

На правах рукописи

ПЛАХОВА АНАСТАСИЯ ИГОРЕВНА

**ПОВЫШЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЯИЧНИКОВ И
КАЧЕСТВА ООЦИТОВ У ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАРОТИНОИДОВ**

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-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

Научный руководитель

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

Официальные оппоненты:

Авдеенко Владимир Семенович, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», профессор кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Лободин Константин Алексеевич, доктор ветеринарных наук, доцент, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I», заведующий кафедрой акушерства, анатомии и хирургии

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Защита диссертации состоится «25» декабря 2020 года в 14:00 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-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5, и на официальном сайте: <https://www.spbguvm.ru>.

Автореферат размещен на сайтах: ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации: <https://vak.minobrnauki.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»: <http://www.spbguvm.ru> «23» октября 2020 г.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Иванова Ирина Викторовна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние годы учеными проводятся интенсивные исследования и внедряются в практику животноводства технические достижения в области генетики и эмбриологии. В частности, разрабатываются новые методы воспроизводства животных, которые основаны на использовании яйцеклеток и эмбрионов (Племяшов К.В., 2007, 2008; Батраков А.Я. 2010; Никитин В.Я. 2007; Нежданов А.Г. 2007). Так, например, широкое распространение приобрела методика трансплантации эмбрионов животных *in vivo*, и *in vitro*, которые имеют важное значение для животноводства и всего сельского хозяйства, так как ее можно отнести к прорывным технологиями в воспроизводстве (Андреев Г.М., 2009; Колосов А.А. 2004; Племяшов К.В. 2007, 2008). При этом, ряд авторов выделяет, что использование методов получения эмбрионов *in vitro* эффективнее на 30%, по сравнению с традиционным способом. Таким образом использование *in vitro* технологии получения эмбрионов может ускорить интенсивность воспроизводства в 1,35 – 4 раза (Chagas e Silva J. 2008; Ricardo, C. 2004; Roche, J.F., 2001; Riso P. 2000; Winslow T., 2001; Yavas Y., 2000).

Однако, приживляемость при пересадке эмбрионов часто остается на низком уровне, что свидетельствует об актуальности совершенствования данного метода и изыскания способов повышения его эффективности. Одной из ключевых причин снижения эффективности получения и подсади эмбрионов является нарушение воспроизводительной функции доноров и реципиентов и отсутствие возможности диагностировать патологию матки и яичников (Кузьмич Р.Г., 2000). По мнению ряда авторов некоторые виды бесплодия у этих животных возникают именно в связи с функциональными нарушениями яичников. Так, при подсадке эмбрионов, решающим критерием результативности данной процедуры является активное желтое тело. Но при дефиците каротина в кормах могут возникать снижение его активности, уменьшение секреции маточных желез, а также повышение уровня эмбриональной смертности (Roche J.F., 2001, Torres-Junior de JRS., 2001, Xu ZZ., 200).

Степень проработанности темы исследований. Современные достижения в области биотехнологии воспроизводства зачастую описываются международными сообществами по трансплантации эмбрионов. Так по данным «American Embryo Transfer Association» количество произведенных эмбрионов и пересадок с использованием технологии IVP составило 238829/117733 в США, 346817/275918 в Бразилии и 911/128 в России, что свидетельствует о том, что количество производимых IVP эмбрионов в России в 200-300 раз меньше, чем в указанных странах (Ponsart, Merton; Коростелева, 2015). Совершенствование методов воспроизводства и трансплантации эмбрионов также описываются такими компаниями, как Agtech, Inc., IETS, Animal Reproduction Laboratory (Colorado State University), и другими. Также исследования в сфере повышения воспроизводительной функции животных при получении ооцитов и эмбрионов

описаны в научных публикациях зарубежных авторов (Seidel, Seidel, 2004; Stringfellow, Seidel, Society, 1998; Wright, Curtis, 1992).

По данным Френка Бейкера в 2013 году в Нидерландах было проведено 3530 процедур по аспирации ооцитов (OPU), в результате чего было получено 28768 ооцитов и 3814 эмбрионов, в то же время в Германии было проведено 1012 аспираций, получено 4564 ооцита и 3217 эмбриона (Becker, 2013). С учетом этой статистики можно сделать вывод, в среднем при аспирации ооцитов у одного донора можно получать около 1,1-3,2 эмбриона. Учитывая режим эксплуатации доноров (max 2 аспирации/нед.) количество получаемых эмбрионов будет составлять 4,4-12,8 эмбрионов в месяц, в то время как при классическом способе вымывания *in vivo* необходимо около 18 суток подготовки донора и затем 60 суток реабилитации, в результате чего получают в среднем около 8 эмбрионов за вымывание (8 эмбрионов за 2,5 мес. – 3,2 эмбриона в месяц). Таким образом использование IVP технологии ускорит интенсивность получения эмбрионов в 1,35 – 4 раза.

Цель и задачи исследования. Оценить влияние синтетических каротиноидов и обосновать возможность их использования как способ повышения функциональной активности яичников и качества ооцитов у коров. В связи с поставленной целью нами были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить распространенность гинекологической патологии доноров и реципиентов, влияющей на результативность трансплантации эмбрионов
2. Оценить гематологический статус доноров при использовании синтетических каротиноидов
3. Изучить динамику концентрации прогестерона при использовании синтетических каротиноидов
4. Оценить выход ооцитов и их морфофункциональных характеристик при трансплантации эмбрионов *in vitro* с использованием синтетических каротиноидов
5. Произвести расчет экономическую эффективность использования синтетических каротиноидов при подготовке доноров

Научная новизна работы заключается в том, что впервые научно обоснована и оценена возможность применения синтетических каротиноидов при подготовке доноров и реципиентов для повышения эффективности трансплантации эмбрионов. Впервые при подборе доноров и реципиентов изучили возможность использования ультразвуковой диагностики с доплеровским режимом для оценки васкуляризации желтого тела и активности яичников. Изучена распространенность акушерской и гинекологической патологии на примере животноводческого предприятия Ленинградской области, как один из основных критериев при подборе доноров и реципиентов эмбрионов животных. Впервые использован метод доплеровской диагностики кровоснабжения яичников и желтых тел как критерий оценки воспроизводительной функции животных. Впервые изучены клинические и биохимические показатели метаболизма животных при подготовке доноров и

реципиентов с использованием синтетических каротиноидов. Впервые оценены качественные и количественные показатели ооцитов при проведении трансплантации с использованием синтетических каротиноидов.

Теоретическая и практическая значимость. Определены критерии функциональной активности яичников у высокопродуктивных коров при их отборе и подготовке для суперовуляции и для использования животных в качестве реципиентов. Отражены взаимосвязь активности желтых тел яичников и концентрации прогестерона в крови животных при их подготовке к трансплантации эмбрионов с использованием препарата «Карофертин».

Методология и методы исследований. Экспериментальная часть работы выполнена согласно общепринятой методологии организации эксперимента. Подопытных животных подбирали по принципу условных аналогов из числа коров и телок на животноводческом предприятии Ленинградской области. Объектом исследования служили образцы пробы крови, ооциты, эмбрионы и половые органы коров и телок. При выполнении работы применяли гематологические, биохимические, лабораторные методы исследования, осуществляли статистическую обработку данных.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Распространенность акушерско-гинекологической патологии при отборе и подготовке доноров и реципиентов к трансплантации эмбрионов.
2. Оценка гематологического статуса доноров и реципиентов при использовании синтетических каротиноидов
3. Изучение динамики концентрации прогестерона при использовании синтетических каротиноидов
4. Оценка выхода ооцитов и их морфофункциональных характеристик при трансплантации эмбрионов *in vitro* с использованием синтетических каротиноидов.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения проведенных исследований одобрены и доложены на международной юбилейной научно-практической конференции «Генетика, селекция и биотехнология животных: на пути к совершенству» (Санкт-Петербург, 2020); в третьей международной научно-практической конференции «Постгеномные технологии в обеспечении здоровья и повышении продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы» (Санкт-Петербург, 2020); на международной научно-практической конференции «Современные проблемы обеспечения качества и безопасности продовольственного сырья, пищевых продуктов для человека и кормов для животных» (Санкт-Петербург, 2020); на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых аграрных вузов «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, 2020).

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 4 научные работы, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК

Министерства науки и высшего образования РФ, и методические рекомендации, утвержденные методическим советом ФГБОУ ВО СПбГАВМ.

Личный вклад. Все исследования, включая статистическую обработку данных и анализ полученного материала, проведены соискателем. Личный вклад соискателя в представленную научно-квалификационную работу составляет 90%.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 142 страницах машинописного текста и включает 24 рисунка и 12 таблиц. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, практических рекомендаций и списка использованной литературы, включающего 201 источников, включая 33 иностранных.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2019-2020 гг. на кафедре акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» и на животноводческом предприятии Ленинградской области ЗАО «Предпортовый». Работа выполнена в рамках реализации комплексного проекта по теме: «Разработка технологии геномного редактирования для воспроизводства высокоценного племенного крупного рогатого скота молочного направления, устойчивого к вирусу лейкоза», соглашение о предоставлении субсидии от «30» ноября 2018 года. №05.607.21.0208, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60718X0208.

Исследования проводили на высокопродуктивных коровах голштинской породы. Для оценки распространенности акушерско-гинекологической патологии использовали 25 коров. Для оценки распространенности гинекологической патологии основывались на данных акушерско-гинекологической диспансеризации в хозяйстве.

Для оценки гематологического статуса животных нами были сформированы подопытные группы животных по принципу условных аналогов. Для исследования отбирали коров через 30 дней после отела, у которых завершилась инволюция половых органов, отсутствовали выделения лохий. Первой подопытной группе (n=8) вводили «Карофертин» в дозе 20 мл подкожно трехкратно с интервалом 14 суток. Второй подопытной группе (n=8) вводили «Гемобаланс» в дозе 10 мл пятикратно с интервалом 2 дня. Третьей подопытной группе (n=8) вводили «Карофертин» в дозе 20 мл внутримышечно трехкратно с интервалом 14 суток и «Гемобаланс» в дозе 10 мл пятикратно с интервалом 2 дня. Перед введением препаратов были отобраны образцы крови для исследования фоновых гематологических показателей. В дальнейшем исследование крови проводили на 14-е сутки, 28-е сутки и 42-е сутки от начала эксперимента. Контрольной группе (n=8) исследуемые препараты не вводили.

При исследовании динамики концентрации прогестерона в тех же подопытных группах через 30 – 40 дней от начала введения препаратов у коров регистрировали проявление стадии возбуждения полового цикла и через 10-14 суток исследовали биохимические показатели сыворотки крови подопытных коров, проводили ультразвуковое исследование яичников и оценивали концентрацию прогестерона. В дальнейшем из каждой подопытной группы отбирали коров с учетом их геномной оценки и проводили аспирацию ооцитов и их анализ (Рисунок 1).



Рисунок 1. Влагалищный зонд с УЗ датчиком и пункционной иглой

При проведении аспирации зонд вводили во влагалище животного и через влагалищную стенку выводили изображение яичников на экран, одновременно с этим левой рукой фиксировали яичник через прямую кишку и прижимали его к стенке влагалища. Аспирационную иглу подключали к аспирационной системе (Рис. 2) и после обнаружения ооцитов в отобранной фолликулярной жидкости оценивали их качество с использованием инвертированного микроскопа и микроманипуляционных пипеток (Рис. 3).

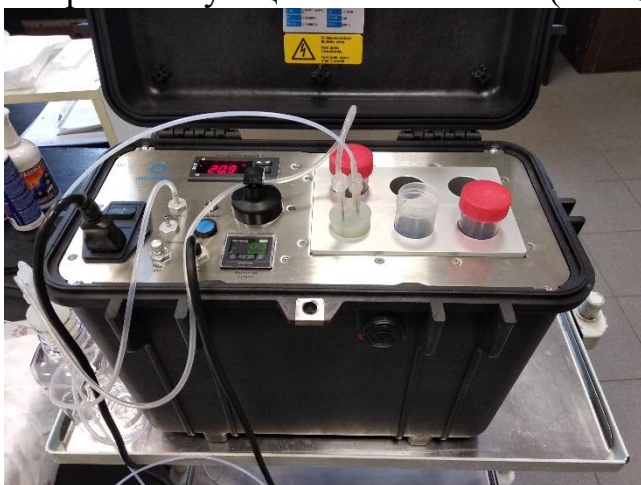


Рисунок 2. Аспирационный комплекс для получения ооцитов

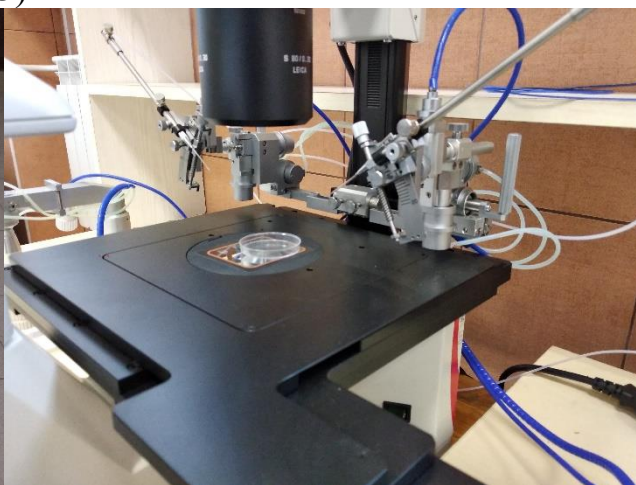


Рисунок 3. Микроманипулятор для фиксации ооцитов

У полученных ооцитов оценивали развитие лучистого венца, целостность прозрачной оболочки и структуру овоплазмы, разделяя их на соответствующие группы.

В исследовании использовали препараты:

«Карофертин», который содержит в качестве действующего вещества бета-каротин 10мг/мл, а также вспомогательные компоненты: антиоксиданты аскорбила пальмитат, Алл-гас-а-токоферол, консервант бензил алкоголь, растворители макроголь-15-гидроксистеарат (Солютол HS 15), изоропил мирилат и воду для инъекций;

«Гемобаланс», комплексный препарат, действующими веществами которого являются: L-лизина гидрохлорид – 20 мг/мл, DL-метионин – 20 мг/мл, глицин – 20 мг/мл, железа аммония цитрат – 15 мг/мл, кобальта сульфат – 240 мг/мл, меди сульфат – 70 мг/мл, рибофлавин (витамин В2) – 10 мг/мл, холина битартрат (витамин В4) – 10 мг/мл, пиридоксина гидрохлорид (витамин В6) – 10 мг/мл, инозитол (витамин В8) – 10 мг/мл, цианкобаламин (витамин В12) – 150 мг/мл, никотинамид – 100 мг/мл, D-пантенол – 15 мг/мл, биотин (витамин Н) – 10 мг/мл.

2.2 Схема проведения исследований



2.3 Результаты собственных исследований

2.3.1 Изучение распространенности гинекологической патологии доноров и реципиентов, влияющей на результативность трансплантации эмбрионов

Особенности течения предродового и родового периода у коров в исследуемом хозяйстве. Изучение особенностей течения предродового и родового периодов проводили на 25 коровах. В ходе исследования установили, что у 9 коров при нормальном течении родов раскрытие шейки матки составило 5 часов. У 14 коров раскрытие шейки матки колебалось от 5-17 часов, что тоже входит в норму. У 2-х коров раскрытие шейки матки затянулось до 20 часов, у них отмечалось патологическое течение родового процесса, телята родились очень слабыми. Продолжительность изгнания плода у 9 коров отмечалась от 20-40 минут в среднем. У 12 коров продолжительность изгнания плода составила 6-8 часов. Послеродовое восстановление отмечалось с небольшими осложнениями, выражающимися более продолжительным отделением последа (14-15 часов). Коровам назначалось срочное медикаментозное лечение. У 2 коров была выявлена слабая родовая деятельность, они не могли самостоятельно изгнать плод. Так как период раскрытия шейки матки был более 20 часов, применялось акушерское вмешательство, с целью спасти роженицу, а также телят от асфиксии. У 2 коров, в связи с патологическим течением родового процесса наблюдалось выпадение матки.

Отделение последа у 8 коров отделение последа прошли в срок (не более 10 часов) и без осложнений. У 15 коров, у которых были осложнения при родах, последовый период задержался на 6-8 часов с последующим самопроизвольным его отделением. Результаты оценки распространенности акушерской патологии представлены в таблице 1.

Таблица 1. Анализ родового периода у исследованных животных

	Кол-во животных	%
Всего	25	100%
Предродовой период		
Без осложнений	25	100%
С осложнениями	0	0
Роды		
Подготовительная стадия		
Раскрытие шейки матки без осложнений (за 5-20 часов)	23	92%
Раскрытие шейки матки с осложнениями (более 20 часов)	2	8%
Стадия выведения плода		
Выведение плода без акушерской помощи	7	28%
Выведение плода с акушерской помощью	18	72%
Растелившиеся коровы в ночное время	21	84%
Растелившиеся коровы в дневное время	4	16%
Выпадение матки	2	8%
Последовая стадия		
Без осложнений	8	32%
С осложнениями	17	68%

На основании наших наблюдений в данном хозяйстве можно сказать, что предродовой период у исследованных животных проходил без осложнений, но в периоды родов наблюдались отклонения от нормы (продолжительность изгнания плода, задержание последа), в связи с чем приходилось применять срочную акушерскую и медикаментозную помощь.

Проведение гинекологического исследования у подопытных коров в рамках гинекологической диспансеризации. При гинекологической диспансеризации проводили клинические наблюдения за роженицами и родилицами; ректальное и вагинальное исследования коров с трудными и патологическими родами, проводимые на 7–8 сутки после отёла; ректальное и вагинальное исследование всех коров на 12–14 день после отёла. Результаты исследования представлены на рисунке 4.

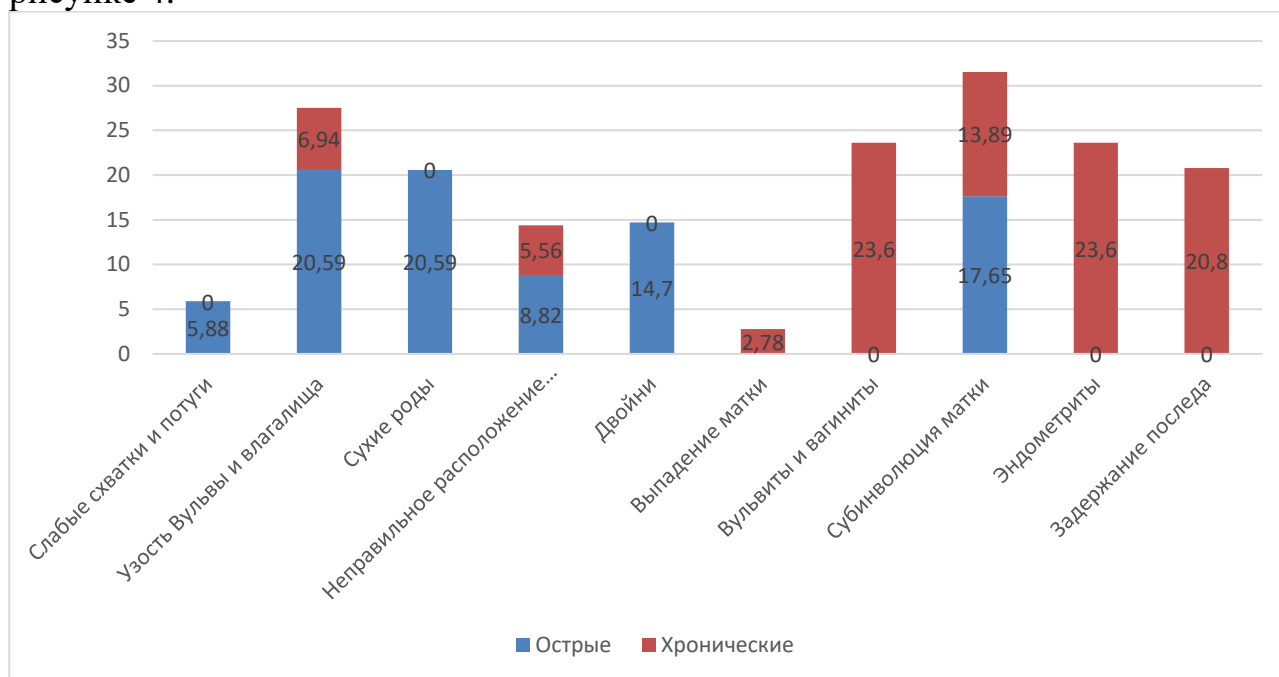


Рисунок 4. Оценка распространенности акушерско-гинекологической патологии

Патологические роды в данном хозяйстве преобладают у первородящих телок ($40,5 \pm 3,04\%$), в то время как повторнородящих, данная патология наблюдается только у $20,1 \pm 7,13\%$ животных, что в 2 раза реже, чем у первородящих. Наименьший процент нарушений в динамике родового акта отмечен у повторнородящих ($17,3 \pm 4,98\%$). Таким образом, при использовании коров для проведения трансплантации эмбрионов животных, одной из основных задач является отбор ценных в племенном отношении и здоровых животных, у которых должны отсутствовать болезни со стороны репродуктивной системы, состояние которой на прямую зависит от подготовки коров к отёлу, благополучных родов и течения послеродового периода.

В ходе наших исследований мы проанализировали распространенность акушерско-гинекологической патологии в условиях животноводческого предприятия Ленинградской области и установили, что наибольшее количество осложнений при родах регистрировали в период выведения плода, которые наблюдались у 72% животных, и в последовую стадию родов, которые

наблюдали у 68% животных. В послеродовой период наиболее часто проявлялись вульвиты и вагиниты (23,6%), эндометриты (23,6%) и субинволюция матки (13,89-17,65%).

2.3.2 Оценка гематологического статуса доноров и реципиентов при использовании синтетических каротиноидов

В настоящих исследованиях отражены результаты эффективности использования препаратов «Карофертин» и «Гемобаланс» при подготовке коров к трансплантации эмбрионов. Результаты динамики гематологических показателей у коров в процессе эксперимента представлены на рисунках 5-7.

Для проведения эксперимента нами были сформированы подопытные группы животных по принципу условных аналогов. Первой подопытной группе вводили «Карофертин» в дозе 20 мл подкожно трехкратно с интервалом 14 суток. Второй подопытной группе вводили «Гемобаланс» в дозе 10 мл пятикратно с интервалом 2 дня. Третьей подопытной группе вводили «Карофертин» в дозе 20 мл внутримышечно трехкратно с интервалом 14 суток и «Гемобаланс» в дозе 10 мл пятикратно с интервалом 2 дня. Перед введением препаратов были отобраны образцы крови для исследования фоновых гематологических показателей. В дальнейшем исследование крови проводили на 14-е сутки, 28-е сутки и 42-е сутки от начала эксперимента. Контрольной группе исследуемые препараты не вводили.

Количество эритроцитов и лейкоцитов у коров контрольной группы на первые сутки эксперимента составляло $5,08 \pm 0,21 \cdot 10^{12}/л$ и $9,7 \pm 2,2 \cdot 10^9/л$, на 14-е сутки их концентрация увеличилась до $5,71 \pm 0,18 \cdot 10^{12}/л$ ($P < 0,05$), но количество лейкоцитов осталось на том же уровне и составляло $9,7 \pm 2,4 \cdot 10^9/л$, на 28-й – $5,47 \pm 0,45 \cdot 10^{12}/л$ и $9,8 \pm 2,8 \cdot 10^9/л$, а на 75-е сутки – $5,38 \pm 0,60 \cdot 10^{12}/л$ и $10,0 \pm 2,4 \cdot 10^9/л$. Таким образом в контрольной группе наблюдали положительную динамику увеличения эритроцитов (Рис. 5).

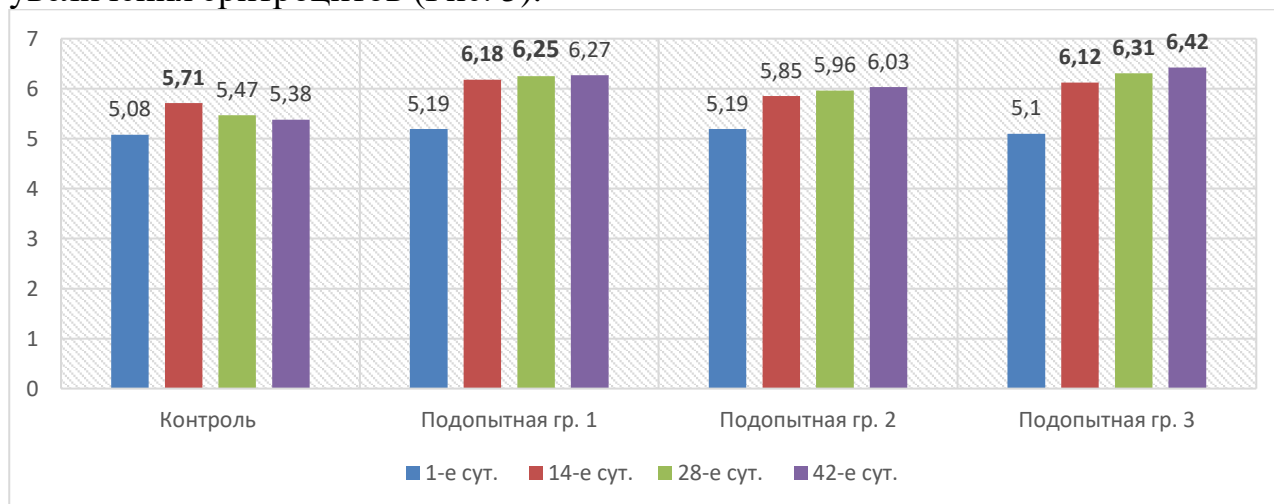


Рисунок 5. Динамика концентрации эритроцитов у подопытных животных, $10^{12}/л$

У коров в подопытных группах количество эритроцитов в начале опыта составляло $5,19 \pm 0,19 \cdot 10^{12}/л$, $5,19 \pm 0,26 \cdot 10^{12}/л$ и $5,1 \pm 0,23 \cdot 10^{12}/л$, на 14-е сутки – $6,18 \pm 0,31 \cdot 10^{12}/л$ ($P < 0,05$), $5,85 \pm 0,42 \cdot 10^{12}/л$ и $6,12 \pm 0,22 \cdot 10^{12}/л$ ($P < 0,05$), к 28-му дню

– $6,25 \pm 0,38 \cdot 10^{12}/\text{л}$ ($P < 0,05$), $5,96 \pm 0,39 \cdot 10^{12}/\text{л}$ и $6,31 \pm 0,46 \cdot 10^{12}/\text{л}$ ($P < 0,05$), а к 42-му – $6,27 \pm 0,49 \cdot 10^{12}/\text{л}$, $6,03 \pm 0,37 \cdot 10^{12}/\text{л}$ и $6,42 \pm 0,71 \cdot 10^{12}/\text{л}$ ($P < 0,01$), соответственно.

Проанализировав морфологические показатели крови у подопытных коров можно отметить, что в период эксперимента не наблюдалось достоверных изменений количества лейкоцитов, также как и у коров контрольной группы они находились на одном уровне. Таким образом можно отметить, что максимальное повышение концентрации эритроцитов было зафиксировано в третьей подопытной группе, которым вводили комбинацию препаратов «Карофертин» и «Гемобаланс».

Достоверное увеличение концентрации гемоглобина отмечали у животных в первой и третьей подопытных группах, которым вводили «Карофертин» отдельно и в сочетании с «Гемобалансом». Во второй подопытной группе и в контрольной группе отмечали только незначительное увеличение этого показателя. В контроле количество гемоглобина составило $89,2 \pm 5,1$ г/л, в группе №1 – $90,1 \pm 4,3$ г/л, в группе №2 – $85,3 \pm 4,7$ г/л, в группе №3 – $89,2 \pm 3,6$ г/л.

Количество гемоглобина в крови у всех подопытных животных имело тенденцию к увеличению и на 14-е сутки эксперимента составило $92,0 \pm 3,5$ г/л, $95,2 \pm 3,6$ г/л, $92,9 \pm 4,8$ г/л, $95,6 \pm 3,5$ г/л. На 28-е сутки – $92,4 \pm 5,4$ г/л, $99,8 \pm 2,5$ г/л, $96,3 \pm 3,2$ г/л и $103,8 \pm 4,7$ г/л ($P < 0,05$). К 42-м суткам опыта – $94,2 \pm 4,5$ г/л, $106,6 \pm 4,8$ г/л ($P < 0,05$), $98,3 \pm 4,1$ г/л и $111,4 \pm 8,16$ г/л ($P < 0,001$), соответственно. Таким образом, достоверное увеличение содержания гемоглобина в крови подопытных животных к окончанию эксперимента отмечали лишь у коров, которым вводили карофертин подкожно (животные первой подопытной группы), а также его сочетанное применение с комплексным препаратом «Гемобаланс» (подопытная группа №3), где и отмечалась наибольшая достоверная положительная динамика в отношении повышения концентрации гемоглобина (Рис. 6).

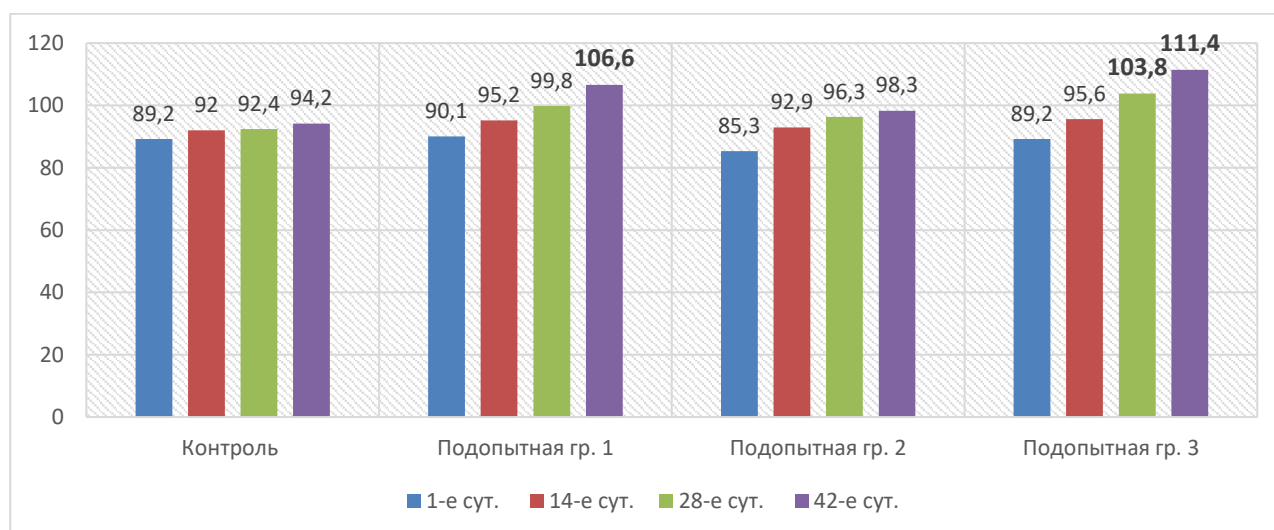


Рисунок 6. Динамика концентрации гемоглобина у подопытных животных, г/л

Гематокрит на начало эксперимента у подопытных животных находился на уровне $0,315$ - $0,325$ л/л, и только в последней подопытной группе достоверно

повысился к 28-му, а затем к 42-му дню составлял $0,341 \pm 0,007$ л/л ($P < 0,05$) и $0,353 \pm 0,009$ л/л ($P < 0,01$).

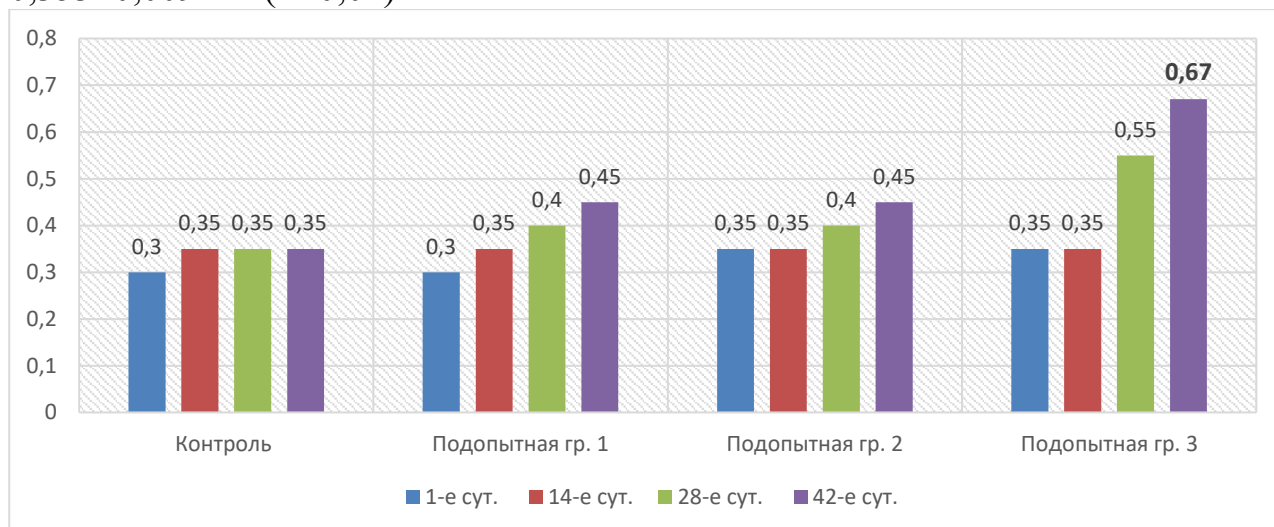


Рисунок 7. Динамика скорости оседания эритроцитов у подопытных животных, г/л

Уровень СОЭ достоверно изменялся также только в последней подопытной группе, которым вводили «Карофертин» и «Гемобаланс» и составлял $0,35 \pm 0,08$ мм/час в первый день опыта до $0,67 \pm 0,12$ мм/час ($P < 0,05$) к 42-му дню. В остальных подопытных группах достоверных отличий динамики СОЭ не отмечали (Рис. 7).

В ходе наших исследований наибольший положительный эффект был отмечен в первой и третьей подопытных группах (подкожное введение препарата «Карофертин» и сочетанное внутримышечное введение препарата «Карофертин» и «Гемобаланс»).

В ходе изучения лейкограммы подопытных животных отмечали нейтрофилию (Табл. 2). Наиболее достоверные изменения лейкоформулы наблюдали у коров первой и третьей подопытных групп. У животных в гр №1 зафиксировали уменьшение количества эозинофилов на 3,5 % за период исследования, в гр. №3 на 3,6 % за период исследования. Количество лимфоцитов увеличилось на 15,1 % и 17,1 % в первой и третьей подопытных группах за период исследования соответственно. Во второй подопытной группе и в контрольной группе достоверных изменений лейкограммы зафиксировано не было.

Таблица 2. Лейкограмма подопытных животных, $M \pm m$

Показатель	Группа	Период			
		1-й	14-й	28-й	42-й
Базофилы, %	Контрольная	$0,25 \pm 0,05$	0	0	0
	Подопытная гр. 1	0	0	0	0
	Подопытная гр. 2	0	$0,25 \pm 0,03$	0	0
	Подопытная гр. 3	0	0	0	0
Эозинофилы, %	Контрольная	$10,5 \pm 0,3$	$10,7 \pm 0,5$	$10,2 \pm 0,2$	$10,5 \pm 0,4$
	Подопытная гр. 1	$10,7 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,8^*$	$7,2 \pm 0,4^{**}$
	Подопытная гр. 2	$10,5 \pm 0,5$	$10,3 \pm 0,5$	$10,7 \pm 0,7$	$10,5 \pm 0,5$

	Подопытная гр. 3	11,3±1,2	9,8±0,4	7,8±0,8*	7,5±0,5**
Палочкоядерные нейтрофилы, %	Контрольная	7,6±0,9	7,8±0,2	8,1±0,7	7,5±0,8
	Подопытная гр. 1	8,1±0,9	7,3±0,6	5,4±0,4*	5,4±0,7*
	Подопытная гр. 2	7,6±0,9	7,8±0,5	7,7±0,8	7,5±0,9
	Подопытная гр. 3	8,3±0,8	7,4±0,7	5,8±0,6*	5,2±0,8*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	Контрольная	37,2±1,9	38,5±1,9	37,4±2,6	36,5±2,2
	Подопытная гр. 1	38,5±2,5	32,2±2,6	31,8±3,6	29,9±2,1*
	Подопытная гр. 2	38,4±2,9	37,2±2,1	35,9±2,1	34,2±1,9
	Подопытная гр. 3	37,8±2,0	34,0±2,3	31,7±2,3	29,8±2,2*
Лимфоциты, %	Контрольная	37,9±3,6	35,3±3,1	36,2±4,4	41,4±3,9
	Подопытная гр. 1	34,6±3,6	43,4±3,9	48,2±3,9*	49,5±5,0*
	Подопытная гр. 2	38,1±2,9	38,2±3,3	41,9±4,0	42,9±3,7
	Подопытная гр. 3	35,1±3,2	40,9±4,2	48,1±5,4	52,2±5,2*
Моноциты, %	Контрольная	7,8±0,7	7,8±0,8	7,1±0,4	6,7±0,7
	Подопытная гр. 1	8,0±0,4	7,5±0,5	7,1±0,9	6,9±0,4
	Подопытная гр. 2	5,2±0,9	6,5±0,6	3,9±0,8	4,8±0,6
	Подопытная гр. 3	7,5±0,7	8,1±0,8	6,5±0,7	5,3±0,8

*P<0,05; **P<0,01

Различия в динамике концентрации нейтрофилов отмечали только у коров в первой и третьей группе. На первые сутки исследований количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в группе № 1 составило 8,1±0,9 % и 38,5±2,5 %. К 42-му дню – 5,5±0,7 % (P<0,05) и 31,0±2,3 % (P<0,05), соответственно. Процентное содержание палочкоядерных нейтрофилов также было оптимальным в третьей подопытной группе, по сравнению с другими подопытными животными первой и второй подопытных групп, у которых использовали «Карофертин» подкожно, либо «Гемобаланс» внутримышечно в виде монотерапии.

Таким образом, применение вышеуказанных препаратов, включая и их комбинированное использование, приводит к нормализации показателей крови. Так, у подопытных животных отмечали, что количество гемоглобина в крови у коров в третьей подопытной группе на 42-е сутки исследования было выше на 27,2 % (P<0,001), а у животных первой и второй подопытных групп уровень гемоглобина в крови изменялся незначительно (P≥0,05). Гематокритная величина достоверно изменилась только в третьей подопытной группе, где она увеличилась на 20,0 % (P<0,01). При анализе показателя СОЭ только у коров третьей подопытной группы отмечено его достоверное увеличение в 1,8 раза. При анализе лейкограммы отмечали положительную тенденцию в виде нормализации показателей у всех подопытных животных, что по видимому было связано с завершением послеродового периода.

2.3.3 Изучение динамики концентрации прогестерона при использовании синтетических каротиноидов

Для оценки концентрации прогестерона и основных биохимических показателей сыворотки крови у подопытных животных через 30 – 40 дней от начала введения препаратов регистрировали проявление стадии возбуждения полового цикла и через 10-14 суток исследовали биохимические показатели

сыворотки крови подопытных коров, проводили ультразвуковое исследование яичников и оценивали концентрацию прогестерона.

Максимальную концентрацию общего белка отмечали в подопытной группе №2, которым вводили только препарат «Гемобаланс», его концентрация составила $84,4 \pm 1,84$ г/л, что на 3,67 г/л больше, чем в контрольной группе и на 11,55 и 2,75 больше, чем в первой и третьей подопытной группе, которым вводили «Карофертин» в виде монотерапии и «Карофертин» «Гемобаланс» в сочетанном виде. Максимальная концентрация глобулинов отмечалась в группе №2 и составила $59,93 \pm 5,35$ г/л, а минимальная в группе №1 и составила $46,70 \pm 3,11$ г/л. Концентрация мочевины во всех подопытных группах не имела достоверных отличий и варьировала от 5,87 до 6,73 ммоль/л. Однако, количество азота мочевины также было значительно меньше в подопытной группе №2, в которой его концентрация составила 0,67 ммоль/л, а в других подопытных группах варьировала от 2,73 до 3,12 ммоль/л. Концентрация билирубина была наименьшей в подопытной группе №3, которым вводили «Карофертин» и «Гемобаланс» в сочетании и составила 2,1 ммоль/л. Наибольшая концентрация билирубина была отмечена в подопытной группе №2 и составила 3,17 ммоль/л. Активность АЛТ и АСТ находилась в пределах референтных значений и не имела достоверных различий между подопытными группами и контрольной группой. Активность щелочной фосфатазы была на высоком уровне в первой и третьей подопытных группах и составила 128,80 и 104,6 МЕ/л соответственно, что несколько превышает допустимые уровни для здоровых животных. В контрольной группе и второй подопытной группе активность щелочной фосфатазы была ниже и составила 84,77 и 95,07 МЕ/л соответственно. Активность амилазы не имела достоверных различий среди подопытных и контрольной групп и варьировала от 21,85 до 28,55 МЕ/л. Концентрация глюкозы была максимальной в подопытной группе №1 и составила 3,16 ммоль/л и минимальной в подопытной группе №3 и составила 1,82 ммоль/л. Количество холестерина было достоверно выше в контрольной группе в сравнении с подопытными группами 1-3 и составило 4,09 ммоль/л, а в подопытных группах его концентрация варьировала от 1,96 до 3,2 ммоль/л. Достоверных различий в кальций/фосфорном отношении установлено не было. Динамика концентрации прогестерона представлена на рисунке 8.

Концентрация прогестерона была достоверно выше в подопытной группе №3, которым вводили «Карофертин» в сочетании с препаратом «Гемобаланс» и в подопытной группе №1, которым вводили только «Карофертин» и составила $21,98 \pm 3,03$ и $17,01 \pm 9,68$ нмоль/л соответственно. Вероятно концентрация прогестерона была выше в этих подопытных группах именно ввиду использования препарата «Карофертин», который на прямую влияет на концентрация каротина в крови животных и таким образом способствует функционированию желтого тела.

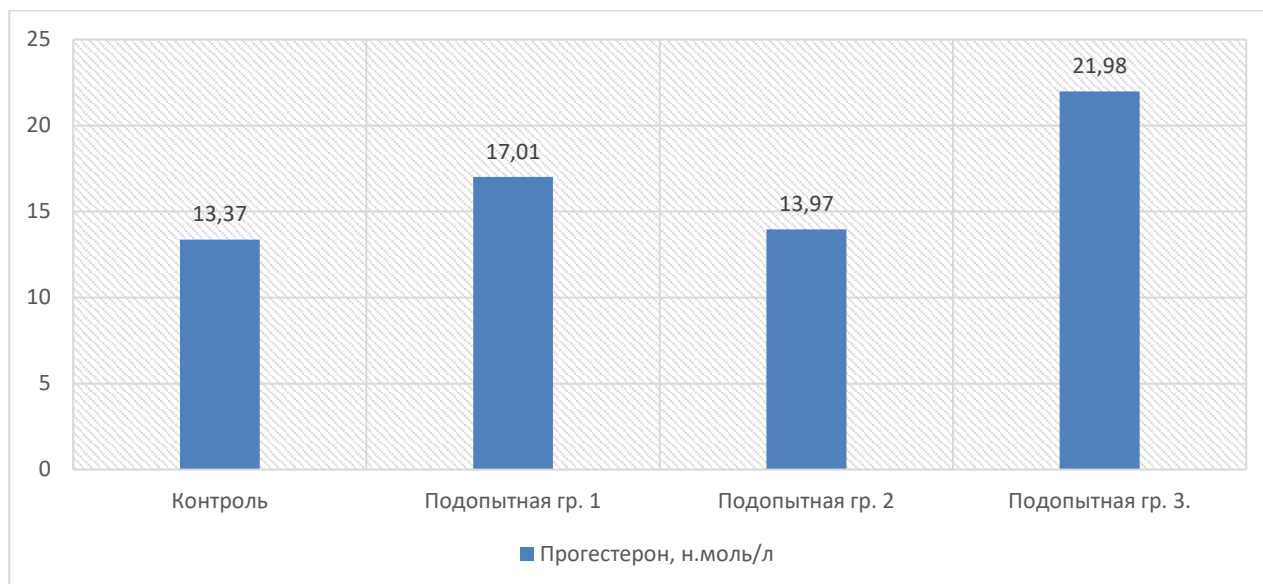


Рисунок 8. Диаграмма динамики концентрации прогестерона в подопытных группах, нмоль/л

У всех подопытных животных дополнительно проводили ректальное исследование матки и яичников, фиксировали размеры, форму консистенцию и другие параметры. Также проводили ультразвуковую диагностику матки и яичников и определяли интенсивность кровоснабжения желтого тела с использованием доплеровского режима. Нами была установлена тенденция зависимости концентрации прогестерона от кровоснабжения желтого тела. Так, при концентрации прогестерона у подопытного животного в 26,24 нмоль/л, отмечали, что размер яичника составляет 3,5x2,5 см, в его левой части визуализируются фолликулы небольшого размера. Большую часть яичника занимает желтое тело. Красным цветом отражена васкуляризация желтого тела у данного животного (рис. 9).

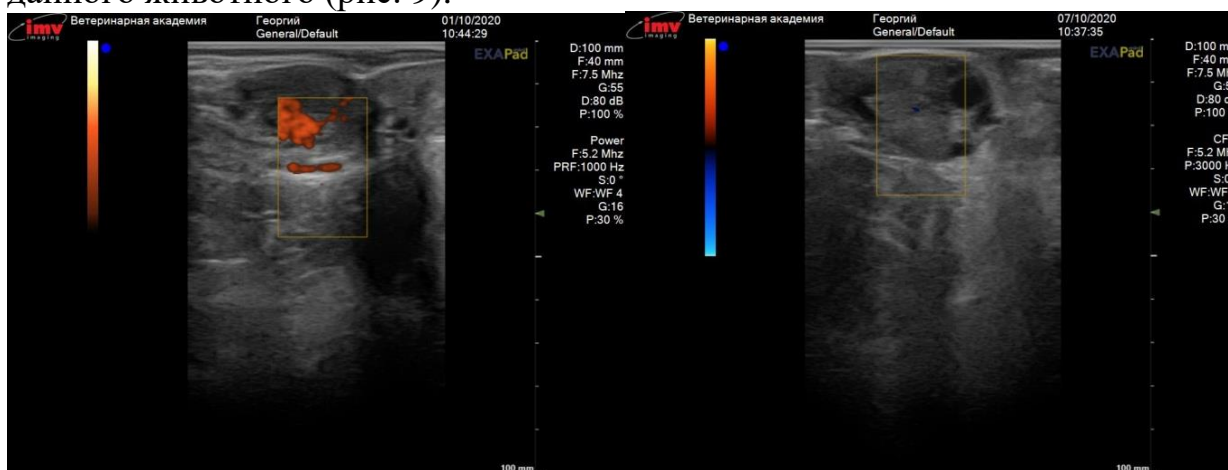


Рисунок 9. Яичник подопытного животного с выраженной васкуляризацией желтого тела

Рисунок 10. Яичник подопытного животного с пониженной васкуляризацией

У другого подопытного животного при концентрации прогестерона в 9,25 нмоль/л отмечали яичник размером 4,5x4 см. По контуру яичника визуализируются растущие фолликулы, в центре гипоэхогенное желтое тело. В

области доплеровского исследования пульсации крови не отмечено (рис. 10). Аналогичную картину мы наблюдали и у остальных исследуемых животных.

Таким образом, проведя анализ строения яичников и активности желтых тел у подопытных животных с использованием доплерографии, можно отметить взаимосвязь между интенсивностью кровоснабжения и уровнем прогестерона в крови, что, вероятно, связано с этапами формирования желтого тела, которые включают стадию пролиферации и васкуляризации. Следует отметить, что наибольшее кровоснабжение желтого тела яичников отмечали в первой и третьей подопытных группах, у которых в состав терапии входил препарат «Карофертин».

2.3.4 Оценка выхода ооцитов и их морфофункциональных характеристик при трансплантации эмбрионов *in vitro* с использованием синтетических каротиноидов

Для проведения оценки выхода ооцитов и их морфофункциональных характеристик у коров, после окончания введения препаратов регистрировали проявление стадии возбуждения полового цикла и через 4 суток после окончания половой охоты у животных подопытных групп проводили аспирации ооцитов через влагалищную стенку с использованием специального микроконвексного УЗ датчика с пункционной иглой. Для аспирации отбирали по одному животному из каждой подопытной группы по результатам оценки их племенной ценности. При этом для проведения аспирации использовали животных с индексом племенной ценности более 2000 ТРІ.

При проведении аспирации зонд вводили во влагалище животного и через влагалищную стенку выводили изображение яичников на экран, одновременно с этим левой рукой фиксировали яичник через прямую кишку и прижимали его к стенке влагалища. Аспирационную иглу подключали к аспирационной системе и после обнаружения ооцитов в отобранной фолликулярной жидкости оценивали их качество с использованием инвертерного микроскопа и микроманипуляционных пипеток.

У полученных ооцитов оценивали развитие лучистого венца, целостность прозрачной оболочки и структуру овоплазмы, разделяя их на соответствующие группы. Результаты оценки ооцитов представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Результаты аспирации фолликулов у подопытных животных за первую аспирацию

	Кол-во асп. фолликулов.	Кол-во ооцитов отличного кач.	Кол-во ооцитов хорошего и условного годного кач.	Кол-во ооцитов плохого качества.
Контрольная группа	9	2 (28,57%)	3 (42,86%)	2 (28,57%)
Опыт. №1	7	3 (50%)	2 (33,3%)	1 (16,66%)
Опыт. №2	10	1 (16,66%)	4 (66,6%)	1 (16,66%)
Опыт. №3	10	3 (33,33%)	4 (44,44%)	2 (22,22%)

Проанализировав полученные данные, мы не установили достоверных различий в выходе ооцитов и количестве фолликулов для аспирации ввиду

маленькой выборки животных. Однако, отмечена тенденция, что в подопытной группе №3 количество пригодных ооцитов было несколько выше чем в других подопытных группах. У этих ооцитов отмечали развитую оболочку лучистого венца (кумулюса) которая составляла более 5-ти рядов гранулёзных клеток, а также отсутствовали дефекты яйцеклетки в виде повреждения прозрачной оболочки, наличия повреждения ядра или резких изменений цвета в цитоплазме ооцитов (Рис. 11, 12).

Таблица 4. Результаты аспирации фолликулов у подопытных животных за вторую аспирацию

	Кол-во асп. фолликулов.	Кол-во ооцитов отличного кач.	Кол-во ооцитов хорошего и условного годного кач.	Кол-во ооцитов плохого качества.
Контрольная группа	9	2 (28,57%)	3 (42,86%)	2 (28,57%)
Опыт. №1	11	2 (66,66%)	0	1 (33,33%)
Опыт. №2	7	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)
Опыт. №3	9	3 (50%)	2 (33,33%)	1 (16,66%)

Также следует отметить, что в подопытных группах количество ооцитов плохого качества было ниже чем в контроле (рис. 13).

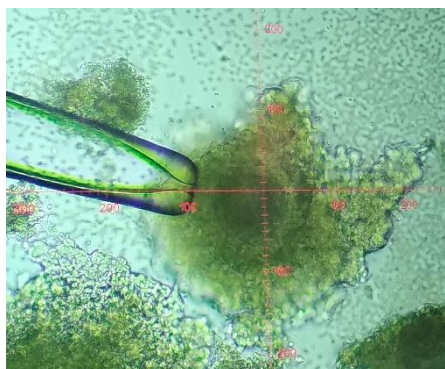


Рисунок 11. Ооцит отличного качества



Рисунок 12. Ооцит условно-годного качества



Рисунок 13. Не пригодный для использования ооцит

2.3.5 Расчет и экономическая эффективность трансплантации эмбрионов с использованием синтетических каротиноидов

Стоимость одного флакона препарата «Карофертин» 100 мл составляет 720 рублей. При проведении исследований на одно животное использовали трехкратное его введение по 20 мл, т.е. 60 мл. за курс введения. Таким образом суммарная стоимость введения данного препарата составила 432 рубля (720руб*23 гол). Учитывая, что суммарное количество ооцитов отличного и хорошего качества было выше в группах, где применяли «Карофертин» до 28% можно сделать вывод об целесообразности применения этого препарата при трансплантации эмбрионов животных. По данным международной американской школы трансплантации эмбрионов животных (Peter Elsdon, 2015) расчётная стоимость эмбрионов при условии получения в среднем 5-ти жизнеспособных эмбрионов за одну процедуру

и приживляемости в 50% и без учета затрат на содержание и кормления доноров и реципиентов - стоимость получения этого эмбриона складывается из: курса фолликулостимулирующего гормона (около 76\$), курса простагландинов (около 54\$), сред для культивирования эмбрионов (1,05\$), расходных материалов катетеров и фильтров (37\$). Таким образом суммарная стоимость получения эмбрионов с указанными условиями составляет 168,05\$, что по текущему курсу составляет 13047 руб. Т.е. пять эмбрионов будет стоить $13047 * 5 = 65235$ руб. Учитывая, что выход ооцитов хорошего качества был выше до 28%, следовательно, используя те же затраты на их получение экономическая эффективность будет складываться из разницы в количестве получаемых в дальнейшем эмбрионов и составит 18265 руб. за одну процедуру получения эмбрионов.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе оценки повышения функциональной активности яичников и качества ооцитов у высокопродуктивных коров с использованием синтетических каротиноидов мы сделали следующие выводы:

1. В ходе наших исследований мы проанализировали распространенность акушерско-гинекологической патологии в условиях животноводческого предприятия Ленинградской области и установили, что наибольшее количество осложнений при родах регистрировали в период выведения плода, которые наблюдались у 72% животных, и в последовую стадию родов, которые наблюдали у 68% животных. В послеродовой период наиболее часто проявлялись воспаления половых органов 23,6% и субинволюция матки 13,89%.
2. Применение препаратов «Карофертин» и «Гемобаланс», приводит к нормализации показателей крови, отражающих функциональное состояние органов и систем исследуемых животных. Так, в ходе опыта было установлено, что наилучший результат был достигнут при комбинированном введении препаратов «Карофертин» и «Гемобаланс», у которых в ходе эксперимента отмечали достоверное увеличение гемоглобина на 27,2%, увеличение скорости оседания эритроцитов в 1,8 раз.
3. Использование препаратов «Карофертин» и «Гемобаланс» приводит к увеличению концентрации прогестерона который достигал в подопытных группах №3 и №1 21,98 нмоль/л и 17,01 нмоль/л соответственно, что свидетельствует о положительном влиянии препаратов на основе синтетических каротиноидов на функционирование желтого тела доноров и реципиентов.
4. Установлено, что использование препаратов «Карофертин» в дозе 20 мл внутримышечно трехкратно с интервалом 14 суток и «Гемобаланс» в дозе 10 мл пятикратно с интервалом 2 дня приводит к увеличению выхода ооцитов отличного и хорошего качества на 28% по сравнению с контрольной группой.
5. Использование препаратов «Карофертин» и «Гемобаланс» приводит к увеличению экономической эффективности подготовки коров в качестве доноров ооцитов в среднем на 18265 руб. на одну голову.

4 ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Продолжение исследований по данному направлению очень актуально и имеет широкие перспективы. Так, в настоящее время нами проводится оценка влияния исследуемых препаратов на результативность суперовуляции у доноров для их подготовки к вымыванию и трансплантации эмбрионов *in vivo*. Также, в продолжении исследований по повышению результативности получения и подсадки эмбрионов *in vitro* мы считаем возможным провести исследования по оценке различных компонентов ростовых сред для созревания ооцитов, и дальнейшего культивирования оплодотворенных зигот.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для повышения функциональной активности яичников и повышения качества ооцитов у молочных коров рекомендуем использовать препарат «Карофертин». При использовании препарата в монорежиме дозировка составляет 20 мл подкожно, трехкратно, с интервалом 14 суток. При сочетании с препаратом «Гемобаланс», который вводят в дозе 10 мл внутримышечно, пятикратно с интервалом в 2 дня.
2. При отборе доноров и реципиентов к последующей трансплантации эмбрионов мы рекомендуем использование доплерографического метода исследования яичников и желтых тел, которое может служить дополнительным критерием при подготовке их к трансплантации эмбрионов.
3. Рекомендуем использовать материалы исследований в научно-исследовательской работе по вопросам профилактики акушерской патологии и бесплодия у высокопродуктивных коров, и по вопросам биотехники воспроизводства и трансплантации эмбрионов животных, а также в учебном процессе ВУЗов при изучении дисциплины «Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных».

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Плахова, А.И.** Оценка влияния препаратов «Карофертин» и «Гемобаланс» на гематологический статус доноров и реципиентов эмбрионов / А.И. Плахова, К.В. Племяшов // Международный вестник ветеринарии. - 2020, № 3. - С. 83-88;
2. **Плахова, А.И.** Оценка препаратов, повышающих воспроизводительную функцию коров доноров ооцитов / А.И. Плахова, К.В. Племяшов // Генетика и разведение животных. - 2020, № 3. - С 122 - 126;
3. **Плахова, А.И.** Изучение критериев отбора и оценки коров-доноров при их подготовке к трансплантации эмбрионов / А.И. Плахова // Генетика и разведение животных. – 2020, №4. - С 39-42.

Публикации в других изданиях

4. Яшин, А.В. Биохимические исследования биологических жидкостей организма при диспансерном обследовании животных / А.В. Яшин, Г.В. Куляков, П.С. Киселенко, В.В. Лебедь, Е.И. Садыкова, **А.И. Плахова** // Министерство сельского хозяйства РФ, Департамент научно-технологической политики и образования, Санкт-петербургская государственная академия ветеринарной медицины. - 2016, Санкт-Петербург. – 18с.