 5. — P. 36–39.
2. Fedotov SV Diagnostics and prevention of symptomatic infertility in cows / S. V. Fedotov, N. S. Belozertseva, I. M. Yakhaev // *Bulletin of the Altai State Agrarian University*. — 2016. — № 11. — P. 118–123.
3. Avdeenko V. S. Biotechnics of reproduction with the basics of animal obstetrics // V. S. Avdeenko, S. V. Fedotov. — M.: Infra-M. 2016. — 455 p.
4. Durlinger A. L. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary / A. L. Durlinger, M. J. Gruijters, P. Kramer [et al.] // *Endocrinology*. — 2002. — Vol. 143. — P. 1076–1084.
5. Yang M. Y. Anti-Mullerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles / M. Y. Yang, R. A. Cushman, J. E. Fortune // *Mol Hum Reprod*. — 2017. — Vol. 2. — P. 282–291.
6. Pellatt L. Granulosa cell production of anti-Mullerian hormone is increased in polycystic ovaries / L. Pellatt, L. Hanna, M. Brincat [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* — 2007. — Vol. 92. — P. 240–245.
7. Nilsson E. E. Inhibitory Actions of Anti-Mullerian Hormone (AMH) on Ovarian Primordial Follicle Assembly / E. E. Nilsson, R. Schindler, M. I. Savenkova, M. K. Skinner // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6. — № 5. — P. 20087.
8. Kavya K. M. Anti-Mullerian hormone and antral follicular count in early and delayed pubertal Murrah buffalo heifers / K. M. Kavya, R. K. Sharma, A. Jerome, S. K. Phulia, I. Singh // *Livestock Science*. — 2017. — № 198. — P. 89–92.
9. Fleming R. Metformin reduces serum Mullerian-inhibiting substance levels in women with polycystic ovary syndrome after protracted treatment / R. Fleming, L. Harborne, D. T. MacLaughlin [et al.] // *Fertility and Sterility*. — 2005. — Vol. 83. — P. 130–136.
10. Grossman M. Miillerian inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture / M. Grossman, S. Nakajima, M. Fallat, Y. Siow // *Fertility and Sterility*. — 2008. — Vol. 89. — P. 1364–1370.