

На правах рукописи

АНИПЧЕНКО ПОЛИНА СЕРГЕЕВНА

**ВЛИЯНИЕ L-КАРНИТИНА НА КАЧЕСТВО СПЕРМЫ
ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

06.02.06 – ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена на кафедре акушерства и оперативной хирургии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГАВМ)

Научный руководитель **Племяшов Кирилл Владимирович**,
член-корреспондент РАН, доктор ветеринарных наук, профессор

Официальные оппоненты: **Федотов Сергей Васильевич**,
доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры диагностики болезней, терапии, акушерства и репродукции животных ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Корнеенко-Жиляев Юрий Алексеевич,
кандидат биологических наук, директор ООО «ВЕНЕРА-ВЕТ»

Ведущая организация: **ФГБОУ ВО "Вятская государственная сельскохозяйственная академия"**

Защита диссертации состоится «30» июня 2020 года в 11.00 ч. на заседании диссертационного совета Д 220.059.04 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, Черниговская ул., 5, тел/факс: 8(812)388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5, и на официальном сайте: <https://www.spbgavm.ru>.

Автореферат размещен на сайтах: ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации: <https://vak.minobrnauki.gov.ru> «24» апреля 2020 г. и ФГБОУ ВО СПбГАВМ: <http://www.spbgavm.ru> «24» апреля 2020 г.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Иванова Ирина Викторовна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время вопрос продовольственной безопасности Российской Федерации нельзя недооценивать. Обеспечение населения страны высококачественными продуктами питания – главная задача аграрного сектора России. Для реализации этих целей важно поддерживать высокий уровень животноводства в стране. На данный момент для обеспечения должного количества продукции активно ведутся закупки сельскохозяйственной продукции из-за рубежа (Амерханов Х.А., 2007,2009; Племяшов К.В.,2015; Кузнецов А.Ф. и соавт. 2016).

Прогресс в сфере животноводства невозможен без грамотной организации воспроизводства животных. Большое внимание уделяется генетическому отбору и подбору пар, здоровью самок и контролю за их физиологическим состоянием ввиду необходимости своевременного их введения в хозяйственную эксплуатацию. Следует уделять большое внимание сбалансированному кормлению и надлежащему содержанию животных и качеству спермопродукции, получаемой от них. На сегодняшний день на территории России осуществляют свою деятельность 24 племенных предприятия, реализующие сперму быков-производителей. Среднее количество содержащихся на них животных составляет в среднем от 80 до 120 голов. Ввиду небольшого количества быков, их высокой стоимости и больших затрат на содержание получение от каждого быка качественной спермы с целью ее дальнейшей продажи остается актуальным по настоящее время. В данной работе изучали влияние биологически активных препаратов в составе разных схем с целью коррекции качества спермы производителей. Разработка методов коррекции показателей качества спермопродукции самцов являлась предметом исследований большого количества ученых (Абонеев В.В. и др., 2003,2008; Айбазов М.М. и др., 2013; Аксенова П.В. и др., 2012; Андреев Г.М. и др., 2015; Плешаков В.А., 2004; Лебедева Л.Ф.,2015; Zhai W. et al., 2008; Kaеoket K., 2010).

Одним из наиболее актуальных вопросов настоящего времени является оценка эффективности использования биологически активных и комплексных минеральных препаратов для коррекции качества спермопродукции самцов-производителей.

Степень разработанности темы. Исследования влияния витаминно-минеральных препаратов с профилактической целью для повышения качества спермы самцов является предметом изучения ряда исследователей (Герасимова Л.В. и др., 2012; Безуглова О.С. и др., 2016; Нарбай Б.А. и др., 2014; Иванов А.А. и др., 2014; Клинский Ю.Д., 2014; Tajir A et al., 2017) В отечественной и зарубежной литературе имеются сообщения об использовании L- карнитина в качестве криопротектора (Сидоренко Р.П. и др., 2009; Inskeep P. Et al., 1982). Большое количество исследователей изучали вопросы биологической роли данного вещества, в том числе как возможную составляющую схем терапии мужского бесплодия (Виноградов И.В. и др., 2014,2018; Ефимова Е.В. и др.,

2002; Ефремов Е.А., 2015; Копелевич В.М. и др., 2005; Нашивочникова Н.А. и др., 2014; Павлов В.Н., 2012; Верткин А.Л. и др., 2012; Кремнецкая Т.В. и др., 2001; Matalliotakis I. Et al., 2000; Sheikh N. Et al., 2007; Lenzi A., et al., 2003; Dunning K., et al., 2012, 2014; Brooks D., et al., 1979; Mingorance C., et al., 2011; Bremer J. Et al., Agarwal, A., et al., et al. 2018).

Однако, вопросы оценки влияния препарата «L- карнитин» в составе моно- и комплексного режима на целостность структуры сперматозоидов, показатели их моторики остаются актуальными и являются недостаточно изученными. Таким образом, необходимость проведения исследований по теме данной диссертационной работы аргументирована с теоретической и практической точки зрения.

Цель и задачи исследования. Оценить эффективность использования препарата «L-карнитин» в целях повышения качества спермопродукции самцов-производителей в составе моно режима и при сочетанном применении с витаминно-минеральным комплексом «Гемобаланс». Для достижения поставленной цели в ходе исследования решались следующие задачи:

1. Оценить эффективность применения препарата «L-карнитин» в экспериментальных дозировках;
2. Провести анализ причин снижения качества спермы быков-производителей, содержащихся в племенном предприятии;
3. Изучить клинический, биохимический статус организма самцов-производителей;
4. Оценить эффективность влияния препаратов «L- карнитин» и витаминно-минерального комплекса «Гемобаланс» на качество свежей спермы производителей;
5. Изучить качественные показатели замороженной спермы производителей при оттаивании у самцов, участвующих в эксперименте;
6. Провести расчет экономической эффективности при использовании одного препарата «L- карнитин» и применение его в комплексе с «Гемобаланс».

Научная новизна работы. Впервые проведено исследование, позволившее получить данные об эффективности применения инъекционной формы препарата «L-карнитин» в качестве моно режима и при комплексном применении совместно с полиминеральным препаратом «Гемобаланс» при коррекции качества спермы быков-производителей.

Впервые изучено морфофизиологическое состояние сперматозоидов при применении данных препаратов: количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным и патологическим видом движения; скорость движения сперматозоидов; линейность движения; показатель площади головки; получены данные о количестве клеток с фрагментированным ДНК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенные исследования дают более полную картину о влиянии «L-карнитин» на процессы моторики сперматозоидов и основные критерии, отражающие качество спермы производителей. Практическая значимость работы заключается в исследовании эффективности применения раствора «L-карнитин» и «Гемобаланс» с целью

повышения качества спермы. Результаты исследования могут быть использованы в работе ветеринарных врачей и специалистов-биологов, задачей которых служит разработка мероприятий по коррекции качества спермопродукции.

Материалы работы внедрены в учебный процесс кафедры акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», кафедры зоогиены, физиологии и биохимии ФГБОУ ВО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», кафедры анатомии, акушерства и хирургии ФГБОУ ВО «Самарский государственный аграрный университет».

Методология и методы исследования. Экспериментальная часть работы выполнена согласно общепринятой методологии организации опыта. Животные были подобраны по принципу условных аналогов из числа самцов-производителей с низким качеством спермы. Объектом исследования служили образцы спермы, пробы крови быков-производителей, баранов-производителей. При выполнении работы применяли гематологические, биохимические, лабораторные методы исследования, осуществляли статистическую обработку данных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эффективность влияния препарата «L-карнитин» при моно режиме использования и в комплексе с «Гемобаланс» на основные параметры качества спермы;
2. Коррекция биохимического статуса организма самцов при использовании препаратов «L-карнитин» и «Гемобаланс»
3. Влияние препаратов «L-карнитин» и «Гемобаланс» на динамику движения криоконсервированных сперматозоидов после их оттаивания;
4. Экономическая эффективность применения «L-карнитина» в качестве моно – и комплексного режима.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения проведенных исследований одобрены и доложены на ежегодной международной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины» (2018), всероссийской научно-практической конференции «Современные научно-практические решения в АПК» (г. Тюмень, 2017), ежегодной конференции европейского общества репродукции домашних животных ESDAR 2018 (г. Кордоба, Испания, 2018), ежегодной конференции американского общества наук о животных (г. Остин, США, 2019).

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 3 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 2 публикации - в журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.

Личный вклад. Результаты по самостоятельному анализу, выявлению причин снижения качества спермы, получаемой от быков, содержащихся на племенном предприятии, подготовке и анализу проб оттаянной спермы,

статистической обработке полученных результатов, проведении корреляционного анализа, формулировке выводов и предложений получены автором лично. Общий объем публикаций составляет 2,65 условных печатных листа, из них 1,75 принадлежит лично соискателю.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и включает в себя 21 рисунок, 17 таблиц. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения результатов собственных исследований, заключения, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 158 источников, в том числе 42 иностранных.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в период с 2016 по 2019 г.г. на кафедре акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины». Исследования проводили на базе вивария и кафедры акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО СПбГАВМ, на базе племенных предприятий центрального региона России, согласно схеме, представленной на рисунке 1.

Первая часть исследований по определению эффективности применения раствора карнитина в дозировке 1 мл/10 кг представляла собой две серии опытов. Предметом исследований служили пробы эякулята, полученные от баранов-производителей романовской породы (n=6). Сперму от баранов-производителей получали в условиях вивария на искусственную вагину. Режим полового использования представлял получение сдвоенных эякулятов 4 раза в неделю (интервал между 1 и 2 эякулятом составлял 15 минут). Первая серия опытов заключалась в получении эякулята в течение двух недель. После предоставления животному отдыха, проводили внутримышечное введение животному раствора «L-карнитин» (производитель Natur Vet, Австралия) в дозе 1 мл/10 кг. Кратность применения препарата составила 2 инъекции в неделю на протяжении четырёх недель. Вторая серия опытов заключалась в исследовании проб спермы, начиная с третьей недели после начала курса применения раствора «L-карнитин». Пробы свежей спермы баранов-производителей (32 образца) исследовали на базе лаборатории кафедры акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО СПбГАВМ. Исследование полученных проб проводили следующими методами: оценка качества спермы по внешним признакам, микроскопическое исследование спермы на густоту и активность сперматозоидов, определение процента живых сперматозоидов путем их прижизненной окраски водным 5% раствором эозина, оценка спермы по редукции метиленового синего (0,01% р-р), определение концентрации сперматозоидов в камере Горяева.

Вторая часть исследований проводилась нами в 2017 г на базе племенного предприятия 1. Целью исследования служило определение эффективности «L-карнитин» в дозировке 1 мл/30 кг живой массы. Перед

началом исследований была сформирована подопытная группа животных. Животные были подобраны по принципу условных аналогов из числа самцов-производителей с низким качеством спермы. Быкам подопытной группы (n=3) вводили раствор «L-карнитин» внутримышечно из расчёта 1 мл на 30 кг массы тела животного дважды в неделю на протяжении месяца. Исследовали пробы спермы, полученные от испытуемых животных за месяц до начала применения «L-карнитин» и на протяжении проведения опыта по общепринятым методикам определения качества свежеполученной спермы.

Также нами был организован расширенный производственный опыт на базе племенного предприятия 2. Были сформированы 2 подопытные и контрольная группа быков-производителей голштинской породы. Животные были подобраны по принципу условных аналогов. В опыте участвовали быки в возрасте 3-5 лет с низкой активностью свежего спермы (менее 70%) и с низкой концентрацией сперматозоидов (менее 0,8 млрд/мл).

В первой подопытной группе быкам (n=5) производилось внутримышечное введение раствора «L-карнитин» в дозе 1 мл на 30 кг массы тела животного дважды в неделю на протяжении 2х месяцев. Быкам второй подопытной группы (n=5) внутримышечно инъецировали раствор «L-карнитин» в дозе 1 мл на 30 кг массы тела животного дважды в неделю на протяжении 2х месяцев. Также самцам этой группы внутримышечно вводили «Гемобаланс» в дозе 1 мл на 45 кг живой массы, дважды в неделю на протяжении 1 месяца. Третья группа быков (n=5) служила контролем. Препараты данным животным не вводились. Режим половой нагрузки быков: 2 сдвоенных садки в неделю.

Объектом исследования служили 840 проб нативной спермы и 360 проб кроиконсервированной спермы в пайетах, пробы крови быков-производителей.

Пробы свежей спермы быков-производителей исследовали на базе лабораторий племенного предприятия. Исследовали пробы спермы, полученные от испытуемых животных до начала применения препаратов, на протяжении проведения опыта и на протяжении трех месяцев после окончания опыта. Анализировали количество эякулятов, количество выбракованных эякулятов, объем эякулятов, концентрацию сперматозоидов в 1 мл.

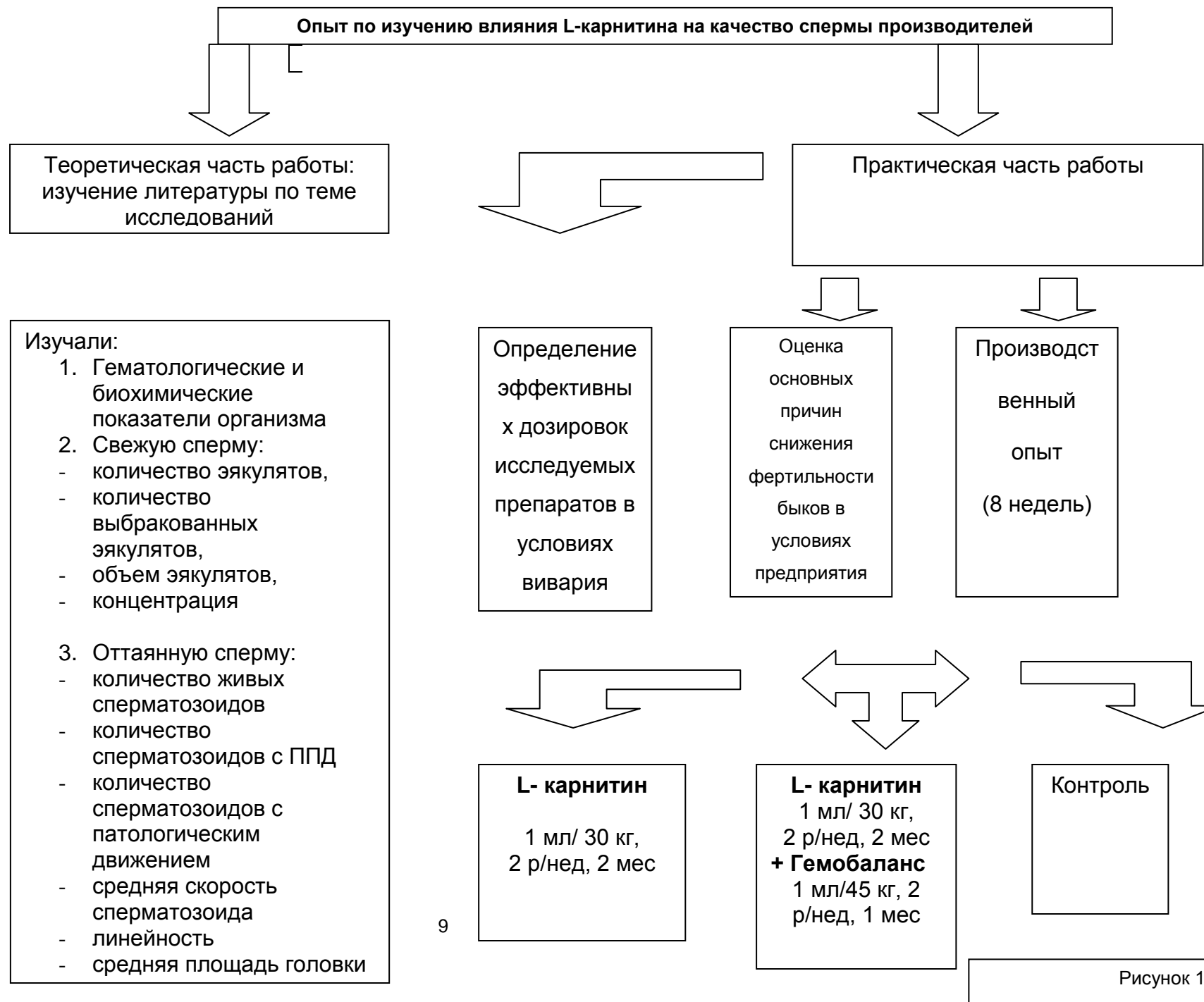
Пробы оттаянной спермы исследовали на базе лаборатории кафедры акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО СПбГАВМ. После оттаивания спермы исследовали морфологические показатели сперматозоидов: количество живых сперматозоидов (проба по Морозову), количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением, количество сперматозоидов с патологическим движением, средняя скорость сперматозоида, линейность, средняя площадь головки. Морфологические показатели спермы исследовали в камере Маклера. Анализ данных производили с использованием компьютерного пакета «CASA- Аргуссофт» (Россия) и микроскопа «Микромед 3 вар. 3-20М».

Для определения фрагментации ДНК был использован метод, основанный на дисперсии хроматина Sperm Chromatin Dispersion (SCD) (Fernández et. al., 2003). Пробы готовили с использованием промышленного набора реактивов «Assist kit». Вычисляли индекс фрагментации ДНК спермы

DFI (DNA Fragmentation Index), представляющий процент фрагментированных сперматозоидов (малый ореол, без ореола).

Пробы крови исследовались в лаборатории Ленинской ветеринарной станции Московской области по основным гематологическим и биохимическим показателям.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась в программе Microsoft Office Excel.



2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Определение эффективных дозировок исследуемых препаратов

Использование инъекционной формы «L-карнитин» для коррекции качества спермопродукции при применении данного препарата баранам-производителям дало положительные результаты. В исследуемых пробах спермы отмечалось увеличение концентрации сперматозоидов на 35%, повышение их активности, увеличение уровня дыхания на 38% и 46% при взятии сдвоенных эякулятов, в первом и втором эякуляте соответственно. Данные результаты свидетельствуют о значительном улучшении качественных показателей спермы, что дает нам основания для проведения более объемных исследований.

В результате проведения исследований, направленных на коррекцию качества спермы быков-производителей (в дозе 1 мл на 30 кг массы тела, 2 раза в неделю, курс – 1 месяц), установлено, что средний показатель объема эякулята увеличился на 44%; значение концентрации сперматозоидов в эякуляте быков возросло на 11% по сравнению с данным показателем в период до применения препарата. Данное исследование послужило основанием для включения инъекционной формы «L-карнитин» в схемы коррекции качества спермопродукции, полученной от производителей.

Однако, учитывая продолжительность сперматогенеза у быков (54 дня) целесообразным является применение раствора «L-карнитин» на протяжении двух месяцев.

2.2.2 Причины снижения качества спермы быков племенного предприятия

В результате проведения анализа возможных причин выбраковки спермы, полученной от быков, содержащихся в условиях племенного предприятия, были изучены условия содержания быков и правила взятия спермы.

Весь технологический процесс содержания быков-производителей и получения от них спермы с последующими технологическими этапами работы регулируется «Ветеринарными правилами содержания крупного рогатого скота в целях его воспроизводства, выращивания и реализации». Помещения и сооружения для содержания и использования быков соответствовали зоогигиеническим требованиям согласно «нормам технологического проектирования станций и пунктов искусственного осеменения животных» (НТП-АПК 1.10.07.003-02.).

При анализе результатов биохимического исследования сыворотки крови, нами сделан вывод о недостаточном уровне минерального кормления животных. Так, отмечалось снижение содержания в сыворотке крови цинка и меди. Уровень содержания магния находился на уровне нижней границы нормы.

Таблица 1 – Уровень содержания некоторых минеральных веществ в крови быков

Показатель	L-карнитин			L-карнитин+Гемобаланс			Контроль			Реф.значения
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Mg	0,7±0,04*	0,89±0,07	0,84±0,03*	0,83±0,03	0,83±0,08	0,85±0,05	0,74±0,06	0,91±0,18	0,79±0,06	0,7-1,2 ммоль/л
Cu	7,24±1,16*	7,12±1,31	8,94±0,62*	6,41±0,92*	8,12±0,95	9,14±0,39*	5,13±0,74	6,08±0,57	6,96±1,1	7-9 мкмоль/л
Zn	9,3±1,24	12,5±1,57	12,72±1,14	8,32±0,48	12,38±2,8	13,26±0,18	8,08±1,11	10,82±1,75	10,44±0,27	13-14 ммоль/л

Примечания: 1 – период до проведения опыта, 2 период проведения опыта, 3 – период после проведения опыта; *P <0,05

2.2.3 Результаты гематологического и биохимического исследования сыворотки крови быков

Согласно полученным результатам основные показатели белкового, углеводного и липидного обмена животных на момент начала проведения эксперимента и на его протяжении в опытных и контрольной группе находились в пределах референтных значений.

Однако стоит отметить изменения содержания в сыворотке крови быков некоторых микро- и макроэлементов (Таблица 1). В первой опытной группе (L-карнитин) содержания цинка в сыворотке крови в конце проводимого эксперимента возросло на 3,42 ммоль/л, что составило 26,9%, по сравнению с первым исследованием крови (с 9,3 до 12,72 ммоль/л). Во второй группе отмечалось увеличение показателя содержания цинка на 39,1% (на 4,92 ммоль/л) по сравнению со стартовым значением. Содержание цинка перед проведением эксперимента составляло 8,32 ммоль/л, на завершающей стадии – 13,26%. У животных контрольной группы уровень цинка по прошествии проведения исследований оставался на 19,7% ниже минимальной границы допустимых значений – 10,44 ммоль/л.

Данные положительные изменения уровня макро (Mg) и микро (Cu, Zn) указывают на нормализацию минерального обмена в организме быков, вызванного применением препарата органической кислоты (L-карнитин) и комплексного витаминно-минерального препарата «Гемобаланс».

2.2.4 Влияние применения препаратов «L-карнитин» и «Гемобаланс» на средний объем и количество выбракованных эякулятов

Динамика среднего объема эякулятов, полученных от быков-производителей, представлена на рисунке 2.

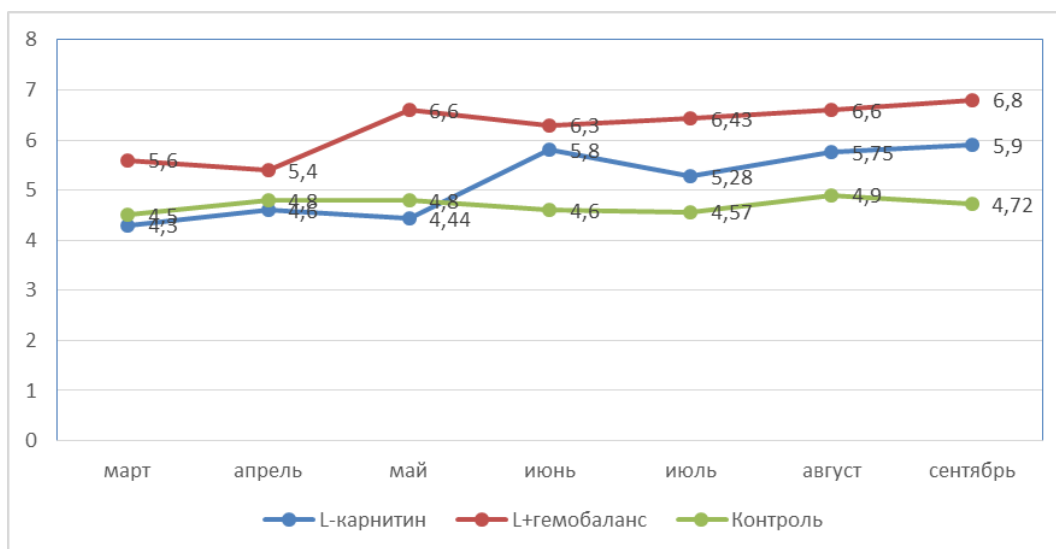


Рисунок 2 – Динамика среднего объема эякулятов быков, мл

В первой подопытной группе средние значения объема полученных эякулятов возросли на 0,67 мл в период проведения опыта по сравнению с предшествующими месяцами (март-апрель): с 4,45мл до 5,12 мл.

Показатель объема эякулята у быков первой подопытной группы (L-карнитин) возрос на 15% (май-июнь) и на 26,7% (июль-сентябрь) относительно среднего показателя объема эякулята в период, предшествующий проведению эксперимента. Отмечено увеличение среднего объема спермы во второй подопытной группе в период применения «L-карнитин» в сочетании с «Гемобаланс» на 17,2% относительно периода предшествующего проведению опыта. Относительно периода март-апрель, объем после завершения эксперимента увеличился на 20,1%. Данные, полученные при анализе объема эякулятов в контрольной группе, позволяет говорить об изменении среднего объема на 1% в период проведения опыта и на 1,7% в период после проведения эксперимента относительно объема эякулятов на начальном периоде исследований.

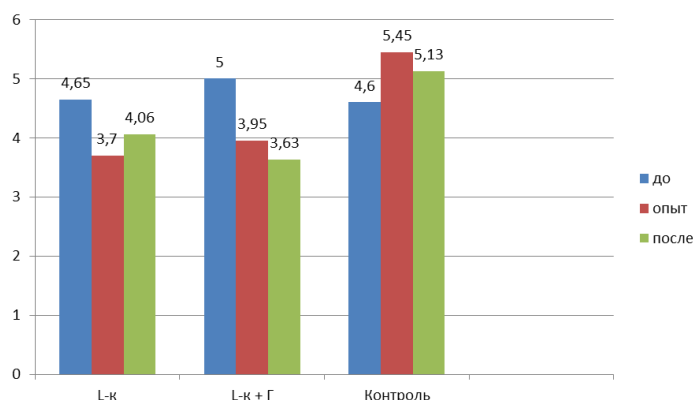


Рисунок 3 – Динамика количества выбракованных эякулятов, шт

Количество выбракованных эякулятов в 1 и 2 подопытной группе снизилось с 42,3% и 35,6%, в период перед началом проведения эксперимента, до 36,2% и 34,8% на момент окончания опыта (июнь) соответственно. Выбраковка проводилась по причине низкой концентрации спермы (менее 0,8 млрд/мл) и низкого процента сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в пробах свежей спермы (менее 70%). После завершения эксперимента (июль-сентябрь) данный показатель составил 34,6% и 32,3% в 1 и 2 группе соответственно. В контрольной группе доля выбракованных проб составила за период март-апрель: 50,3%; во время проведения опыта - 51,9%, после завершения опыта (июль-сентябрь) – 53,5%.

За исследуемый период (март-сентябрь) процент выбракованных эякулятов, полученных от быков 1 и 2 опытных групп снизился на 7,7% и 3,3% соответственно. В контрольной группе этот показатель возрос на 3,2 % в аналогичном периоде.

2.2.5 Динамика концентрации сперматозоидов

Концентрация сперматозоидов в пробах спермы быков первой подопытной группы достоверно не изменялась.

Концентрация спермы быков, которым инъецировались растворы «L-карнитин» и «Гемобаланс» возросла на 340 млн/мл. Данный показатель возрос на 35,7 % и составил 1,29 млрд/мл (рисунок 4).

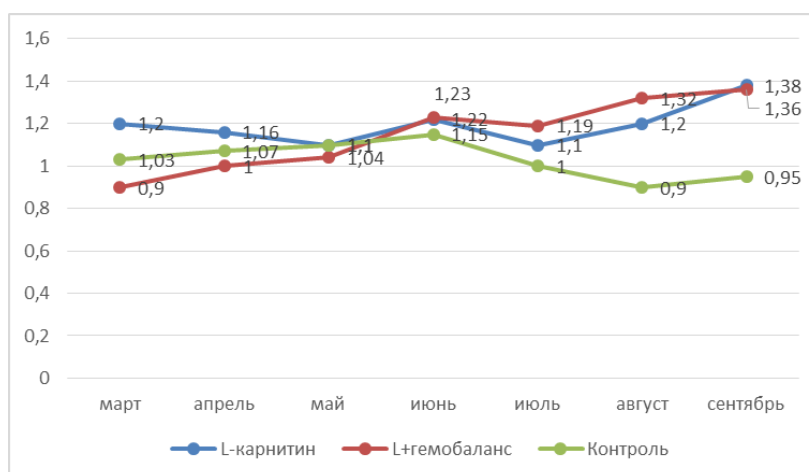


Рисунок 4 – Динамика концентрации сперматозоидов, млрд/мл

У животных, служивших контролем отмечали снижение концентрации спермы на 8,4% в период проведения опыта (май-июнь) по сравнению с значениями концентрации спермы в период предшествующий проведению эксперимента.

2.2.6 Количество живых сперматозоидов

Перед началом проведения опыта процент живых клеток в пробах спермы быков первой группы составил 62,7%, что на 14% больше количества

живых сперматозоидов в пробах спермы быков второй группы и на 7,3% больше, чем количество живых сперматозоидов на начало проведения исследований в группе-контроле (рисунок 5).

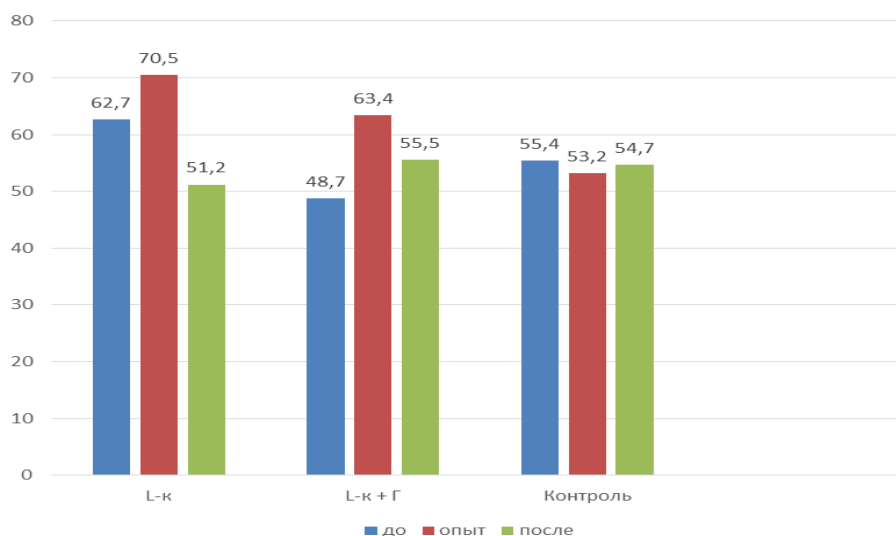


Рисунок 5 – Доля живых сперматозоидов, %

В период проведения опыта (май-июнь) описываемый показатель изменялся следующим образом: максимальная доля живых клеток отмечалась в пробах спермы быков первой подопытной группы: 70,5%, что на 7,1% больше данного показателя во второй подопытной группе и на 10,2% больше, чем показатель контрольной группы. Данный показатель в пробах спермы контрольной группы был на 17,3% ниже исследуемого показателя в первой подопытной группе, быкам которой, внутримышечно инъецировался раствор «L-карнитин».

В период с июля по сентябрь количество живых сперматозоидов в первой группе уменьшилось на 4,3% по сравнению со второй группой; и на 3,5% меньше, чем в группе-контроле.

2.2.7 Показатели морфобиологического состояния сперматозоидов в пробах оттаянной спермы

Показатель нормального движения клеток в пробах спермы первой группы составил 38,9% в период до применения препаратов, что на 6,2% меньше, чем в период проведения опыта в первой подопытной группе быков. Период после проведения эксперимента характеризовался снижением этого показателя на 2,04% относительно периода проведения исследований в первой опытной группе (с 43,06% до 45,1%). Относительно первоначального этапа анализа данных (март-апрель), показатель подвижности клеток изменился на 4,16% по сравнению с периодом июль-сентябрь (с 43,06% до 38,9%). Показатель патологического движения сперматозоидов в первой подопытной группе перед проведением опыта составил 41,65%, что на 4,55% больше

аналогичного показателя в период проведения исследований и на 4,85% больше, чем за период после проведения эксперимента

Таблица 2 – Показатели подвижности сперматозоидов

	Группы быков	ППД,%	Пат. движ, %
До применения препаратов	Опыт 1 (L-карнитин)	38,9±0,9	41,65±7,7
	Опыт 2 (Лкар.+Гемобаланс)	38,1±2,4	40,7 ± 1,5
	Контроль	37,7±2,2	49,1±6,2
Опыт	Опыт 1 (L-карнитин)	45,1±3,4	37,1±7,1
	Опыт 2 (Лкар.+Гемобаланс)	42,9±0,9	41,08±5,3
	Контроль	38,4±0,6	47,9±2,05
После применения препаратов	Опыт 1 (L-карнитин)	43,06±1,4	36,8±4,8
	Опыт 2 (Лкар.+Гемобаланс)	43,7±1	45,3±5,6
	Контроль	36,8±2,06	44,27±2,4

Во второй подопытной группе показатель процентного количества клеток, имеющих нормальное движение, изменился с 38,1% (март-апрель), до 42,9% (май-июнь) и до 43,7% (июль-сентябрь). Количество клеток, имеющих патологическое движение, в период март-апрель составило 40,7%, что на 0,38% меньше аналогичного показателя в период проводимых исследований. Данный показатель в период проведения опыта составил 41,08%, что на 4,22% меньше исследуемого показателя за период с июля по сентябрь. Количество клеток за период март-апрель было на 4,6% меньше, чем количество клеток, имеющих патологическое движение в период июль-сентябрь во второй подопытной группе. В период с марта по апрель показатель подвижности (прямолинейно-поступательное движение) в пробах спермы быков контрольной группы составил 37,7%, что на 0,7% больше показателя, полученного в период проведения эксперимента, и на 0,9% больше показателя подвижности сперматозоидов за июль-сентябрь. Количество сперматозоидов в пробах спермы самцов контрольной группы, имеющих патологическое движение, перед началом проведения исследований составило 49,1%, что на 1,2 % меньше данного показателя в период май-июнь (47,9%) и на 4,83% меньше, чем в период с июля по сентябрь.

В период предшествующий проведению эксперимента, средняя скорость перемещения головки сперматозоида в пробах спермы быков первой

подопытной группы была на 5,5 микрон/сек ниже, чем в пробах спермы быков контрольной группы и на 3,1 микрон/сек ниже, чем в пробах спермы быков второй подопытной группы. В процентном соотношении данное различие составило 27% и 15,2% относительно второй опытной группы и контроля соответственно (Рис 6).

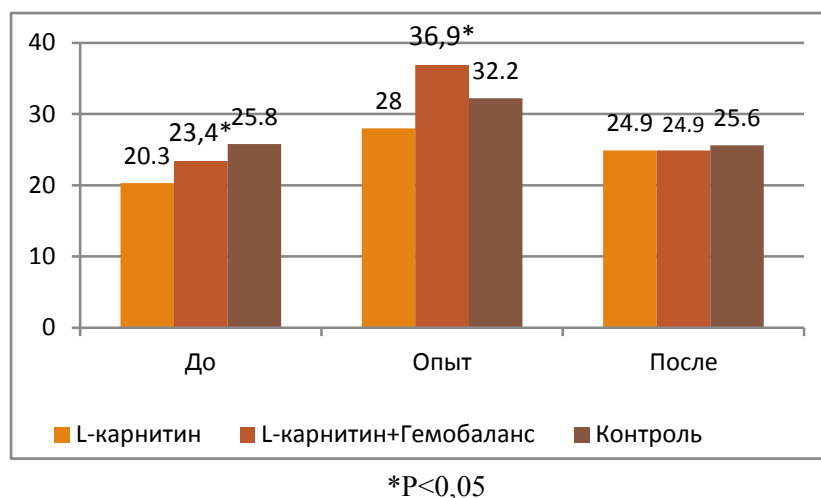


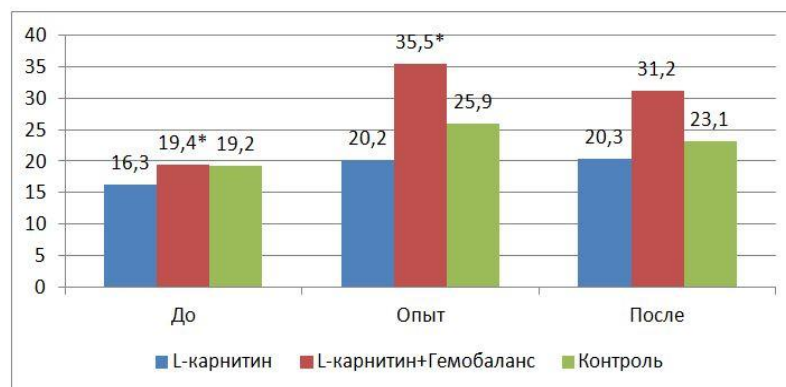
Рисунок 6 – Средняя скорость сперматозоидов, микрон/с

В период проведения эксперимента (с мая по июнь) значение показателя скорости сперматозоидов в первой группе составляло 28 микрон/сек, что на 31,7% было ниже, чем в группе животных, получавших оба препарата. Показатель скорости движения клеток в контрольной группе в описываемый период был на 14,5% ниже, чем во второй подопытной группе. После проведения исследования в первой и второй подопытной группе скорость перемещения сперматозоидов составила 24,9 микрон/сек, что на 2,8% ниже, чем в группе-контроле. Данное отклонение не является достоверным, так как равняется среднему отклонению значения скорости в данной группе. По сравнению с периодом проведения опыта средняя скорость движения сперматозоидов снизилась на 12,4% за период июль-сентябрь. С периода март-апрель по период июль-сентябрь скорость движения сперматозоидов снизилась на 22,6%. В пробах полученных от быков второй подопытной группы в период май-июнь показатель средней скорости клеток возрос на 57,9% (P<0,05) по сравнению с периодом с марта по апрель. Стоит отметить, что данный показатель снизился на 48,2% в период с июля по сентябрь относительно периода проведения исследований. Обнаружено снижение описываемого показателя в период до применения препаратов и в период после окончания опыта на 6,4%.

Внутри первой подопытной группы показатель линейности достоверно не изменялся. Показатель прямонаправленности движения сперматозоидов в пробах спермы быков второй подопытной группы достоверно также не изменялся; отмечено уменьшение данного показателя в период проведения опыта на 0,9% по сравнению с предшествующим периодом. В контрольной

группе показатель прямолинейности в период март-апрель составил 72,7%, что на 10,6% выше данного показателя в период проведения опыта, и на 15,7% выше описываемого значения по сравнению с периодом июль-сентябрь.

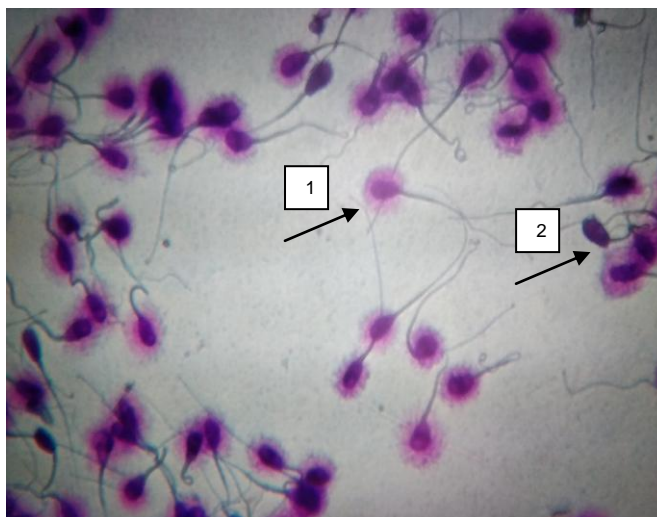
Внутри первой подопытной группы показатель площади головки в период до проведения опыта составил 16,3 микрон, во время проведения эксперимента – 20,2 микрон, после окончания проведения опыта – 20,3 микрон. Во второй опытной группе показатель средней площади головки составил 19,4 микрон в период с марта по апрель, что на 82,9% меньше показателя площади головки в период проведения опыта (35,5%) ($P < 0,05$). В период с июля по сентябрь отмечено снижение средней площади головки на 67,5% по сравнению с периодом проведения опыта. Среднее значение площади головки возросло на 9,3% с периода март-апрель по период июль-сентябрь. В группе-контроле описываемый показатель составил 19,2 микрон в период с марта по апрель, что на 34,9% меньше, чем в период май-июнь. В период с июля по сентябрь данный показатель составил 23,1 микрон, что на 12,1% меньше аналогичного показателя за период проведения опыта. Среднее значение площади головки снизилось на 20,3% с периода март-апрель по период июль-сентябрь (Рис 7).



* $P < 0,05$

Рисунок 7 – Площадь головки сперматозоидов, микрон/с

Пробы спермы трех быков, по одному из каждой группы, тестировались на предмет целостности ДНК. Пробы спермы получены в период после проведения опыта (июль). Было исследована проба спермы быка по кличке Ратник, входящего в состав первой подопытной группы. Индекс фрагментации ДНК в пробе спермы данного животного составил 13,7%. При исследовании пробы спермы быка Демиона, входящего в состав второй подопытной группы, обнаружено, что индекс фрагментации ДНК составил 15,2%. В пробе спермы быка Оман (группа-контроль) выявлено, что процент фрагментированных сперматозоидов составил 19,1% (Рис. 8).



*1 – сперматозоид с четко различимым ореолом, содержащий целую ДНК; 2 – сперматозоид без ореола, с фрагментированной ДНК.

Рисунок 8 – Проба спермы (бык Оман). Фрагментация ДНК (ув.Х 40)

Индекс фрагментации ДНК в пробе спермы быка первой подопытной группы был на 1,5 % меньше аналогичного показателя в пробе спермы быка второй подопытной группы, и на 5,4 % ниже индекса фрагментации ДНК в пробе быка из группы-контроля. Описываемый показатель в пробе спермы быка из группы, животные которой получали «L-карнитин» и «Гемобаланс» был на 3,8 % ниже, чем у быка из группы-контроля.

2.2.8 Корреляционные связи некоторых показателей качества спермы быков и параметров биохимического состояния организма

Нами обнаружена высокая корреляция в пробах животных, инъекционно получавших «L-карнитин», между показателем уровня цинка и средним значением объема полученных эякулятов ($r=0,93$), между долей живых сперматозоидов в эякуляте и количеством клеток, имеющих нормальное движение ($r=0,99$), а так же отмечается высокая корреляция между S головки сперматозоида и долей живых клеток ($r=0,94$). В группе быков, где животным инъекционно вводили препараты «L-карнитин» и «Гемабаланс» отмечена высокая корреляция между показателями: уровень Zn – объем эякулята ($r=0,99$), уровень Zn - концентрация эякулята ($r=0,95$), уровень Cu – объем эякулятов ($r=0,97$), уровень Cu – концентрация сперматозоидов ($r=0,99$), S головки сперматозоида – доля живых сперматозоидов ($r=0,93$).

2.2.9 Экономическая эффективность

Экономический эффект проводимых мероприятий по коррекции качества спермы определялся как разница между предотвращенным ущербом и затратами на проведение ветеринарных мероприятий. В период с марта по апрель от быков первой группы было заморожено в среднем 675 спермодоз от

одного быка. В период с июль по сентябрь – 960 доз. Средняя стоимость одной дозы спермы составляла 150 рублей. В первой опытной группе с целью коррекции качества спермы самцов, использовали инъекционный раствор L-карнитина, стоимостью 11 696 рубля на 1 голову. Экономический эффект ветеринарных мероприятий - 289 020 рублей. Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат - 3,1 рубля на рубль затрат.

В период с марта по апрель от быков второй группы было заморожено в среднем 718 спермодоз от одного быка. В период с июль по сентябрь – 958 доз. Во второй опытной группе (5 быков) с целью коррекции качества спермы самцов, использовали инъекционный раствор «L-карнитин» и полиминеральный раствор «Гемобаланс». Стоимость курса инъекции «Гемобаланс» составила 1496 рублей на 1 голову. Экономический эффект ветеринарных мероприятий составил 214 040руб. Экономическая эффективность коррекции качества спермы путем применения раствора «L-карнитин» совместно с препаратом «Гемобаланс» на рубль затрат составила 2,5 рубля на рубль затрат.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение качества спермы производителей – часто встречаемая проблема в животноводстве, с которой сталкиваются ветеринарные специалисты племенных предприятий. Для коррекции качественных показателей спермы, современный ветеринарный фармакологический рынок предлагает большое количество добавок и препаратов для парентерального их введения. Применение с этой целью веществ, которые напрямую участвуют в биохимических процессах, влияющих на показатели сохранности сперматозоидов являются наиболее биологически обоснованными.

В ходе проведения исследований влияния инъекционной формы «L-карнитина» в составе моно- и комплексной коррекции качества получаемой спермы нами были сделаны следующие выводы:

1. При применении инъекционной формы «L-карнитин» в дозе 1 мл/10 кг, 2 раза в неделю на протяжении месяца с целью коррекции качества спермы баранам-производителям отмечалось увеличение концентрации сперматозоидов на 35%, уменьшение уровня дыхания в среднем на 40%. При проведении курса инъекций быкам-производителям (в дозе 1 мл на 30 кг массы тела, 2 раза в неделю, 1 месяц), установлено увеличение среднего показателя объёма эякулята на 44%; увеличение концентрации сперматозоидов на 11%;
2. В результате комплексного анализа выявлен алиментарный фактор снижения фертильности быков-производителей, который обоснован снижением уровня меди в сыворотке крови до 6,26 мкмоль/л и уровня цинка до 8,6 ммоль/л;
3. Применение раствора «L-карнитин» быкам-производителям в дозе 1 мл/30 кг массы тела 2 раза в неделю на протяжении двух месяцев, привело к увеличению объёма эякулятов на 15,0% в период

проведения опыта и на 26,7% после проведения опыта относительно среднего показателя объема эякулята в период, предшествующий проведению эксперимента. При сочетанном применении с витаминно-минеральным препаратом «Гемобаланс», объем эякулятов возрос на 17,2% во время проведения эксперимента относительно периода предшествующего проведению опыта, и повысился на 20,1% за три месяца после окончания применения препаратов относительно периода до проведения исследований;

4. Применение инъекционной формы «L-карнитин» совместно с «Гемобаланс» приводит к нормализации показателей минерального обмена: содержание меди в сыворотке крови быков возросло на 29,8% по сравнению с периодом до проведения опыта, цинка – на 39,1%; применение одного препарата «L-карнитин» также привело к нормализации уровня меди и цинка – на 16,7% и 19,1% соответственно по сравнению с периодом до проведения эксперимента;
5. Концентрация спермы быков второй группы, с использованием комплексного введения «L-карнитин» и «Гемобаланс» возросла на 35,7 % относительно периода, предшествующего проведению эксперимента;
6. Количество живых сперматозоидов в пробах оттаянной спермы в первой группе быков возросло на 7,8% за период проведения опыта. Во второй группе в период проведения эксперимента доля живых сперматозоидов возросла на 14,7% по сравнению с предшествующим периодом; скорость движения сперматозоидов в пробах спермы быков, получавших «L-карнитин» в период проведения опыта, возросла на 37,9 %. У быков первой группы средняя скорость движения сперматозоидов снизилась на 12,4% за период после проведения опыта. В пробах спермы быков, получавших оба препарата, в период проведения опыта показатель средней скорости клеток увеличился на 57,9% ($P < 0,05$) по сравнению с периодом до начала опыта;
7. Показатель средней площади головки сперматозоида, в пробах спермы быков, которым инъецировали препараты «L-карнитин» и «Гемобаланс», до проведения опыта был на 82,9% меньше показателя площади головки в период проведения опыта (35,5 микрон) ($P < 0,05$). В период проведения опыта отмечено снижение средней площади головки на 67,5% по сравнению с периодом проведения опыта;
8. Экономический эффект применения «L-карнитин» составил 289 020 руб., экономическая эффективность была равна 3,1 рубля на 1 рубль затрат; экономический эффект применения «L-карнитин» совместно с витаминно-минеральным препаратом «Гемобаланс» был равен 289 020 руб., экономическая эффективность составила 2,5 рубля на 1 рубль затрат;

9. Количество эякулятов, пригодных к разбавлению и использованию, за период опыта (март-сентябрь) увеличилось на 7,7% и 3,3% в первой и второй группах соответственно.

4 ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие разработки по применению препарата «L-карнитин» будут направлены на изучение его влияния на такие показатели как живучесть оттаянной спермы, окислительно-восстановительные процессы, морфология сперматозоидов, оплодотворяющая способность спермы, полученной от самцов-производителей разных видов.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

В условиях повышения половой нагрузки, а также для улучшения качества спермы, получаемой от быков-производителей, рекомендовано применение препаратов «L-карнитин» и «Гемобаланс» по следующей схеме:

- ✓ Препарат «L-карнитин», 200 мг/мл: вводить внутримышечно в дозе 1 мл на 30 кг массы тела животного дважды в неделю на протяжении 2х месяцев;
- ✓ Препарат «Гемобаланс» вводить внутримышечно в дозе 1 мл на 45 кг живой массы (10 мл на 450 кг), дважды в неделю на протяжении 1 месяца.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Племяшов К.В. Опыт применения раствора l-карнитина с целью коррекции качества спермопродукции /Племяшов К.В., **Анипченко П.С.**// Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2017. - № 2. - С. 102-104.
2. Племяшов К.В. Медикаментозная коррекция качества спермопродукции производителей в условиях повышенной половой нагрузки /Племяшов К.В., Романенко Л.В., Корочкина Е.А., **Анипченко П.С.**// Генетика и разведение животных. - 2017. - № 4. - С. 21-25.
3. Сайдатова О.П. Алиментарное применение "Хумапола" как средство коррекции качества спермопродукции баранов-производителей / Сайдатова О.П., Мичурина А.Н., Никитин Г.С., **Анипченко П.С.**, Племяшов К.В// Генетика и разведение животных. - 2018. - № 3. - С. 87-91

Публикации в других изданиях

1. Стекольников А.А., Влияние препарата органической кислоты на качество спермы быков-производителей /Стекольников А.А., Племяшов К.В., **Анипченко П.С.**// В сборнике: Материалы международной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГАВМ - 2018. - С. 95-97.
2. **Анипченко П.С.** Влияние препарата органической кислоты на качество спермы быков-производителей /**Анипченко П.С.**, Племяшов К.В.//В сборнике: Современные научно–практические решения в АПК Сборник статей всероссийской научно-практической конференции. - 2017. - С. 162-166.
3. **Anipchenko P.** The effect of the organic acid on the bulls' sperm quality /**Anipchenko P.**, Plemyashov K., Nikitin G., Nikitina A., Shabunin S.//Journal of Animal Science.- 2019. - Т. 97. - № S3. - С. 243.
4. **Anipchenko P.** Effect of humic substances on the quality of ram sperm /**Anipchenko P.**, Plemyashov K., Stekolnikov A., Nikitin G., Ladanova M., Meboniya E., Korochkina E.// Reproduction in Domestic Animals. - 2018. - Т. 53. - № S2.