

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

***Ю.А. ГОРБУНОВ, Н.Г. МИНИНА***

***БИОТЕХНОЛОГИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
ЭМБРИОНОВ В СКОТОВОДСТВЕ***

*Монография*

*Гродно  
ГГАУ  
2014*

УДК: 636.2.08(075)

**Горбунов, Ю.А.** Биотехнология трансплантации эмбрионов в скотоводстве / Ю. А. Горбунов, Н. Г. Минина. – Гродно : ГГАУ, 2014. – 288 с. – ISBN 978-985-537-054-4

В работе изложены результаты экспериментальных исследований, полученных авторами по трансплантации эмбрионов коров дойного стада. Основное внимание уделено изучению влияния возраста, наличия (либо отсутствия) лактации и молочной продуктивности коров-доноров на уровень полиовуляции и выход эмбрионов, а также связи между сохранностью акросом спермиев и качеством эмбрионов. Дано описание результатов испытания следующих запатентованных авторами технологических приемов: диагностики состояния и активизации функции половых органов у доноров (акупунктура); криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред (витрификация); оценки качества спермы (акросомы спермиев); средства для приживляемости эмбрионов (капронат оксипрогестерона); способов трансплантации эмбрионов (аминазин) и профилактики эндометритов у коров (ихтиоглюкобикарбонат). Приведен расчет экономической эффективности внедрения разработок в практику животноводства.

Монография предназначена для работников ферм и промышленных комплексов, специалистов зооинженерного и ветеринарного профилей, научных работников, а также преподавателей и студентов высших и средних специальных учебных заведений.

Табл. 50.

Рекомендовано к изданию Советом УО «Гродненский государственный аграрный университет» (протокол № 2 от 13 мая 2014 г).

*Рецензенты:*

доктор медицинских наук, профессор М. Г. Величко;  
доцент, кандидат сельскохозяйственных наук А. И. Будевич

**ISBN 978-985-537-054-4**

© Горбунов Ю.А., Минина Н.Г., 2014  
© УО «Гродненский государственный аграрный университет», 2014

## Введение

В монографии представлены материалы научно-исследовательской работы, выполненной авторами в соответствии с положениями: Республиканской программы по племенному делу в животноводстве на 2011-2015 годы (утв. постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 31 декабря 2010 года № 1917); Республиканской программы развития молочной отрасли в 2010-2015 годах (утв. постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12 ноября 2010 года № 1678); Государственной программы устойчивого развития села на 2011-2015 годы (утв. указом Президента Республики Беларусь от 1 августа 2011 года № 342) [1].

Основой для достижения указанных результатов является совершенствование базы племенного животноводства до уровня развития европейских стран. При этом планируется получить 95 телят на 100 маток крупного рогатого скота, с применением искусственного осеменения и трансплантации эмбрионы коров-доноров, рекордисток по молочной продуктивности, с целью увеличения продолжительности их использования. В племенных сельскохозяйственных организациях увеличить селекционные стада коров со средней продуктивностью 9 тысяч и более килограммов молока и содержанием жира 3,6%, белка 3,2% и более (источник получения матерей быков, доноров эмбрионов) до 10 тыс. голов. При этом отбирать потенциальных коров-доноров эмбрионов с продуктивностью не менее 11000 килограммов, содержанием жира не ниже 3,6%, белка 3,2%, или равноценной продуктивностью в пересчете на молочный жир и белок в килограммах.

Другим направлением активизации работы является совершенствование специализированного молочного типа скота белорусской чёрно-пёстрой породы с использованием лучших отечественных и мировых генотипов.

Потребность в дальнейшем увеличении производства молока необходима потому, что молокопродукты могут быть использованы для обмена с другими странами на зернобелковое сырьё,

энергоносители и прочие товары. В перспективе увеличение конкурентоспособности молокопродуктов позволит республике выйти на внешний рынок со странами ЕЭС [2].

В республике разводится чёрно-пёстрый скот. Селекционно-племенную работу с ним следует вести в племязаводах в направлении дальнейшего совершенствования белорусской чёрно-пёстрой породы, животные которой адаптированы к местным условиям. В молодом возрасте они способны давать среднесуточные приросты живой массы на уровне 800-900 г, а полновозрастные коровы 6-9 тыс. кг молока жирностью 3,8-4,0% и содержанием белка 3,2-3,3%.

Основной задачей племенной работы является совершенствование генетического потенциала молочного скота, в том числе и посредством метода трансплантации эмбрионов. При этом предстоит ускорить процесс получения быков-производителей от высокопродуктивных коров племенных заводов для госплемпредприятий и генетически ценных телок – для ремонта основного стада внутри хозяйства [3].

Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота – один из биотехнологических методов ускоренного создания высокопродуктивных стад в ведущих странах с развитым молочным скотоводством (Голландия, Канада, Германия и др.). В этих странах 50-60% быков-производителей, используемых для воспроизводства стада, получены методом трансплантации эмбрионов [4, 5].

Ускорение научно-технического прогресса и успешное решение проблемы увеличения производства продукции животноводства невозможно без применения современных биотехнологических методов, направленных на ускоренное размножение животных желательного генотипа. Резервом интенсивного ведения отрасли скотоводства является возможность использования большого количества эмбрионов, извлеченных методом трансплантации у коров с высоким генетическим потенциалом, в том числе после завершения продуктивного периода или выбракованных по различным производственным причинам. В связи с тем, что в племенных хозяйствах республики ежегодно выбра-

ковывается до 30% высокоценных животных, их использование в качестве доноров эмбрионов, при продуктивности свыше 10 тыс. кг молока за лактацию, позволяет заметно повысить количество получаемого от них генетически ценного приплода.

Ведущими учеными развитых в направлении животноводства стран признается, что одним из главных путей перевода метода трансплантации на промышленную основу является криоконсервация эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации. Он имеет большое значение, как для практики ведения животноводства, так и для фундаментальных исследований. Однако, до настоящего времени отсутствуют научно-обоснованные разработки, касающиеся не только отдельных технологических элементов трансплантации эмбрионов, но в большей мере сведения их в общую технологическую цепь по созданию и практическому использованию криобанка ценных генотипов.

В настоящее время большое распространение получило применение гормональных препаратов для регуляции воспроизводительной функции у коров-доноров эмбрионов. Широко используются гонадотропины, нейротропные препараты, простагландины, прогестагены и др. Однако, применяемые медикаментозные методы не всегда эффективны, а в некоторых случаях оказывают побочное действие на организм животных, что приводит к гипертрофии яичников, снижению качества получаемых продуктов питания по причине накопления в организме остатков фармакологических средств. С другой стороны, наиболее эффективные препараты дорогостоящи и экономически невыгодны для хозяйств [6, 7, 8].

В последние годы в медицине для профилактических, диагностических и стимулирующих функцию органов целей широкое применение получили такие методы как иглоукальвание, ультразвуковое и лазерное воздействие [9]. Однако в животноводстве, и в частности у коров-доноров, физиотерапевтические методы биокоррекции репродуктивной функции посредством акупунктурного воздействия на биологически активные точки организма не отработаны. В этой связи, перспективным пред-

ставляется использование акупунктурного метода воздействия на организм животных, аналогично тому, который распространен в практической медицине.

По другим данным [10], иглоукальвание и лазерное излучение оказывают нормализующее влияние на организм животного, способствуют восстановлению ослабленных функций органов, а также стимулируют регенеративные процессы.

На важность решения вышеперечисленных проблем в разное время обращали внимание М. Rubin [11], Н.В. Михайлов [12]. В своих работах авторы указывают на необходимость изучения вопросов, связанных с применением метода акупунктуры в животноводстве, дающих возможность уменьшить, а в некоторых случаях избежать негативного воздействия гормональных стимулирующих веществ, в основном импортного производства, на организм животных.

Проведение дальнейших научных исследований может быть направлено на изучение физиологических процессов, происходящих в организме генетически высокоценных коров-доноров эмбрионов, с целью более глубокого их понимания. В ряде стран становится актуальной разработка и практическое применение метода биокоррекции их репродуктивной функции.

Научные исследования, направленные на определение влияния разных режимов воздействия иглоукальвания и лазерного излучения на организм свиноматок и разработка эффективных методов физиотерапевтической стимуляции их воспроизводительной функции полнее раскроют потенциальные возможности организма и позволят расширить область их применения.

Одним из главных путей перевода метода трансплантации эмбрионов на промышленную основу является их криоконсервация с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации. Она имеет большое значение, как для практики животноводства, так и для научных исследований. Одновременно установлено, что в условиях работы молочно-товарных комплексов снижается функция репродуктивных органов коров даже тогда, когда соблюдаются условия кормления или используются приемы фармакологической стимуляции яични-

ков. До настоящего времени отсутствуют разработки, касающиеся изучения связи между условиями содержания коров-доноров на МТК и качеством замороженно-оттаянных эмбрионов. Недостаточно изучен механизм действия моциона на организм животных, не обоснован оптимальный режим и не предложен эффективный способ его осуществления для сухостойных коров, в том числе доноров эмбрионов, что могло бы способствовать ускоренному размножению животных ценных генотипов.

Нерешенность вышеуказанных проблем в воспроизводстве, а также биотехнологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота явились основанием для проведения наших исследований. Они были направлены на изучение влияния разных видов и режимов моциона коров в сухостойный период на функциональное состояние их организма, молочную продуктивность, жизнеспособность эмбрионов и выход телят-трансплантантов.

Работа посвящена теоретическому обоснованию и экспериментальному изучению процессов: криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации, акупунктурного воздействия на БАТ, отражающих половую функцию животных, что опосредованно влияет на изменение гормонального фона, морфологические и биохимические показатели крови, уровень полиовуляции, выход эмбрионов и молодняка. Издание подготовлено по материалам научных исследований авторов, а также содержит обзорную информацию по итогам работы передовых сельскохозяйственных предприятий зарубежных стран.

## **1. Организация работы по трансплантации эмбрионов**

### **1.1. Современный уровень развития метода криоконсервации эмбрионов**

В «Концепции о приоритетах и путях повышения эффективности разработок аграрной науки в республике» рассмотрен-

ной на Президиуме ААН РБ, а также «Республиканской программе по племенному делу в животноводстве» на 2011-2015 годы указаны основные направления, на которых необходимо сосредоточить усилия научно-исследовательских институтов и ВУЗов сельскохозяйственного профиля. В зоотехнологии и ветеринарной медицине при этом требуется усиление исследований по сохранению имеющихся генетических ресурсов, созданию ценных, высокопродуктивных и устойчивых к болезням линий и типов животных на основе современных методов биотехнологии, трансплантации и генной инженерии [13, 14, 15].

В результате достижений в технологии искусственного осеменения животноводы получили мощное средство совершенствования животных, расширились возможности отбора быков с высоким генетическим потенциалом продуктивности, ускорились темпы генетического улучшения целых популяций. В процессе совершенствования поголовья резко возросла роль производителей, а влияние маток осталось незначительным из-за малого числа производимого ими потомства. Так, число потомков от одной коровы за всю её жизнь составляет в республике от 3 до 6 голов. Потомство же генетически ценных быков при искусственном осеменении может насчитывать до нескольких десятков тысяч голов. Между тем биологические возможности воспроизводства маток велики, поскольку яичники новорожденных тёлочек содержат свыше 70 тысяч потенциальных яйцеклеток. Для более полного использования этого огромного генетического потенциала в РУП «Институт животноводства НАН Беларуси» и УО «Гродненский государственный аграрный университет» ведутся исследования, направленные на реализацию возможностей трансплантации ранних эмбрионов от выдающихся по молочной продуктивности матерей, т. е. посредством пересадки их в матку реципиентов с нормальным воспроизводительным циклом, но с низкой генетической ценностью. Уже накоплен большой и ценный объём научной информации о процессах, управляющих половой функцией коров, а также о яйцеклетках и эмбрионах, получено потомство телят-трансплантантов, поэтому

можно считать, что данный метод находится на стадии внедрения в практику животноводства [16].

Трансплантация (пересадка) эмбрионов – биотехнологический метод воспроизводства, который заключается в получении нескольких эмбрионов из полового аппарата коровы-донора и пересадке каждого из них в половой аппарат реципиенту. В рожках матки реципиентов эмбрионы развиваются до самого рождения. Следовательно, возможность индукции полиовуляции у доноров позволяет при помощи реципиентов вырастить большое количество ценных потомков.

В области селекции крупного рогатого скота трансплантация обеспечивает более интенсивное размножение животных с высокой генетической ценностью. В связи с тем, что в племенных хозяйствах республики ежегодно выбраковывается до 30% высокоценных животных, их использование в качестве доноров эмбрионов, особенно при продуктивности свыше 9 тыс. кг молока, может заметно повысить результативность метода трансплантации эмбрионов. Особое значение приобретает он при выведении новых линий, типов и пород животных. Позволяет быстрыми темпами создать племенное ядро новой популяции, играет все возрастающую роль в использовании мирового генотипа. Метод способствует не только быстрому распространению и размножению ценного генетического материала, но и играет важную роль в организации работы крупных комплексов, обеспечивая более полное использование биологических резервов для повышения производства продуктов животноводства [17].

Углубленные исследования репродуктивной функции животных, ее возможная регуляция, микрохирургические манипуляции с зародышами показали, что метод трансплантации может явиться основой ускоренного воспроизводства высокопродуктивных коров и целых популяций. Практическое применение этого метода в скотоводстве обеспечивает интенсивное размножение животных с высокой генетической ценностью, ускоренное получение высокоценных племенных быков, матерями которых являются выдающиеся родоначальницы, способствует

повышению эффективности племенной работы, оздоровлению стад от ряда заболеваний.

Мировой опыт свидетельствует, что трансплантация эмбрионов может ускорить селекционный прогресс в молочном скотоводстве в 6...7 раз по сравнению с обычными методами разведения. Метод трансплантации позволяет получать зародыши от одной самки 4...5 раз в год, вследствие чего очевидна реальная возможность ежегодного получения от коровы рекордистки до 10 и более телят. Это позволяет значительно ускорить ежегодный генетический прогресс в стаде путем интенсивного отбора, точности оценки матерей быков и племенного использования животных с высоким генетическим потенциалом [18, 19].

Одним из важных путей перевода метода трансплантации на промышленную основу является криоконсервация эмбрионов. С помощью ее применения стало возможным:

- Создание криобанка ценных генотипов.
- Сохранение генетического фонда редких и исчезающих видов животных.
- Осуществление экспорта и импорта зародышей на дальние расстояния.
- Подбирать реципиентов в спонтанной охоте, когда стадия полового цикла соответствует возрасту эмбрионов. Проведение пересадок в условиях ферм, при этом, значительно снижает стоимость программы трансплантации, так как отпадает необходимость в содержании большого стада потенциальных реципиентов [20].

Одной из основных причин повреждения клеток при их замораживании, является образование кристалликов льда внутри клетки. При замораживании эмбрионов млекопитающих существенную защитную роль в сохранении их жизнеспособности играет зона пеллюцида. В связи с этим главная задача, которую нужно решить при глубоком замораживании, заключается в обезвоживании клетки. По мнению Эрнста Л.К. [21], удаление слишком большого количества воды также губительно для нее. Образование кристаллов льда в окружающей среде обуславливает увеличение осмотического давления в жидкости, которое мо-

жет уравновешиваться как проникновением солей внутрь эмбриона, так и выведением воды из него.

Наблюдалась четкая связь между скоростью охлаждения клетки и температурой при которой начинается внутриклеточная кристаллизация. Устойчивость зоны пеллюцида, состоящей из гликопротеинов, характеризуется более активным воздействием на нее в период проведения эквilibрации, тогда как сама полость зародыша подвергается сжатию и в процессе замораживания дегидрирует. Точка замораживания воды, содержащей различные ионы находится ниже 0°C и зависит от концентрации растворенных веществ. В настоящее время общепризнанно, что повреждение клетки происходит не из-за низкой температуры как таковой, а из-за образования кристалликов льда в определенных температурных зонах. При криомикроскопических исследованиях многие ученые и практические работники наблюдали характерное потемнение цитоплазмы клеток, как после замораживания, так и размораживания, что было отнесено к явлению внутриклеточной кристаллизации [22, 23].

Вещества, которые используются при криоконсервации, для компенсации воздействия низких температур, называют криопротекторами. При медленном охлаждении и оттаивании биообразцов смена жидкой и твердой фаз в клетках протекает так, что их структуры не повреждаются и клетки сохраняют жизненные свойства. Роль криопротекторов при замораживании эмбрионов заключается в стабилизирующем воздействии на клетку, то есть, во время замораживания постоянно увеличивается концентрация солей в среде и эмбрионе. Электролиты дестабилизирующе воздействуют на клеточные мембраны, а криопротекторы – низкомолекулярные неэлектролиты, не оказывают такого влияния и способны проникать через мембрану клетки. Они могут воспрепятствовать разрушению мембраны, в частности путем уменьшения концентрации электролита при заданной температуре. Криопротектор изменяет осмотическое давление среды, поэтому его следует вводить и извлекать постепенно для того, чтобы между клетками и средой установилось осмотическое равновесие [24].

Механизм действия криопротекторов впервые описал Lovelock A. [25]. Известно около 60 различных веществ, обладающих криозащитными свойствами. Сюда относятся неорганические соли, сахара, спирты, амиды и полимеры, такие как, поливинилпирролидон (ПВП), декстран, полиэтиленоксид (ПЭО), диметилсульфоксид (ДМСО), с различной молекулярной массой. По данным автора классификация криозащитных веществ различна, а разделение весьма условно, поскольку свойства их могут изменяться в зависимости от типа клеток и состава окружающей их среды. Существует разделение криофилактиков на структурирующие воду и деструктурирующие ее. Проникающие в клетку криозащитные вещества (глицерин, ДМСО, полиэтиленоксид с молекулярным весом до 400) достаточно широко используют в практической криобиологии. По наиболее обобщенной классификации имеются три вида криопротекторов:

- 1) легко проникающие в клетки (ДМСО, глицерин),
- 2) не проникающие, но осмотически активные (сахароза),
- 3) не проникающие, но осмотически не активные (ПВП).

При добавлении глицерина раствор разбавляют, что приводит к понижению концентрации солей. Точка замерзания раствора при этом заметно понижается, и при образовании льда вода как бы заменяется незамерзшим глицерином. Благодаря этому концентрация солей в жидкой фазе раствора при температуре его замерзания не доходит до опасного уровня. Кроме того, возможно глицерин, связывая остаток незамерзшей воды, способствует переходу диссоциированных электролитов в молекулярное состояние, щадящее клеточные структуры. Наконец глицерин, как и некоторые другие криофилактики, например этиленгликоль, обуславливает снижение точки кристаллизации и при дальнейшем понижении температуры способствует стекловидному затвердеванию замораживаемого объекта. По-видимому, и другие криофилактики (ДМСО и др.) эндоцеллюлярного типа действуют аналогичным образом.

Механизм действия экзоцеллюлярных криопротекторов на клетки при замораживании в настоящее время интенсивно изу-

чается. К ним относятся сахароза, гидроксиэтиловый крахмал, ПЭО высокой молекулярной массы и др.

Криопротекторы хотя и ограничивают, а также предотвращают криповреждения, но могут и сами повреждать клетки эмбриона, посредством осмотических изменений. Например, при добавлении глицерина в концентрации 1,0...1,4 М очень сильно изменяется осмотическое соотношение в среде – от 300 до 1500 осмоль. Только постепенное введение в среду криопротектора в возрастающих концентрациях дает чувствительным эмбрионам достаточно времени для осмотического привыкания. Зона пеллюцида не препятствует проникновению глицерина в бластомеры.

Наиболее подходящие для глубокого замораживания эмбрионов криопротекторы ДМСО, в концентрации 1,5 моль и глицерин – 1,0...1,4 моль. Добавляют их в среду с эмбрионами в степени 0,2-0,3 моль. Оптимальная концентрация криопротекторов различна для эмбрионов разных видов животных [26].

На первом этапе исследований по криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота применяли медленное охлаждение со скоростью 0,1...0,3 °С в мин в период охлаждения от -60 до -120 °С, затем переносят в жидкий азот (-196 °С). Оттаивают со скоростью от 2 до 10 °С в мин. В качестве криопротектора используют ДМСО в 1,5-молярной концентрации. Выживаемость эмбрионов в разных опытах колеблется от 40 до 80%. Стельность после пересадки заморожено-оттаянных эмбрионов составляет от 20 до 40%.

Считается, что предохраняющее действие криопротекторов обусловлено следующими факторами:

- уменьшением концентрации солей;
- уменьшением периода сжатия клеток при данной температуре;
- изменением пропорции замерзающего раствора при заданной температуре;
- снижением температуры эвтектической точки раствора [27].

Кроме «физической» составляющей эффективности криопротекторов, большое значение имеют химические свойства защитных сред по отношению к воде. Считается, что вода при наличии криопротекторов осмотически неактивна, однако все же является растворителем, изменяя тем самым концентрацию раствора. В то же время следует помнить, что криопротекторы оказывают многовекторное влияние на динамику возникновения, форму и размер кристаллов льда, а также на продолжительность периода рекристаллизации и т.п.

Для замораживания эмбрионов методами, которые требуют отступлений от оптимального режима дегидратации, такими как традиционное замораживание, либо посредством процесса витрификации, необходимо применение криопротектора в значительно более высоких концентрациях, в то же время изменяются и требования к самим защитным средам. Особое значение имеют такие параметры как: скорость образования стекловидной массы, стабильность при низких температурах, скорость девитрификации либо рекристаллизации [28, 29].

Традиционно используемые криопротекторы, в таких случаях, несколько менее пригодны, чем 1,2-пропандиол или 2,3-бутандиол, которые лучше подходят тем, что имеют более высокую стабильность остекленения. Необходимость использования больших концентраций защитных сред требует поиска соединений обладающих относительно невысокой токсичностью, либо образования многокомпонентных соединений криопротекторов. Сахароза, лактоза и другие криофилактики подобные им не проникающие внутрь клетки, не могут обеспечить полноценную защиту эмбрионам подвергающимся криоконсервации. Поэтому их применяют совместно с криопротекторами, которые проникают внутрь клетки. Действие основано на удалении воды из клетки – с одной стороны, а с другой, они выполняют защитную функцию по отношению к оболочкам и клеточным органеллам. В витрификационных растворах добавление сахарозы позволяет уменьшить содержание криопротекторов, проникающих внутрь клетки [30, 31, 32, 33].

В свое время большим шагом в направлении оптимизации процедуры удаления криопротекторов было использование сахарозы как супрессора негативных последствий, возникающих из-за нарушения осмотического равновесия. Применение сахарозы значительно упростило процесс удаления криопротекторов и является наиболее применяемым на практике методом. Однако, это не принесло принципиальных изменений в положительную сторону в плане сохранности зародышей. В последнее время все чаще применяются «комплексные» методы удаления криопротекторов, объединяющие достоинства обоих вариантов, например: сахароза + криопротектор → сахароза → изотонический раствор [34, 35].

Оптимизация процессов добавления, эквilibрации и удаления криопротекторов в настоящее время приобрела особое значение, равно как и процесса витрификации. Рабочие концентрации защитных сред, обеспечивающие положительные результаты, составляют 3,0...8,0 моль/л, вместе с тем кроме опасности осмотических повреждений возрастает вероятность химической токсичности для клеток. Для минимализации такой угрозы, как правило, чаще всего используется неполная эквilibрация зародышей. На практике этот эффект достигается проведением последнего этапа эквilibрации при пониженной температуре, либо регулированием временного промежутка данного процесса. Другая возможность – кратковременная (10 сек), либо 2...5 минутная эквilibрация сразу при конечной концентрации защитной среды. В тоже время используется и способ замены проникающих внутрь клетки криопротекторов на непроникающие, такие как сахароза, либо на полимеры – полиэтиленгликоль, фиколл [36, 37, 38, 39].

В связи с использованием высококонцентрированных криопротекторов, являющихся обязательным условием высокой эффективности действия витрификационной среды на находящиеся в ней эмбрионы, приобретает значение выбор, либо изо-, либо гипотоничности солей. Для их обработки применяются стандартные среды, такие как РВ1, т. е. фосфатно-буферная модифицированная среда. Одна из основных композиций такого раство-

ра содержит по 25% объема 1,2 пропандиола и глицерина. Подбирают концентрацию ионов солей в таком растворе с учетом категории молярности и воды, служащей в качестве растворителя [40].

Предпосылкой разработки криобиологической технологии замораживания свежеполученных эмбрионов, явился принцип сохранения изолированных клеток в суспензиях, например спермиев, эритроцитов и других культивируемых клеток. Проведенные многочисленные исследования позволили разработать первые эффективные методы криоконсервации эмбрионов. Они заключались в том, что скорость охлаждения составляла 0,3...1,0 °С/мин, то есть была достаточно медленной. После достижения температуры – 80...110°С осуществлялся перенос замороженных клеток в жидкий азот -196°С. Размораживание проводилось с той же скоростью. При этом различным типам клеток присущ свой режим охлаждения и оттаивания, который может быть изменен в соответствии с физиологическими особенностями строения клетки. Важный фактор в процессе замораживания эмбрионов – скорость охлаждения, которая для большинства клеток составляет 1°С в мин. Однако оптимальная скорость охлаждения, обеспечивающая необходимый уровень их выживаемости, значительно варьирует для различных видов животных [41].

Большое влияние на жизнеспособность зародышей оказывает и скорость оттаивания, которая в свою очередь зависит от скорости охлаждения. При высокой скорости криоконсервации уровень выживаемости эмбрионов выше в условиях быстрого оттаивания, при медленном охлаждении требуется медленная разморозка [42].

По результатам других исследований установлено, что в период охлаждения эмбрионов до минусовых температур, в определенный момент в среде окружающей клетку, начинается льдообразование, затем по мере понижения температуры нарастает количество экзоцеллюлярного льда. Это явление, в свою очередь, сопровождается нарастающим повышением концентрации солей в оставшемся растворе. В результате возникает разни-

ца осмотического давления в экзоцеллюлярной и эндоцеллюлярной фазах. Процесс уравнивания обеспечивается осмотической реакцией клетки, отдающей воду во внеклеточную среду [43, 44].

При определенном режиме охлаждения, с известными величинами начального объема воды в клетке, ее площади поверхности, степени проницаемости мембран и температурного коэффициента проницаемости, сегодня уже возможно вычислить объем клеточной воды на данном этапе замораживания при воздействии минусовых температур. Если клетку охлаждают достаточно медленно, то она по мере понижения температуры будет постоянно терять воду до количества, равного по осмотическому давлению экзоцеллюлярному раствору. При этом ее содержимое может сохраняться в жидком состоянии при температуре значительно более низкой, чем точка замерзания соответствующего раствора. Точка замерзания воды, содержащей различные ионы находится ниже  $0^{\circ}\text{C}$  и зависит от концентрации растворенных веществ. При замораживании клетки часть молекул воды в ней начинает кристаллизоваться, а это еще больше повышает концентрацию раствора, что в свою очередь снижает точку замораживания. Затвердевание раствора наступает в эвтектической точке температурной кривой. Этот уровень кристаллизации растворов электролитов заметно тормозится после добавления глицерина, ДМСО, способных связывать воду и, тем самым, понижать точку эвтектики. Соли остаются в водном растворе в виде сложного комплекса и при дальнейшем понижении температуры затвердевают в стекловидную массу [45].

По результатам исследований Whilmut I. [46] установлено, что пропускная способность клеточной мембраны снижается вместе с понижением температуры окружающей среды. При охлаждении в быстром режиме клетка не успевает отрегулировать осмотическое равновесие, вследствие чего по мере понижения температуры ее содержимое оказывается в условиях возросшего переохлаждения. В определенный момент начинается кристаллизация воды внутри клетки. Такое эндоцеллюлярное образование льда рассматривается авторами как первичный фактор, дей-

ствие которого обуславливает гибель клетки в процессе замораживания. Авторы указывают, что общепринятые методы сохранения эмбрионов включают в себя очень медленное охлаждение, замораживание и оттаивание. Однако современная технология предусматривает и быстрое оттаивание после такого же замораживания, что находится пока на стадии разработки и может не только значительно упростить процедуру криоконсервации, но даже производить пересадку зародышей после оттаивания без предварительной оценки их биологического качества.

Цель глубокого замораживания клеток – остановить их метаболизм в обратимой степени, с сохранением структурных элементов и временным прекращением жизнедеятельности. Принципы сохранения биологических объектов основаны на их физиологических особенностях строения. Например, поздние морулы и бластоцисты – миниатюрные организмы, клеткам которых, несмотря на их подобие, присуща в определенной степени дифференциация, относительно их расположения и функции. Жизнеспособность эмбрионов зависит не только от выживаемости клеток, но и от сохранности их отдельных структур. Существование зоны пеллюцида, перивителлинового пространства, бластополости и различия в распределении экстрацеллюлярной жидкости могут в дальнейшем привести к новым подходам к криобиологии с учетом стадии развития эмбрионов [47, 48].

По данным Schneider U., Mazur P. [49], при криоконсервации качество замороженно-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота в большинстве случаев ухудшается. Замораживание обычно производят в специальных программируемых устройствах, которые точно выдерживают скорость охлаждения и нужные температурные режимы. Этот метод называется контролируемой заморозкой и оттаиванием эмбрионов. С целью предотвращения спонтанного образования льда, метод включает в себя такой важный этап, как сидинг. Под сидингом подразумевают индукцию образования стекловидных кристалликов льда при температуре несколько меньшей точки замораживания, что предотвращает чрезмерное охлаждение. Сидинг обычно выполняется при температуре – 5...7°C вручную, путем прикосновения

пинцетом или другим предметом к пайете в том месте, где со-  
держится раствор с эмбрионом.

Температура, при которой заканчивается медленное замо-  
раживание и эмбрион переносится в жидкий азот, влияет на сте-  
пень дегидратации клеток. Так клетки, охлажденные медленно  
до температуры  $-60^{\circ}\text{C}$ , имеют высокую степень дегидратации и  
требуют медленного оттаивания ( $8\dots 20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) с целью обеспе-  
чения адекватной регидратации. И наоборот клетки, охлажден-  
ные медленно только до  $-30\dots -40^{\circ}\text{C}$ , должны быть разморожены  
быстро ( $275\dots 500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ). При оттаивании клеток фактически  
решаются две задачи – это их регидратация и удаление криопро-  
тектора. Чтобы избежать осмотического шока от быстрой регид-  
ратации, размораживаемый эмбрион помещается поэтапно в не-  
сколько растворов, содержащих все более низкие концентрации  
криопротектора.

Проведенные ранее теоретические расчеты позволили раз-  
работать первые эффективные методы криоконсервации эм-  
брионов. Они заключались в том, что скорость охлаждения со-  
ставляла  $0,3\dots 1,0^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , то есть была достаточно медленной.  
После достижения температуры от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-110^{\circ}\text{C}$  осуществ-  
лялся перенос замораживаемых клеток в жидкий азот. Размора-  
живание проводилось с той же скоростью. В скором времени  
удалось успешно заморозить эмбрионы коров, овец, крыс и кро-  
ликов [50, 51]. Эти наблюдения способствовали разработке  
классического низкотемпературного метода замораживания эм-  
брионов крупного рогатого скота, сущность которого состоит в  
трехэтапном насыщении их средой ДМСО 0,5 и 1,0М по 10 мин  
в каждом и 1,5 М растворе в течение 20 мин, затем быстрое ох-  
лаждение до  $-6^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}\text{C}$ . Принудительная кристалли-  
зация и дальнейшее замораживание до  $-36^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0,3^{\circ}\text{C}$   
в мин, затем  $0,1^{\circ}\text{C}$  в мин до  $-60^{\circ}\text{C}$ , после чего эмбрионы перено-  
сят в жидкий азот на длительное хранение. Медленная скорость  
криоконсервации ( $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) в промежутке от  $-36^{\circ}\text{C}$  до  $-60^{\circ}\text{C}$   
теоретически позволяет максимально ограничить дегидратацию  
отдельных бластомеров и предупредить разрушение эмбриона, а  
это дает возможность избежать образования внутриклеточного

льда. Такая скорость замораживания вызывает необходимость медленного оттаивания в том же температурном интервале. Слишком быстрое оттаивание приводит к повреждению клеток из-за несоблюдения времени, необходимого для регидратации, а также к возрастанию осмотического стресса (внутриклеточной гипертонии) и повреждению клеточных мембран и органоидов [52]. Некоторые разновидности этого метода до сих пор успешно применяются на практике несмотря на то, что он требует больших затрат времени, поскольку процесс криоконсервации занимает около 4-5 часов. Кроме того, предусматривается использование дорогостоящего программного замораживателя, контролирующего скорость понижения температуры [53].

Существенной модификацией, которая позволила упростить и сократить продолжительность криоконсервации и замораживания, было прекращение процесса охлаждения при относительно высокой температуре порядка минус 25-45°C, которая определяется в зависимости от применяемого криопротектора. Далее следовал перенос эмбрионов на хранение в жидкий азот [54].

Вода в клетках представляет собой стекловидную форму образований, поэтому способствует сохранности эмбрионов при -196 °С. Эти наблюдения согласуются с известной теорией о льдообразовании в клетках при замораживании. После температуры -35°C и дальнейшего быстрого охлаждения эмбрионов до t минус 196°C они способны сохранять жизнеспособность при условии быстрого оттаивания. Однако, если начать медленное оттаивание при температуре -100°C, то жизнеспособность эмбрионов, помещенных в нормальные условия, снижается уже при температуре -60 и -50 °С. Это и есть критическое состояние биообъектов, при котором происходят процессы девитрификации воды, ведущие к образованию внутриклеточных кристаллов льда, разрушающих эмбрионы. При этом наблюдается рекристаллизация и в окружающей эмбрион среде, состоящей из криопротектора ДМСО и среды Дюльбекко. Вышедшая из клетки вода не успевает выровняться по концентрации солей с окружающим раствором. В определенный момент вся поверхность

эмбриона покрывается водой, что может быть причиной рекристаллизационных процессов, наблюдаемых на внешней стороне оттаиваемого зародыша [55].

Среда с эмбрионом находится в пайете, помещенной в морозильную камеру, температура в которой понижается с заданной скоростью. При достижении точки замерзания среды она, как правило, замерзает не сразу. Происходит некоторое переохлаждение, обусловленное отсутствием в среде кристаллизационных очагов, в которых могли бы образоваться кристаллы. Лишь при охлаждении на несколько градусов ниже точки замерзания начинается внезапное образование кристаллов. Высвобождающееся при кристаллизации тепло поднимает температуру, что создает ее большой перепад между средой и охладителем и приводит к быстрому охлаждению среды.

Автор считает, что можно избежать переохлаждения среды, если при достижении точки замерзания или сразу же по прохождении ее появляются кристаллизационные центры, для чего в раствор вводят небольшой кристаллик льда. Этого можно достигнуть и путем сильного внешнего охлаждения стенки пайеты, например, обжатием пинцетом, предварительно охлажденным в жидком азоте. При этом вначале образуется кристаллизационное облако, а затем – кристаллизация по всей пайете. В современной интерпретации это явление получило название «сидинг», т. е. индукция образования стекловидных кристалликов льда при температуре  $-5...7^{\circ}\text{C}$ .

По данным Коркина В.А. и Бугрова А.Д. [56], а также Willadsen et al. [57], точка замерзания разбавленного раствора ниже  $0^{\circ}\text{C}$ , и тем ниже, чем выше концентрация растворенных веществ. При замерзании раствора выделяется чистая вода в виде кристаллов льда, растворившиеся же вещества по-прежнему остаются в растворе. С вымерзанием части воды концентрация растворившихся веществ в оставшейся жидкой фазе возрастает, в связи с чем точка замерзания жидкой фазы понижается. При дальнейшем охлаждении оставшаяся чистая вода вымерзает, и все больше возрастает концентрация солей в оставшейся жидкой

фазе пока, наконец, раствор полностью не замерзнет на эвтектической точке.

Белоус А.М. и др. [58], Rall W.F. et al. [59], установили что эмбрион, который на 20% состоит из твердых составных частей и на 80% из воды, подвержен двум негативным влияниям – образованию интрацеллюлярных кристаллов и воздействию высоких концентраций солей. В связи с повышением их концентрации в частично замерзшей среде из эмбриона выделяется вода, а в результате в нем повышается количество интрацеллюлярной жидкости и точка замерзания понижается. При медленном обезвоживании эмбриона затрудняется образование льда. Предпосылка этому – медленное охлаждение, при котором достаточно времени для выведения воды. Подходящей скоростью охлаждения, обеспечивающей медленную отдачу воды, является 0,3 °С/мин, поскольку при быстром изменении температуры, в период заморозки пайеты с эмбрионом, эта скорость значительно бы увеличилась. Поэтому принудительная кристаллизация нужна для того, чтобы избежать интрацеллюлярного образования льда. При оттаивании обезвоженного эмбриона процесс переходит в свою противоположность. Благодаря отсутствию процессов переохлаждения скорость оттаивания может быть больше – около 10°С/мин.

В процессе оттаивания эмбрионов при их дефростации, на границе поверхности клетки и окружающей ее среды устанавливается концентрационный градиент, который обуславливает движение воды снаружи вовнутрь. Быстрое оттаивание, как правило, ведет к разрушению клеток. В этом процессе решающим фактором является осмотический шок. С другой стороны, при сравнительно быстром охлаждении объекта (более 1°С/мин), когда вода не успевает покинуть клетки, медленное оттаивание также может стать причиной разрушения клеточных структур в связи с тем, что возникшие кристаллы льда становятся центром рекристаллизации [60].

Криобиология дает определение, что размер кристаллов зависит от скорости замерзания воды. Чем выше скорость снижения температуры и большее количество кристаллизационных

центров возникает, тем мельче будут образовавшиеся кристаллы.

В связи с этим Wood M.J., Farrant J. [61] провели исследования, с целью определения зависимости между скоростью замораживания эмбрионов и скоростью оттаивания. Выявлено, что двухступенчатое замораживание до  $-35^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , при условии дальнейшего погружения эмбрионов в жидкий азот, наиболее эффективно. Сохранение жизнеспособности эмбрионов, при таком режиме криоконсервации, может обеспечить быструю дефростацию. В противоположность этому, при медленном замораживании до полного затвердевания биологического объекта (до  $-60^{\circ}\text{C}$ ), более надежным, по данным исследований указанных авторов оказалось медленное оттаивание ( $4-12^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ). Такая закономерность, по видимому, объясняется процессами дегидратации и витрификации при медленном замораживании – с одной стороны и последующей дегидратации в процессе медленного оттаивания, мелкозернистой кристаллизацией льда внутри клеток при быстром оттаивании – с другой. Это способствовало сохранению жизнеспособности субклеточных структур. В результате многолетних исследований авторы обозначили два основных направления в разработке методов криоконсервации эмбрионов сельскохозяйственных животных:

1) Медленное охлаждение биологического объекта при минусовой температуре, когда процесс замораживания сопровождается дегидратацией клеток, с последующим переходом в твердое состояние. Метод медленного замораживания включает и медленное оттаивание эмбрионов, при котором регидратация клеток происходит постепенно и их тонкая структура, а также биохимический и физиологический потенциал остается неизменным;

2) Эмбрионы, при переходе на минусовые температуры, медленно охлаждают, приблизительно до  $-38...40^{\circ}\text{C}$ , а затем быстро замораживают в жидком азоте. При этом методе полной дегидратации клеток не происходит, и поэтому оттаивают их быстро, помещая эмбрионы на несколько секунд в водяную баню при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .

Очень низкий процент выживаемости эмбрионов при их криоконсервации стимулировал поиск совершенно новых подходов. Большие надежды возлагаются на разрабатываемый в настоящее время метод ультрабыстрого замораживания. Пробные исследования составов реагентов и условий такой криоконсервации начались с конца 90-х годов. В настоящее время это направление исследований получило значительное развитие и в ближайшие годы оно будет приобретать все большее значение в биотехнологии трансплантации эмбрионов. При ультрабыстрой криоконсервации происходит витрификация т. е. остекление цитоплазмы, что означает замораживание без образования кристалликов льда. Метод требует высоких концентраций хорошо проникающего сквозь мембрану криопротектора, в сочетании с малопроницаемыми растворами, для дегидратации клеток. Процесс витрификации заключается в помещении эмбрионов на короткое время (чтобы избежать токсического действия) в витрификационную среду с последующим замораживанием с очень высокой скоростью. Витрификационные среды обычно содержат высокие концентрации этиленгликоля (40%), фикола (18%) и сахарозы (10%) или только этиленгликоля и сахарозы [62, 63].

Первые пробы использования явления остекления (витрификации) жидкостей (растворов) для криоконсервации биоматериала были предприняты еще в 1938 году Луэтом, о чем сообщает Agar A. [64]. Использование его на практике, требует добавления нескольких криопротекторов, причем их общее содержание в растворе, как правило, превышает рубеж в 50%. Интерес исследователей, изучающих процесс витрификации для криоконсервации эмбрионов, вызывает оптимизация состава витрификационных растворов. Наиболее значимыми показателями при этом являются: минимальное время остекления и его стабильность, а также минимальная токсичность данного состава для эмбрионов.

Наиболее удачный состав витрификационной среды предложен основоположниками данного метода Rall W. и Fahy G. [65]. Раствор имеет название VS-1 и содержит ДМСО и ацетамид (в концентрациях по 2,6 моль/л), пропандиол (1,3 моль/л) и

6% полиэтиленгликоля, то есть в сумме 6,5 моль/л криопротекторов, проникающих в клетки, плюс полимер облегчающий процесс витрификации. VS-1 – оказался эффективным при криоконсервации эмбрионов мышей, а после проведения некоторых модификаций, путем изменения концентрации отдельных компонентов, он стал также эффективным и при использовании процесса витрификации эмбрионов крупного рогатого скота.

В настоящее время он еще редко применяется в первоначальном виде, в том числе его создателями. Усовершенствование данной витрификационной среды проводится в двух направлениях. Первое, авторское, оставляет первоначальный полимер, либо замещает его бычьим сывороточным альбумином (BSA, 6%), в тоже время вместо смеси защитных сред, оно предполагает использование одного криопротектора (пропандиол либо глицерин) в концентрации 6,5 моль/л. Второе направление модификации основывается на отказе от использования полимера, не считая небольшого содержания BSA, либо сыворотки в модифицированных версиях PBS (солевая буферная среда), чаще всего используемых как базовые растворы. В них использовались DMSO, ацетамид и пропандиол в концентрациях соответственно 2,1 и 3 моль/л, отсюда и название этой среды – DAP 213. Она используется в основном для витрификации ооцитов мышей и скота [66-69].

Несколько иной состав витрификационной среды (по 25% глицерина и пропандиола в PBS т.е. примерно по 3,4 моль/л) предложен для витрификации эмбрионов мышей и крупного рогатого скота. Эта среда до недавнего времени интенсивно тестировалась и показала очень хорошие результаты по предохраняющему действию на эмбрионы мышей, а также по отношению к эмбрионам овец. После увеличения концентрации защитных сред (до 30...35%) данный раствор также оказался вполне эффективен при замораживании с использованием процесса витрификации [70-73].

Более серьезной модификацией витрификационной среды было замещение части криопротекторов, проникающих внутрь клетки, сахарозой, в концентрации 1,0 моль/л. Роль сахарозы

здесь такая, как и при непосредственном замораживании – частичная дегидратация эмбриона. Однако, несмотря на уменьшенную концентрацию глицерина и пропандиола, соответственно 10 и 20% (т.е. в сумме 4,1 моль/л), этот раствор используется как витрификационный. Так называемый VM (vitrification medium), то есть средство, содержащее 70% изотонического раствора соли в комплексе с глицерином и пропандиолом (10 и 20% соответственно), оказался эффективным в процессе витрификации эмбрионов кролика и овец. При этом установлено, что среди ныне известных витрификационных сред, VM содержит относительно меньшее количество проникающих внутрь клетки криопротекторов. Подобные результаты получены в исследованиях ряда других ученых, которые применили в процессе витрификации эмбрионов мышей и овец сахарозу в концентрации 1 моль/л вместе с этиленгликолем в концентрации 5,5 моль/л [74, 75].

Scheffen B. et al. [76] впервые описали новый состав витрификационной среды (EFS) имеющей следующий состав: этиленгликоль (40%), сахароза (0,3 моль/л), добавка Ficoll-u (18%). После 2...5 мин эквilibрации они получили высокую (около 90% *in vivo*) выживаемость эмбрионов мышей и кроликов, подвергнутых криоконсервации с применением процесса витрификации. После этого EFS успешно применяется и для витрификации эмбрионов КРС на стадии бластоцисты.

Горбунов Л. В. и др. [77, 78] также отмечают, что использование глицерина в концентрации 30% помогает проводить ускоренное замораживание эмбрионов. Однако авторы предлагают применять для этого специальные конверты, изготовленные из алюминиевой фольги при концентрации глицерина 20...25%, а также полиэтиленовые конверты при 25...30%.

Оценка эффективности различных составов витрификационных сред, состоящих, как правило, из двух криопротекторов проникающих внутрь клетки, позволяет отметить положительные свойства композиций препаратов имеющих в своем составе: этиленгликоль (4,5...6,0 моль/л) и ДМСО (3,4 моль/л), либо глицерин (1,8 моль/л). Применение 2,3-бутандиола, имеющего очень хорошие физические свойства весьма ограничено из-за его

значительного токсического воздействия его на эмбрионы. Установлено, что в условиях производства, особенно в пастбищный период, когда животные находятся в летнем лагере, наиболее перспективным является метод замораживания эмбрионов с использованием процесса витрификации. Для этого их, после непродолжительной эквilibрации, помещают в витрификационную среду, которая содержит высокую концентрацию криопротектора, а затем сразу погружают в жидкий азот. При использовании данного процесса витрификации исключается необходимость в приобретении и использовании дорогостоящего оборудования, тем самым снижается стоимость заморожено-оттаянных эмбрионов. Автор разработал и впервые для стран СНГ предложил технологию замораживания эмбрионов крупного рогатого скота с использованием процесса витрификации, которая заключается в следующем. После извлечения, поиска и морфологической оценки эмбрионы помещают в культуральную среду, которая содержит 10% глицерина и выдерживают их в ней 7...10 минут. Потом переносят в витрификационную среду, в состав которой входят культуральная среда, сахароза, бикарбонат натрия, фетальная сыворотка, глицерин. Окончательная концентрация среды составляет 30%. Эмбрионы выдерживают в ней не более 30 секунд, затем помещают в заранее маркированную пайету, в которую вводят 0,5 м раствор сахарозы и витрификационную среду с эмбрионом. Отношение витрификационной среды к среде с 0,5 М раствором сахарозы составляет 1: 16; 1: 18. После заправки пайету погружают в жидкий азот.

По материалам исследований проведенных представленным Безуглым Н.Д., Медведовским О.В. [79], Будевичем А.И. [80], Нови Л. и др. [81], одной из важнейших задач в повышении эффективности технологии криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота, является снижение трудоёмкости и затратности метода. При этом указывается на возможность осуществлять пересадку заморожено-оттаянных эмбрионов без их предварительной морфологической оценки, используя при этом специальный состав криопротекторов. В результате установлено, что с использованием 1,5 М раствора этиленгликоля для заморозки

эмбрионов их приживляемость методом «прямой пересадки», т.е. без предварительной микроскопической оценки морфологического качества, составила 44,4%. В более ранних своих исследованиях авторы указывают, что «прямая пересадка», без предварительной визуальной оценки заморожено-оттаянных эмбрионов, может способствовать повышению результатов приживляемости зародышей и не отличается по исполнению от техники искусственного осеменения ректо-цервикальным способом в пайетах.

Таким образом, приведенный анализ достижений науки в области трансплантации эмбрионов позволяет сделать вывод о растущем интересе ученых и производителей к применению процесса витрификации в общей технологии криоконсервации. Это, в будущем, приведет к появлению новых методов, используемых в практике животноводства. Данное направление науки позволит применять преимущество процесса витрификации как общедоступный, относительно дешевый метод криоконсервации не только эмбрионов, но и значительно менее поддающихся заморозке яйцеклеток млекопитающих. Одновременно авторами отмечается необходимость дальнейшей разработки и совершенствования методов криоконсервации в направлении их надёжности и результативности, а также использования наиболее безвредных криопротекторных сред. Особый интерес вызывает применение таких приемов и методов, которые позволят значительно сократить продолжительность криоконсервации и при этом исключить до минимума вероятность физических и термических повреждений структурных элементов зародыша, вызванных межклеточной и внутриклеточной кристаллизацией. Однако для этого необходимо знать, какие основные факторы оказывают влияние на рост, развитие и, в целом, на приживляемость заморожено-оттаянных эмбрионов у реципиентов.

## **1.2. Индукция полиовуляции и определение оптимального времени осеменения коров-доноров**

Гормональная система животного связана со всеми органами и системами организма, поэтому уровень гормонов в крови

может зависеть от различных внешних воздействий и изменений в организме животного.

Знание особенностей нейрогуморальной регуляции половой функции является теоретической основой для разработки практических приемов управления ею. В настоящее время зооветспециалисты хозяйств располагают гормональными препаратами, которые позволяют индуцировать охоту и полиовуляцию у коров, находящихся в определенной стадии полового цикла. Например, наиболее высокая эффективность стимуляции возможна лишь при обработке животных в фолликулярной фазе полового цикла [82, 83, 84]. В тоже время индуцированная овуляция в лютеальной фазе не обеспечивает необходимого уровня оплодотворяемости и дальнейшего нормального развития эмбрионов, поскольку в организме донора в это время находится большое количество гормона прогестерона, а фолликулы яичников содержат недостаточно зрелые яйцеклетки [85, 86, 87].

Процесс воспроизводства основывается на комплексе биологических и физиологических закономерностей. В результате сложного взаимодействия между нервной и гуморальной системами создается сложный регулирующий механизм управления функцией размножения. В настоящее время разработаны и внедрены в практику гормональные методы воздействия на процесс воспроизводства и его управление [88, 89, 90, 91, 92].

Чаще всего, для вызывания полиовуляции у крупного рогатого скота используются гонадотропные препараты (гонадотропин сыворотки жеребых кобыл – ГСЖК – плацентарный и фолликулостимулирующий гормон – ФСГ – из гипофиза животных), для синхронизации половых циклов – аналоги простагландина Ф<sub>2</sub>-альфа (эстрофан, магэстрофан, клопростенол, суперфан, ремофан, клатрапростин, эстуфалан и др.) [93, 94]. Препараты ГСЖК обладают комплексной фолликулостимулирующей и лютеинизирующей активностью. Период полураспада экзогенного ГСЖК у коров составляет около 6 дней. Соотношение ФСГ и ЛГ в различных партиях неодинаковое, что сказывается на результативности полиовуляции. Стимуляция роста фолликулов препаратами ГСЖК сопровождается, как правило, увеличением

массы яичников, образованием после овуляции разного числа и величины желтых тел. Из-за длительного распада ГСЖК в крови животных накапливаются повышенные концентрации гормонов. Изменение эндокринного статуса при индукции полиовуляции может оказывать неблагоприятное действие на оплодотворяемость яйцеклеток, развитие зародышей, а также на физиологическое состояние половых органов (в частности, наблюдается кистозное их перерождение) [95, 96, 97]. Для исключения длительной стимуляции роста фолликулов применяется анти-СЖК. Обработка антисывороткой в день проявления охоты нейтрализует циркулирующую в крови животных ГСЖК и тем самым прекращает дальнейшую стимуляцию роста фолликулов в яичниках. Это создает более благоприятный фон для овуляции, оплодотворяемости яйцеклеток и последующего развития зародышей. В практике используются стандартные гонадотропные препараты высокой степени очистки: сергон (Чехия), фоллигон (Голландия), прегмагон (Германия). Эти препараты инъекцируют донорам на 11-12-ый день полового цикла, однократно, в дозе 50 И.Е. на 100 кг живой массы животного. Применение этих гонадотропинов обеспечивает вызывание множественной овуляции у 75-78% животных и получение в среднем 3,5-4,0 жизнеспособных эмбрионов на донора [98-101].

Для вызывания полиовуляции у коров используются также гипофизарные препараты. Основное физиологическое действие фолликулостимулирующих гормонов – регулирование процесса течки. Лютеинизирующий гормон, совместно с фолликулостимулирующим, вызывает овуляцию и стимулирует образование желтого тела. Желтое тело само выполняет функцию гормональной железы и вырабатывает гормон прогестерон, который обеспечивает сохранение беременности. В практике используются гипофизарные препараты производства США (ФСГ-п), России (ФСГ-Супер) и др. В отличие от ГСЖК, препараты ФСГ вводятся многократно, так как период полураспада ФСГ очень короткий (5-6 ч). Применение ФСГ в сочетании с простагландинами обеспечивает получение 5-6 жизнеспособных эмбрионов и 10-12 овуляций на донора [102, 103]. Оптимальными параметра-

ми использования гипофизарных гонадотропинов являются: доза ФСГ-п – 40-50 мг, ФСГ-Супер – 50 А.Е., фолликотропина – 480 М.Е., фоллитропина – 1200 ЕД. Начало экзогенного их введения – 10-12-ый день полового цикла; инъекция аналога простагландина – Ф2-альфа – на 3-й день от начала обработки в дозе 750 мкг [104].

Совершенствование схем индукции полиовуляции фолликулов в яичниках у коров-доноров все чаще требует изыскания новых подходов к решению данной проблемы, поскольку не исключает образования в яичниках не овулировавших фолликулов, наличие которых приводит к нарушениям гормонального статуса доноров [105]. С целью исключения длительной стимуляции роста фолликулов и наступления одноэтапной овуляции фолликулов рекомендуются синтетические аналоги гонадотропин рилизинг-гормона (Гн-РГ). Инъекция донору Гн-РГ в день охоты способствует выделению лютеинизирующего гормона и овуляции в фиксированное время [106, 107, 108].

Многолетний опыт работы в Беларуси показал, что инъекция Гн-РГ (25 мкг сурфагона или 200 мкг диригестрана) в 2-3 раза снижает число не овулировавших фолликулов, повышает на 6-9% количество овуляций и на 11-19% число эмбрионов, пригодных к пересадке в расчете на одного донора.

На современном этапе в республике и странах ближнего зарубежья для вызывания полиовуляции у коров-доноров широко используется гипофизарный гонадотропный препарат высокой степени очистки – ФСГ-супер. По сообщениям ряда авторов [109, 110], ФСГ-супер обеспечивает получение полиовуляции у 70-75% обработанных коров, однако обладает высокой вариабельностью как по числу вызванных овуляций (9,0-16,0), так и выходу полноценных эмбрионов (4,1-6,8). Существенными недостатками при использовании гонадотропина ФСГ-супер являются: трудоемкость обработки, наличие не овулировавших фолликулов и стрессовые воздействия на донора в виду многократных (до 8-10) инъекций препарата, что обусловлено коротким периодом инактивации его в организме животного [111].

В ходе проведенных исследований установлена возможность и высокая эффективность вызывания полиовуляции у коров-доноров путем однократного введения общей дозы ФСГ-супер в комплексе с 4% раствором декстрана. Полученные результаты свидетельствуют о превосходстве опытной группы доноров (на 6,3%) по количеству положительно реагирующих полиовуляцией животных по сравнению с контрольной. Так, из 9 коров, обработанных ФСГ-супер пролонгированного действия, 7 реагировало (77,7%), в то время как из 14 коров после многократного введения стандартного ФСГ-супер реакция на гонадотропин отмечена только у 10 животных (71,4%). По числу овуляций у доноров опытной и контрольной групп получены примерно одинаковые результаты (11,0 против 10,7). Более высокая вариабельность по числу овуляций, вызванных однократной инъекцией (74,2%), по сравнению с многократными инъекциями ФСГ-супер (65,5%), вероятно, объясняется индивидуальной чувствительностью коров-доноров на гонадотропины [112].

Важным критерием оценки эффективности применения различных схем индуцирования полиовуляции у коров-доноров, помимо качественных и количественных характеристик эмбриопродуктивности, является последующая приживляемость пересаженных реципиентам эмбрионов. Уровень приживляемости зародышей отличного, хорошего и удовлетворительного качества в контрольной группе был 83,3, 58,3 и 25,0%, а в опытной – 62,5, 60,0 и 20,0% соответственно.

Рябых В.П. и др.[113] с целью получения максимального количества зародышей предложили методику дополнительной обработки коров малыми дозами ФСГ в начале лютеиновой фазы полового цикла, что позволяет стимулировать развитие поверхностных фолликулов. В других исследованиях [114, 115] была сделана попытка замены гипофизарного ФСГ гонадотропином СЖК. Выход полноценных эмбрионов составил 4,6 на донора, однако увеличилось количество дегенерированных эмбрионов и яйцеклеток.

Установлена возможность высокой эффективности вызывания полиовуляции путем введения ФСГ-супер как отдельно, так

и в комплексе с 4% раствором декстрана, позволяющая вызвать полиовуляцию у 77,7% обработанных коров с получением в среднем на донора 11,0 овуляций, выходом качественных зародышей в расчете на одного положительного донора 5,86 или 70,7% от общего числа извлеченных эмбрионов, состав которых отличается высокими оценочными критериями: 88% зародышей соответствуют категориям отличного и хорошего качества [116]. В целом при сравнительном анализе эффективности использования пролонгированного и стандартного ФСГ-супер для вызывания суперовуляции у коров-доноров не установлено существенных различий по числу вызванных овуляций, ановуляторному состоянию фолликулов, выходу биологически полноценных эмбрионов и их последующей приживляемости [117, 118, 119].

Оценку биологической полноценности эмбрионов крупного рогатого скота можно проводить несколькими методами: морфологическим, с использованием специальных красителей и культивированием. Наибольшее распространение получил морфологический метод. Установлено, что результаты имплантации зародышей зависят от того, насколько полно оценена их жизнеспособность. Работу с эмбрионами проводят в стерильных условиях в специальном помещении - боксе при температуре воздуха +22 - +25<sup>0</sup>С.

Эмбрионы с асинхронным дроблением, с бластомерами разной величины, с повреждением прозрачной оболочки, с лизисом бластомеров и нарушением связи между ними, а также с множественными включениями в перивителлиновом пространстве не пригодны для трансплантации. Для неоплодотворенной яйцеклетки характерна однородность клеточной массы, округлая форма, отсутствие бластомеров. Для морфологической оценки качества морул и бластоцист рекомендуется 5-ти балльная шкала: *отличные* – эмбрионы сферической формы, стадия развития соответствует возрасту, зародышевые клетки однородные по размеру и цвету; *хорошие* – эмбрионы соответствуют стадии развития, но имеются небольшие отклонения: неправильная форма, наличие незначительных включений в перивителлиновом пространстве, выделение одного или нескольких бластомеров,

увеличение перивителлинового пространства; *удовлетворительные* – эмбрионы имеют клетки со структурными отклонениями, деформированные бластомеры, в перивителлиновом пространстве мертвые клетки; *условно-годные* – эмбрионы с деформированной прозрачной оболочкой, частичным разрушением бластомеров, нарушением связи между ними, фрагментацией цитоплазмы, сжатием бластомеров; *неудовлетворительные* – эмбрионы, отстающие в развитии, со структурными нарушениями, имеющие клетки разного размера, дефекты прозрачной оболочки (сколы, трещины), содержат включения в перивителлиновом пространстве [120].

Не менее важным, а может и определяющим фактором при отборе доноров, является объективная диагностика состояния их репродуктивных органов. Причем, для гормональной обработки следует отбирать животных не ранее, чем через 2,5-3 месяца после отела. При этом уменьшение размеров матки до первоначальных (дородовых) размеров не может служить гарантией готовности давать эмбрионы высокого качества. Такой гарантией может быть, например, проведение исследований физико-биологических свойств точковой слизи во время охоты, которое дает возможность своевременно определить готовность половых органов к зачатию [121].

В результате исследований установлено, что состояние всех участков половых путей и физико-биологические свойства секреции слизистых оболочек у самок закономерно связаны с функцией их яичников. На этом основаны методы, пользуясь которыми можно определить оптимальные для зачатия сроки осеменения коров. Известно много других аналогичных методов: по рефлексу неподвижности у коров, интенсивности покраснения слизистой оболочки влагалища, прозрачности или степени помутнения выделяющегося из половых путей самки секрета, времени, прошедшему после начала охоты. Реже используют для этого ультразвуковой диагностический прибор, коров с кистами яичников (нимфоманок) и специально подготовленных собак, наблюдение за поведением животных с помощью телевидения и др. [122, 123]. Однако органы чувств не мо-

гут с достаточной точностью определить качественные и количественные изменения, происходящие в половых путях самок [124,125]. Ограниченность органов чувств компенсируется посредством применения приборов. Приборы – важнейшие средства исследования микропроцессов, которые недоступны непосредственному восприятию человека. Так, более точный результат можно получить по микроскопической картине кристаллизации секрета половых путей самки, взятого у коровы во время течки, а также изменению его степени вязкости и эластичности посредством специальных приборов. Причём, для успешного использования искусственного осеменения очень важно точное определение половой охоты. Ошибки в наблюдениях и интерпретациях признаков эструса приводят к значительным экономическим потерям, выражающимся, в частности, в увеличении межотёльного периода. Считается, что убытки при пропуске одного полового цикла (21 день) составляют 16 фунтов стерлингов. По другим данным, каждый лишний день сверх 365 дней периода между отёлами обходится в дополнительные 850 лир.

Низкое содержание прогестерона в молоке не является положительным индикатором эструса, а высокая концентрация – определённое подтверждение его отсутствия, несмотря на то, что животное может проявлять признаки эструса (ложная охота). Для коров, находящихся вне или близко к эструсу, варьирует от 0 до 60% животных в стаде [126]. Важнейшей проблемой для современных промышленных комплексов является проявление «незаметной» или «тихой» охоты у коров. При почти 50% овуляций симптомов течки и охоты не наблюдается. В целом у 80% обследованных животных не менее 1 раза наблюдалась «незаметная» охота.

Считается, что на проявление симптомов в значительной степени влияет обеспечение животных энергией. В течение первых недель после отёла баланс энергии отрицательный, поскольку именно высокопродуктивные коровы на ранней стадии лактации уже не могут получать необходимую энергию с кормом [127, 128]. Чтобы компенсировать дефицит энергии механизм обмена веществ мобилизует собственные запасы энергии в

виде жира, а это сказывается на гормональном балансе, поскольку прогестерон в виде жирорастворимого гормона в период образования жёлтого тела в значительном количестве накапливается в жире. Усиленная мобилизация в период течки приводит к заметному повышению минимальной концентрации прогестерона в крови и молоке, которая может быть достаточной для подавления симптомов охоты. В хозяйствах, где ведут трёхкратное наблюдение за охотой, удалось выявить до 90% случаев охоты, но, несмотря на это, искусственное осеменение иногда всё равно проводили не в оптимальные сроки. Слабо выраженные симптомы течки и недостаточное распознавание клинических признаков охоты обуславливают высокий процент ошибочного осеменения. Например, 45,4% всех проведённых осеменений не привели к зачатию. Почти половина этих осеменений была проведена в ошибочные сроки (36,7% – слишком рано, 11,5 – в период образования жёлтого тела). Для устранения потерь, связанных с неправильным определением оптимального времени осеменения, которые только в Германии составляют 0,5 млрд. евро в год, следует проводить контроль с момента проявления течки путём однократного, в течение дня, взятия пробы молока. Минимальные различия в содержании прогестерона в период течки можно определить с помощью чувствительного радиоиммунологического метода (РИА). Этот метод выявления оптимального времени осеменения наиболее точный, эффективный и распространённый в европейских странах [129, 130, 131, 132].

В ряде других исследований установлено, что наибольшая оплодотворяемость после осеменения была при низких концентрациях прогестерона в молоке, однако 25,6% коров на фермах и 37,7% в приусадебных хозяйствах оплодотворялись при высоком уровне прогестерона (28,8 ммоль/л), предельном для нормальной активности жёлтого тела. Важным этапом в развитии РИА-метода стало появление публикаций, сообщающих, что определение прогестерона в молоке можно использовать для диагностики патологических изменений в яичниках. Проблема в том, что часто трудно дифференцировать овариальные кисты на фолликулярные и лютеиновые посредством пальпации. Однако, ес-

ли овариальная киста определена пальпацией, дифференцирование можно провести, определяя концентрацию прогестерона в молоке. Коровы, в молоке которых концентрация прогестерона низкая, имеют фолликулярные кисты, высокая – лютеиновые кисты. Наличие фолликулярных кист можно проконтролировать путём двукратного взятия проб с интервалом 7 дней, т. е. в день проведения искусственного осеменения и на 7 день. Отсутствие увеличения показателей свидетельствует о наличии кисты [133].

Путём определения концентрации прогестерона методом РИА также была установлена связь укороченных половых циклов с сезоном года или молочной продуктивностью [134, 135]. Это дало возможность установить интервал от отёла до начала лютеиновой фазы эстрального цикла. Авторы утверждают, что в настоящее время не существует единого мнения относительно времени суток отбора проб молока или крови для определения в них гормонов. Аналогичная ситуация сложилась и для методов подготовки взятых проб. Такой неупорядоченный подход приводит к тому, что процент правильной диагностики носит весьма переменный характер – на уровне от 70 до 90% [136].

Более точный результат можно получить путём измерения физико-биологических свойств цервикального точкового секрета коров, которые существенно изменяются при смене физиологического состояния организма и функции матки и яичников. Выяснено, что эти изменения, происходящие в период течки и охоты, наиболее связаны с оплодотворяемостью. Эпителиальные клетки шейки матки и верхней части влагалища постоянно секретуют в период между течками, а также во время беременности слизистый секрет, который отражает физиологическое состояние половых органов животных, указывает на определенные изменения протекающих процессов в матке и яичниках. Основной компонент, который его образует – муцин или гликопротеины – вещества, молекулы которых состоят из углеводной части, т. е. гликозаминогликана и белка, связанных между собой ковалентной связью. Поэтому к отличительным физико-биологическим свойствам муцина относится способность давать метохромазию (свойство клеток и тканей окрашиваться в присутствии

хромотропных веществ в тон, отличающегося от цвета красителя). В биологических объектах такими хромотропными веществами чаще являются мукополисахариды или гликозаминогликаны. Это объясняется полисахаридной структурой углеводной части муцина. Эпителиальный муцин играет роль биологических протекторов, защищающих слизистые оболочки от физических воздействий внешней среды, проникновения в половые органы микробов и вирусов.

Установлено, что во время беременности в цилиндрических клетках эпителия шейки матки под влиянием эндогенного прогестерона происходит накопление густой слизи (муцина), которая затем выталкивается в канал шейки матки, где образует пробку из густой уплотнённой желтоватой массы. Первая половина течки характеризуется наличием большого количества стекловидно-прозрачного секрета во влагалище. Он в начале загустевает, а затем теряет слизистый характер и образует мазеподобную консистенцию. Секрет имеет способность на начальном этапе проявления течки впитывать в себя большое количество жидкости, выделяемой слизистой оболочкой шейки матки, в связи с чем концентрация гликопротеинов и плотность секрета заметно снижаются. Так продолжается на протяжении всего периода охоты. По её окончании, когда набухание переходит в пептизацию, он теряет эластичность и становится вязковатой жидкостью, слабопроницаемой для сперматозоидов. Установлено, что основной компонент слизистых секретов животного происхождения – муцин, который содержится в слюне, секретах слизистой оболочки желудка. Из цервикальной слизи выделен муцин, который сходен со специфическими мукопротеидами, но имеются указания на незначительные отличия в составе углеводного компонента цервикального мукопротеида, выделяемого при беременности [137].

Наиболее тесно коррелировала с оплодотворяемостью эластичность точковой слизи, измеряемая специальным прибором “эластомером”. При наивысшей эластичности оплодотворяемость достигала 90%. По мнению авторов, она наиболее отчётливо связана с результатами осеменения и по этому показателю

можно с высокой степенью точности судить о готовности самки к зачатию. Получают максимальную оплодотворяемость (88%) при показателе эластичности слизи от 21 до 30 см. Такой показатель достигается в момент установления охоты быком-пробником, т.е. в первой её половине. Если до 2 часов от её начала эластичность слизи составляла 16,7 см, то через 6 часов она становится самой эластичной – 24,7 см. Повышение было статистически достоверным. Изменение эластичности в период охоты авторы объясняют тем, что в полимерных макромолекулах муцина (гликопротеинов) при набухании разрываются некоторые молекулярные связи и в структурной решётке слизи эти связи между полипептидными цепями становятся более разряжёнными, пружинящими. При дальнейшем оводнении студня эти пружинящие связи разрушаются и набухание его переходит в пептизацию. При изучении микроскопической картины сухих неокрашенных мазков цервикального секрета было установлено, что образующиеся при его высыхании формы кристаллизации отражают физиологическое состояние животного. Способность слизи из цервикального канала образовывать кристаллы на предметном стекле была названа феноменом «листа папоротника» [138, 139].

Известно, что созревание фолликула во время охоты сопровождается нарастанием эстрогенов в организме, которые стимулируют секрецию шейных и вестибулярных желез. Такая же картина наблюдается и в случае повышения тонуса парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. Во время наибольшей готовности организма коровы к зачатию, степень ослизнения достигает своего максимума, что создаёт благоприятные условия для осеменения. Установлено, что при плотном фолликуле первой степени зрелости, а также при незначительном его увеличении до 10-12 мм в диаметре и при одновременно тугой флюктуации фолликулов (вторая степень) у животных отмечен самый низкий процент зачатий (от 0 до 50%). По мере дальнейшего его созревания оплодотворяемость заметно увеличивалась и при третьей степени зрелости была уже в пределах от 69 до 76%. Четвёртая степень (стадия размягчения) отличалась максимальным числом стельных животных и составляла от 71

до 87%. При определении времени осеменения по признакам течки и степени раскрытия шейки матки оптимальным сроком осеменения считается период, когда наступает помутнение цервикально-вагинального секрета, отмечается минимальная вязкость и наибольшая растяжимость (эластичность) секрета, что, как правило, указывает на достаточное раскрытие канала шейки матки. С другой стороны, его закрытие, а также выделение из влагалища слабо эластичного, липкого (с белым оттенком) секрета свидетельствует об уже завершившейся овуляции. В специально проведённых автором исследованиях установлено, что в случае отсутствия клинических признаков течки в период охоты и при осеменении коров и тёлочек оплодотворяемость их снижается на 30-47%. При введении спермы в хорошо раскрытый канал шейки матки (за 3-ю складку) количество зачатий от первого осеменения составляет от 58 до 77%, а в случае введения её в начальную часть шейки т.е. за первую складку(при закрытом канале) – от 9 до 23% [140].

Учитывая такой же физиологический механизм, Черемисинов Г.А. [141] успешно применил для уточнения времени осеменения коров в период охоты специальные аппараты. К ним относятся:

1. Электронный передатчик импульсов, закреплённый на шею коровы, передатчик-приёмник, воспринимающий и фиксирующий частоту импульсов; счётчик, подсчитывающий их интенсивность и запоминающее устройство, регистрирующее номер коровы и полученные результаты обследования.

2. Специальный эластичный зонд с двумя парами электродов для контакта с каудальной частью слизистой шейки матки – на дорсальной и вентральной поверхностях. Зонд соединён со шкалой регистрации величины электрического сопротивления.

Вышеуказанные методы позволяют определить оптимальное время для осеменения. Однако значительная их сложность, трудоёмкость, недостаточная гигиеничность и точность некоторых из них, а также необходимость иметь высокую квалификацию большого числа специалистов ограничивает широкое применение большинства этих методов в условиях производства. На

высокопродуктивных коровах, с наивысшим удоем за лактацию 9 тысяч и более кг молока, такие исследования не проводились. В связи с этим необходим объективный, широкодоступный, простой и в то же время точный способ определения готовности половых органов коров-доноров к плодотворному осеменению с целью получения максимального количества пригодных для трансплантации эмбрионов, как один из наиболее важных элементов в общей технологической цепи метода трансплантации эмбрионов.

Следовательно, в настоящее время не проводились исследования по применению точных и простых методов объективной оценки готовности половых органов доноров к зачатию при проведении работы по трансплантации эмбрионов.

### **1.3. Факторы, влияющие на оплодотворяющую способность доноров и приживляемость эмбрионов у реципиентов**

Повышение продуктивности животных и качества продукции, является основной задачей молочного скотоводства. Решение этой задачи связано с интенсификацией животноводства, переводом его на промышленную основу, применением современных методов воспроизводства стада, как основных факторов повышения молочной продуктивности. Опыт стран с развитым молочным скотоводством показывает, что в условиях интенсификации таких технологических элементов ведения животноводства, как кормление, содержание и воспроизводство коров дойного стада может привести к снижению продолжительности продуктивного периода до 2...3 лактаций. При этом высокая концентрация поголовья скота в помещениях скотного двора, гиподинамия, погрешности в кормлении, стрессы отрицательно влияют на проявление функциональных особенностей организма и как следствие, на качество и приживляемость эмбрионов [142, 143, 144].

В Республике Беларусь животноводство вообще и молочное скотоводство, в частности, занимают одно из ведущих мест. В СПК «Прогресс - Вертелишки», «Октябрь - Гродно», «Обухово»,

племзаводах: РУСП «Россь», РСУП «Кореличи» – Гродненской, в агрокомбинате «Снов», РУСП племзаводе «Красная Звезда» - Минской областей и других хозяйствах созданы высокопродуктивные стада коров. Животные в этих хозяйствах обеспечивают удои в среднем 6500...7000 килограммов молока за лактацию.

Зоотехническая и ветеринарная практика отечественного и зарубежного молочного скотоводства показывает, что с увеличением продуктивности у коров чаще наблюдаются задержание последов, субинволюция матки, эндометриты, функциональные расстройства яичников и другие нарушения. Такие животные несвоевременно проявляют признаки половой охоты после отела и многократно безрезультатно осеменяются, что приносит значительный экономический ущерб сельскохозяйственным предприятиям. Увеличиваются пренатальные потери и продолжительность межотельного периода, учащаются случаи непродолжительного выбытия ценных животных вследствие нарушения репродуктивной способности, что приводит к недополучению ремонтного молодняка [145-148].

Целью Республиканской программы на период 2011-2015 гг, является совершенствование базы племенного животноводства и достижение уровня, соответствующего показателям развития животноводства европейских стран. Окончательная задача настоящей программы – получение на 100 маток крупного рогатого скота 95 телят [149].

Одним из важнейших условий увеличения валового производства молока, при одновременном снижении его себестоимости, является повышение сроков продуктивного периода и воспроизводительной способности коров. В свою очередь, этот показатель во многом зависит от проведения ряда профилактических мероприятий, одним из которых является правильная организация и проведение ежедневного активного принудительного движения коров в самые уязвимые для них периоды содержания - сухостойный и послеродовой [150]. Он способствует улучшению деятельности сердца, лёгких, пищеварительных органов и, в целом, повышению продуктивности животных. Активные прогулки служат одним из основных мероприятий по борьбе с беспло-

дием коров и предупреждению трудных отёлов. Наука и практика отечественного и зарубежного молочного скотоводства доказывает, что одной из причин, ведущих к снижению резистентности организма, ухудшению аппетита и усвояемости питательных веществ рациона, а также низкой результативности осеменения, является отсутствие (или ограниченность) моциона. Активный моцион на свежем воздухе способствует усилению сокращения матки и своевременному отделению последа, клинически более выраженному проявлению половой функции, повышению оплодотворяющей способности коров дойного стада, а также профилактике заболеваний конечностей и молочной железы. При этом авторами указывается на необходимость проведения дальнейших исследований по выяснению влияния активного моциона на воспроизводительную функцию и продуктивность коров дойного стада в условиях молочно-товарных комплексов.

С целью изучения результативности применения активного моциона коров учёными «Центрального научно-исследовательского и проектно-технологического института механизации и электрификации животноводства» города Запорожья разработана и испытана кольцевая электро-механическая установка. Она представляет собой манеж с внутренним и наружным металлическим ограждением. Внутреннее ограждение представляет собой каркас с электродвигателем, приводящий в движение по кругу лопасти 2-х поворотных перегородок, снабжённых оборудованием от электропастуха, подгоняющего поголовье численностью 30 коров в течение 1 часа. Расстояние от двигателя до внутреннего ограждения 4 м, до наружного – 18,5 м.

Московская организация «РосгипроНИИсельстрой» для этих целей разработала и внедрения ограждённый кольцевой эллипсовидный прогон длиной 250 м и шириной 3 м с твёрдым покрытием [151]. Коровы группами должны помещаться в этот прогон и препровождаться дежурными скотниками по кольцевому скотопрогону в течение часа.

Указанные технологии, оборудование и площадки для осуществления активной прогулки коров, применяют на молочно-товарных комплексах. Они требуют больших капитальных вло-

жений на укладку гравейного покрытия скотопрогонов, а также затрат труда обслуживающего персонала и поэтому применяются ограниченно.

Учитывая недостатки применяемых указанных технологий и средств для активной прогулки коров, требуется разработка и испытание новых методов проведения активного моциона животных с менее значительными затратами труда.

Получить высокие результаты по воспроизводству в условиях комплексов с промышленной технологией производства молока невозможно без регулярного предоставления животным моциона. Вследствие полного отсутствия солнечной инсоляции в их организме нарушается синтез витамина Д (кальциферола), что приводит к нарушению минерального обмена и снижению продуктивности животных. В то же время суточную потребность молочной коровы в витамине Д можно удовлетворить скармливанием 2 кг люцернового сена.

Для профилактики этих нарушений, на молочно-товарных комплексах, предоставляют сухостойным, а также новотельным коровам (начиная со второго-третьего дня после отёла и до перевода в секцию производства молока) свободный доступ для прогулок на выгульных площадках с твёрдым покрытием, из расчёта 6 м<sup>2</sup> на голову. Однако, как показала практика, в этих условиях животные также подвержены гиподинамии в результате скученного содержания и недостаточности активного передвижения. Они больше находятся в помещении скотного двора, что не способствует в достаточной степени профилактике заболеваний молочной железы, конечностей и послеродового характера, а также сохранности новорожденного молодняка. Поэтому более эффективным мероприятием является организация активного принудительного моциона сухостойных коров и нетелей, а также новотельных коров в зимнее время с использованием оборудованных кольцевых (или традиционных прямых) скотопрогонов, а в летнее-пастбищный содержание их в течение первой половины дня (или в течение светового дня) [152].

В связи с указанным, для профилактики послеродовых заболеваний (гипофункция яичников и анафродизия, маститы, ко-

пытная гниль, задержание последов и др.) необходимо засеять близлежащие к животноводческим помещениям поля многолетними травами и оборудовать скотопрогоны с возможностью организации пастбы как в пастбищный, так и стойловый периоды. Учёные объясняют положительное влияние активного моциона повышением жизненных функций и укреплением здоровья животных, нормализацией обмена веществ в организме, улучшением пищеварения, дыхания и кровообращения, а также стимуляцией репродуктивной функции. Он обеспечивает тренировку мускулатуры, закаляет организм, повышает резистентность к заболеваниям, предупреждает ожирение животных, положительно влияет на продуктивность животных [153]. Моцион животных (от нем. motion или лат. motionis), означает движение животных на свежем воздухе, а активный моцион – это когда во время прогулки животных принуждают к движению по специально оборудованным дорожкам, например, до загона и обратно (чаще в зимнее-стойловый период) или до пастбища, а после пастбы в помещение скотного двора.

Однако современные условия хозяйствования убедительно доказывают, что на крупных промышленных комплексах по производству молока остаётся не решённой проблема организации и проведения для сухостойных коров активного принудительного моциона, который пытаются заменить содержанием животных на выгульных площадках (пассивный моцион). Это приводит к недополучению приплода и молочной продукции по причине сокращения продуктивного периода коров дойного стада в среднем до 2,3 лактаций.

В литературе имеется информация о результатах применения разных видов моциона нетелей глубокой стельности (6 и более месяцев) при их содержании в летний период года, соответственно, в условиях выгульной площадки молочно-комплексного и принудительного активного моциона по определённому маршруту. Опыт проведен на четырех группах животных чернопестрой породы. В каждой из них было по 16 животных-аналогов. I, II и III группы были опытными (с разными режимами активного моциона), IV служила контролем и содержалась на

выгульной площадке. За 9 недель опыта нетели 1 группы, которые получали активный моцион ежедневно по 3 км, прошли 189 км; животные 2-й, получавшие такой же моцион в течение 5 дней в неделю – по 4,5 км в день, прошли 202 км; 3-й группы, с 3 днями активного моциона в неделю (через день) по 7 км – 196 км. Нетели контрольной группы в течение опыта традиционно пользовались пассивным моционом на выгульной площадке по 2 часа ежедневно.

В результате, активный моцион оказал положительное влияние на роды, жизнеспособность телят и сроки involуции матки. В группах с активным моционом нуждались в родовспоможении от 18 до 33% животных, а при пассивном – 40%. При активном моционе не было мертворожденных телят и задержаний последов, при пассивном их оказалось 18,7%, а задержаний последов – 12,5%. Сроки involуции матки у животных составили соответственно по группам 28, 30, 31 и 35 дней. Период от отела до первого осеменения составил – 52, 58, 62 и 61 день.

По удоям за первые 4 месяца лактации животные не имели достоверного преимущества, против животных с пассивным моционом (I – 1771кг; 2 – 1760кг; 3 – 1771 и контрольная – 1815 кг).

Затраты труда при использовании активного моциона составили: в I группе – 62,0, во II – 70,4, в III – 61,9 и при пассивном моционе в IV группе – 11,2 чел.-часа.

Таким образом, в зависимости от условий можно выбирать режим активного моциона нетелей второй половины стельности: ежедневный, через день или 5 дней в неделю, предусматривая при этом путь за неделю 22-25 км. Одновременно отмечается, что при активном моционе нетелям необходимо повысить уровень кормления, чтобы получить рекомендуемый прирост живой массы.

При отсутствии моциона животные становятся вялыми, у них снижается аппетит и эффективность использования кормов. Моцион необходим для всех видов животных, но особенно важен для беременных коров и после родов.

Если моцион отсутствует или носит пассивный характер, то у животных развивается состояние гиподинамии, характеризующееся снижением естественной резистентности, апатией и малой подвижностью животного, развитием малокровия, снижением репродуктивной функции. Клинические признаки нарушения обменных процессов в их организме особенно выражены в зимний период, когда гиподинамия по причине скученного содержания коров оказывает неблагоприятное влияние на весь организм и, особенно, на половой аппарат в форме проявления анафродизии, «тихой охоты», эндометритов и задержания последа. У животных, которые пользовались активным моционом на расстоянии 5-6 км, роды протекали нормально и без задержания последа, тогда как у коров, которые имели свободный доступ на выгульную площадку в течение 4-5 часов в сутки, отмечались случаи трудных родов и задержания последа.

У коров, не получавших моцион в стойловый период, половая охота не была замечена своевременно, они были осеменены с опозданием, поэтому межотельный период составил 412 дней, число яловых коров было в три раза больше, чем в группе получавших моцион, а абортос почти в шесть раз.

Лопатко М. [154] установлено, что активное движение коров на чистом воздухе и непосредственное воздействие прямых солнечных лучей способствовали лучшему усвоению кальция, фосфора, каротина, повышению резервной щелочности. В крови опытных коров кальция было больше на 18,7%, фосфора на 12,7%, каротина на 41%, резервной щелочности – на 12,1. Одновременно минеральный, витаминный, а, следовательно, и общий обмен веществ также оказался значительно выше, чем у животных контрольной группы.

Активный моцион дойных коров благоприятно повлиял и на их молочную продуктивность и воспроизводительную способность. В опытной группе надой молока с базисной жирностью 3,7% на корову оказался выше на 107 кг, процент жира в молоке увеличился на 0,5%, сервис-период снизился на 17 дней, оплодотворяемость повысилась на 13%, количество бесплодных

дней сократилось на 17 дней, получено телят в расчёте на 100 коров возрасло на 9,7%, по сравнению с контрольной.

Длительное зимне-стойловое содержание животных в закрытых помещениях, часто при более или менее стабильных температурах воздуха, без систематических прогулок на свежем воздухе оказывает неблагоприятное влияние на организм животных. Нарушения параметров микроклимата, отсутствие прямого солнечного света, гиподинамия, снижают процессы газообмена, приводят к нарушению обмена веществ, у животных наблюдается гипотония органов размножения.

Нахождение животных в течение многих месяцев в животноводческих помещениях без моциона приводит к ослаблению регуляторных механизмов организма и потере способности быстро приспосабливаться к изменениям факторов внешней среды. При этом ослабевают защитные силы и они болезненно реагируют на незначительные внешние воздействия снижением молочной продуктивности и репродуктивной функции. Животные, находящиеся в таких условиях, чаще страдают заболеваниями молочной железы и конечностей. Также важно в условиях МТК постоянно следить и регулировать постоянный приток свежего воздуха в помещение скотного двора, одновременно поддерживая температуру на уровне не выше 10-15<sup>0</sup>С.

Приучают животных к моциону с самого раннего возраста. Продолжительность моциона определяется возрастом и назначением животных, их физиологическим состоянием, погодными и климатическими условиями. Моцион не должен вызывать утомления, переохлаждения или перегрева животного. Средняя продолжительность активного моциона для животных 2-4 часа в сутки (в один или два приема). При благоприятной погоде и пастбищном содержании моцион может быть более продолжительным. При ненастной зимней погоде продолжительность моциона сокращают, а для отдельных категорий животных временно отменяют. Также его можно проводить в выгульных дворах или загонах, защищенных от холодных ветров. В летний период года, на случай дождя или жары, оборудуют навес. Активный принудительный моцион принято проводить летом в ранние ут-

ренные часы, зимой в дневное время. При этом в основе самого процесса регулярной прогулки животных на свежем воздухе лежит принцип приучения их к самостоятельному передвижению по заранее заданному маршруту с оптимальной для данных животных скорости – 3 км/ч.

В результате гиподинамии ухудшаются процессы газообмена, снижается ферментная активность, наблюдается гипотония органов размножения. Моцион стимулирует физиологические процессы и закаливает организм, способствует нормальному кровообращению, предупреждает развитие остеопороза, благотворно влияет на половую активность, повышает оплодотворяемость и плодовитость, предупреждает послеродовые болезни. Рождающийся молодняк бывает более жизнеспособным.

Специальные исследования, проведенные автором в приоды за 2 месяца до отела, а затем и с 3-4-го дня после него, в течение двух зимних периодов показали, что активные движения на расстоянии 3 км оказывают несравненно более сильное влияние на организм коров, чем прогулки животных в загоне. Исследования показывают, что, чем меньше животные находятся в помещении родильного отделения и чем раньше после отела им предоставляют активные прогулки, тем быстрее и легче протекают роды, быстрее отделяется послед, меньше случаев осложнений, послеродовых болезней, уменьшается количество дней бесплодия. И наоборот, при пассивных прогулках у животных возникает вынужденная гиподинамия, приводящая к заболеваниям конечностей, травматическим ретикулитам и перикардитам, заболеваниям вымени. Гиподинамия также вызывает у коров комплекс полиморфных изменений в организме в виде нарушения кровообращения, застойных явлений в мышцах, понижение аппетита, целый ряд расстройств дородового, родового и послеродового периодов.

Как у людей, так и у животных больше всего от гиподинамии страдают растущие организмы. Даже плод в утробе матери, находившейся в условиях гиподинамии, развивается ненормально: аномалии наблюдаются и в таких органах плодов, как половые железы. Исследования Н. Горбаченко, Л. Войтюк [155] по-

казали, что в условиях пониженной двигательной активности масса мозга, а также количество нервных клеток в нем уменьшаются. Участились случаи бесплодия, преждевременных родов, рождение слабого и недоразвитого потомства. Под влиянием гиподинамии у животных наблюдается нарушение половых циклов. Течка и охота или не наступают вовсе, или возникают редко, с большим опозданием. При этом клинические признаки охоты чаще почти незаметны, а её продолжительность сокращается до 1-4 часов. Осеменение часто не сопровождается оплодотворением.

При ректальном обследовании половых органов у таких животных обычно обнаруживают атонию матки, уменьшение яичников при одновременном отсутствии растущих фолликулов. Отсутствие прогулок, скученное содержание, совместно с другими причинами (ожирение, болезнь конечностей при общей слабости организма и т.д.), может являться благоприятным условием для развития предродового и послеродового залеживания, слабых потуг, задержания последа, кистозного перерождения яичников и персистенции жёлтых тел.

Из представленных данных литературы видно, что до настоящего времени остаются недостаточно изученными вопросы течения физиологических процессов в половых органах самок, при различных видах моциона коров, содержащихся в условиях МТК. Актуальными являются также исследования, касающиеся морфофункционального состояния половых органов у первотёлок, а также полновозрастных коров в послеродовой период, особенно при нахождении их в различных условиях. Прежде всего, это касается животных, находящихся в состоянии гиподинамии – с одной стороны, а также пользующихся активным принудительным моционом – с другой.

Изучение степени влияния фактора двигательной активности коров и телок, особенно в разрезе летнее-пастбищного и зимнее-стойлового периода содержания является весьма актуальной как для физиологов, так и для клиницистов различного профиля. Это будет способствовать более глубокому выяснению этиологии и патогенеза болезней, как половой, так и других сис-

тем организма, а также усовершенствованию методов лечения больных животных.

Организация активного моциона зимой и правильная организация пастбы животных летом позволяют в значительной степени снизить процент выбраковки животных, укрепить их здоровье и уменьшить неблагоприятные последствия принятой технологии содержания коров. Причиной высокой яловости, нарушений обмена веществ, снижения воспроизводительной функции и продуктивных качеств животных часто служат условия их содержания. Если в принятой технологии работы со стадом не предусмотрен активный моцион для стельных – сухостойных и новотельных коров, не соблюдены строгие требования режима ежедневной эксплуатации кольцевых или стандартных (прямых) скотопрогонов, не практикуется пастбищное содержание – тогда можно заранее сказать, что в таком хозяйстве будет высокий процент акушерских и гинекологических заболеваний, маститов, болезней конечностей, нарушений белкового и минерального обмена.

При изучении влияния разной степени двигательной активности в сухостойный период на легкость отела, сроки отделения последа и число случаев послеродовых эндометритов у коров бурой породы установлено, что при ежедневном 2- и 4-километровом моционе в период сухостоя установлены наименьшие показатели трудных родов (соответственно 10,47 и 9,38%) и задержания последа (13,9 и 4,7%). У коров, выпускавшихся на прогулку только на двор, эти показатели составили, соответственно, 15,38% и 19,23%. Учёные отмечают, что гиподинамия, или недостаток движения, животных контрольной группы и лежит в основе нарушения обменных процессов в их организме. Ежедневный моцион коров в сухостойный период создает благоприятные условия для снижения заболеваемости эндометритами в послеродовой период. Преимущество его наиболее существенно выразилось при использовании 4-х километрового ежедневного препровождения их по скотопрогону.

При отсутствии моциона животные становятся вялыми, у них снижаются аппетит и эффективность использования кормов.

Он необходим для всех видов животных, но особенно важен для беременных коров и после родов, поскольку нормализует обмен веществ, улучшает пищеварение, дыхание, кровообращение, репродуктивную функцию, обеспечивает тренировку мускулатуры, закаляет организм, повышает резистентность к заболеваниям, предупреждает ожирение животных, положительно влияет на плодовитость и продуктивность животных.

Steinberger S. et.al [156] установили, что в случае отсутствия моциона, или если он носит пассивный характер, у животных развивается состояние гиподинамии, характеризующееся снижением естественной резистентности, апатией и малой их подвижностью, развитием малокровия, снижением репродуктивной функции.

Отсутствие моциона, особенно в зимний период, оказывает неблагоприятное влияние на весь организм и, особенно, на половой аппарат. При этом проявляются клинические признаки анафродизии. В своих опытах авторы доказали большое значение активного моциона для нормального течения родов и профилактики задержания последа. У сухостойных коров, которые пользовались активным моционом на расстояние 5-6 км, роды протекали нормально и без случаев задержания последа, тогда как у 43% коров, которых выпускали в выгульный дворик на 4-5 часов в сутки, отмечались случаи трудных родов, задержания последа и эндометритов.

У коров, не пользующихся моционом в сухостойный период, половая охота у более чем половины животных проявлялась «тихо», без явных клинических признаков. Они были осеменены с опозданием, поэтому межотельный период по данной группе составил – 412 дней. Коров с заболеваниями послеродового характера также было в два раза больше, а абортот почти в три раза, по сравнению с группой использовавшей моцион.

Убедительно доказано, что активное движение коров на свежем воздухе и при непосредственном воздействии прямых солнечных лучей, способствовали лучшему усвоению кальция, фосфора, каротина, повышению резервной щелочности. В крови опытных коров кальция было больше на 18,7%, фосфора на

12,7%, каротина на 41%, резервной щелочности на 12,1%. В целом, применение активного принудительного моциона оказало значительно большее влияние на общий обмен веществ организма животных, чем в группе контрольных коров.

Длительное зимне-стойловое содержание животных в закрытых помещениях, часто при более или менее стабильных температурах воздуха, без систематических прогулок на свежем воздухе оказывает неблагоприятное влияние на их организм. Нарушения параметров микроклимата, отсутствие прямого солнечного света, гиподинамия, снижают процессы газообмена приводят к нарушению обмена веществ, у них наблюдается гипотония органов размножения.

Содержание животных в течение многих месяцев в животноводческих помещениях без моциона приводит к ослаблению регуляторных механизмов организма и потере способности быстро приспосабливаться к изменениям внешней среды. У животных ослабевают защитные силы, они болезненно реагируют даже на незначительные внешние воздействия и снижают продуктивность. Коровы дойного стада, находящиеся в таких условиях, страдают заболеваниями половых органов, молочной железы и конечностей.

При изучении связи условий содержания и социального поведения коров молочного направления продуктивности с распространением хромоты выявлено, что скученное их содержание и постоянные перегруппировки, повышают агрессивность в борьбе за место для кормления и лёжки. Это приводит к социальному ранжированию животных. Исследование связи между двигательной активностью коров и распространением хромоты проводили в 3 стадах, насчитывающих 50, 70 и 90 голов животных, в начале, середине и конце стойлового периода. Установлено, что среди коров с низким, средним и высоким уровнем двигательной активности время лежания в течение дня составляло 38,6%, 33,7 и 31,8%, а время стояния – 50,1%, 47,4% и 39,7%, соответственно. При этом зарегистрировано появление, соответственно, 22, 18 и 11 клинических случаев хромоты. Анализ связи заболевания с затратами времени показал, что дли-

тельное стояние животных с нахождением половины времени в боксе, приводит к увеличению случаев повреждения межпальцевых и пяточных участков ног. При этом общее время нахождения в стоячем положении напрямую связано с количеством как указанных повреждений и поражений подошвы копыта, так и в целом с общим количеством случаев хромоты. Исследование связи условий содержания с распространением хромоты показало, что животные с высоким уровнем активности имеют наиболее высокую вероятность избежать данного заболевания. Полученный опыт авторы предлагают применять при модификации условий содержания молочных коров с целью снижения распространения хромоты.

В результате гиподинамии ухудшаются процессы газообмена, снижается ферментная активность, наблюдается гипотония органов размножения. Моцион стимулирует физиологические процессы и закаливает организм, таким образом, способствует нормальному кровообращению, предупреждает развитие остеомалации, благотворно влияет на половую активность, повышает оплодотворяемость и плодовитость, предупреждает послеродовые болезни.

Опубликованы результаты научно-хозяйственного опыта, проведённого Т.С. Голдаревым, Х.В. Загитовым [157] в осенне-зимний период на молочно-товарном комплексе с поголовьем 1200 коров. Для опыта подобрали 44 коровы чёрно-пёстрой породы в начале сухостойного периода, возрастом 2-6 лактаций и продуктивностью за предыдущую лактацию 4618-4644 кг молока при 3,7-3,8% жира. Живая масса коров составляла 539-561 кг. Их разделили на 4 группы, по 11 голов в каждой. В течение сухостойного периода коров 1 группы содержали на привязи, 2 – беспривязно в боксах, с моционом в общем стаде на выгульной площадке, 3 – на привязи без моциона, 4 – на привязи с предоставлением активной принудительной прогулки на расстояние 3-3,5 км по скотопробегу, ежедневно в течение 55 дней. В результате активный моцион сухостойных коров при привязном способе содержания способствовал улучшению биохимических показателей крови, увеличению молочной продуктивности за 100

дней лактации на 163-307 кг (1 группа – 2313; 2 – 2249; 3 – 2169; 4 – 2476 кг). Сервис-период сократился у них на 10-45 дней при повышении оплодотворяемости за первые 60 дней на 27-36%, по сравнению с показателями у животных, пользующихся пассивным моционом и содержащихся в помещении без прогулок.

В проведённых в условиях МТК Беларуси опытах О.И. Леткевич [158] также сформировал 3 опытные и одну контрольную группы коров по 60 голов в каждой. Животные 1 и 2 групп пользовались активным моционом на расстояние соответственно 5 и 3 км, 3 – пассивным (со свободным выходом на выгульную площадку) согласно промышленной технологии, 4 – контрольная группа (без моциона). Исследованиями установлено, что наиболее высокая оплодотворяемость от первого осеменения была у животных 1 и 2 групп и составила соответственно 63,3 и 60%, в то время как процент стельных животных в одну охоту в 3 и 4 группе был ниже и составил 56,6 и 53,3%. Длительность сервис – периода у подопытных животных разных групп существенно различалась и составила: в 1 группе – 63,4; 2 – 69,6; 3 – 94,4 и 4 – 108,4 дня. В связи с этим возросла продуктивность животных: в 1 группе на 7%; 2 – на 11,4; 3 – на 4,8% по сравнению с контрольной группой коров. Заболеваемость коров маститами при моционе на расстояние снизилась на 9,9% по сравнению с группой, не получавших прогулки. Телята, родившиеся от коров, пользовавшихся дозированным моционом, были более крепкими, лучше росли, меньше болели желудочно-кишечными и простудными заболеваниями.

По мнению Р.Г. Кузьмича и др. [159] технологическое и проектное решение производственных помещений, допускающее свободное перемещение коров в секциях, не может компенсировать пребывание животных на воздухе (на выгульных дворах). При этом авторы установили, что при высокой концентрации поголовья в секциях и минимальных размерах фронта кормления, у коров отсутствует стимул для достаточного по времени и продолжительности перемещения в пределах секции. Ещё одним важным фактором подавляющим эффективное проявление признаков половой охоты у коров – недостаточная естественная

и искусственная освещённость в производственных помещениях. Солнечный свет определённо высокой интенсивности через сетчатку глаза стимулирует эпифиз и гипофиз путём синтеза мелатонина. Под влиянием лучей солнечной радиации находящиеся в кормовых растениях фитоэстрогены, стимулируют образование высоких физиологических концентраций половых гормонов, а такие метаболиты как эргостерин и дигидрохолистерин превращаются в активные витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>, которые усиливают фосфорно-кальциевый обмен и оказывают стимулирующее действие на состояние половых органов.

Кроме того, недостаток моциона внутри производственного помещения и недостаточная освещённость способствуют возникновению особого состояния у самок – «тихой охоты», даже при правильной организации и сбалансированности кормления. При этом коровы внешне не проявляют признаков течки и общего возбуждения, поэтому клинически распознать охоту и выявить такое животное визуально крайне сложно.

Авторы предлагают следующие пути решения проблемы выявления охоты у коров на молочно-товарных комплексах: 1. Максимальное использование информации о животном, которая поступает с индивидуального чипа в компьютер (дата последнего отёла, охоты, динамика продуктивности, двигательная активность); 2. Создание благоприятных условий для проявления половой цикличности коров – свободный доступ к выгульным дворам. Обязательная ежедневная прогулка животных здесь в течение 1,5-2 часов и наблюдение за ними во время пассивного моциона; 3. Формирование групп новотельных коров (от родов до 60 суток) для рационального проведения профилактических, лечебных и стимулирующих мероприятий ветврачегинекологом; 4. Создание компьютерной базы данных для коров, подлежащих первому осеменению (35-40 дней после отёла) и не проявивших половую цикличность в сроки 50-60 суток после отёла.

В Украинском НИИ разведения и искусственного осеменения крупного рогатого скота на помясах чёрно-пёстрого и гол-

штинского скота апробирована технология интенсивной подготовки нетелей к отёлу, которая предусматривает:

- формирование групп нетелей 5-6-месячной стельности и постановку их в контрольный коровник;
- содержание нетелей в стойловый период на привязи, в летний – беспривязно группами на кормо-выгульных площадках или на пастбище;
- профилактику минеральной и витаминной недостаточности;
- биохимический контроль полноценности кормления животных;
- массаж вымени на 180-240 дни стельности, два раза в день по 6-5 минут;
- приучение к шуму работающей доильной установки;
- ежедневный активный моцион;
- постоянный контроль упитанности животных .

Первотёлки опытных групп имели лучшую морфо-физиологическую характеристику вымени, их лактационная кривая отличалась достаточной устойчивостью, а удой составил 4268-4717 кг молока, что на 308-563 кг больше, чем по контрольной группе.

Апробированная технология позволяет учитывать породные особенности животных, обеспечивать нормальное течение родового акта, получать жизнеспособный здоровый приплод, выпаивать ему молозиво хорошего качества, выявлять потенциальные возможности коров-первотёлок к наращиванию молочной продуктивности, вводить в основное стадо высокопродуктивных коров.

Аналогичная проблема характерна и для маточного поголовья мясного скота, которая выражается в более частых проявлениях трудных отелов, что отрицательно сказывается на уровне воспроизводства стада и экономике отрасли [160]. Во многих хозяйствах получают на 100 коров по 60-70 телят, что делает отрасль мясного скотоводства убыточным. Наряду с крупноплодностью и трудноотёлностью, причинами яловости и низкого уровня воспроизводства стада в мясном скотоводстве являет-

ся отсутствие активного моциона коров в пастбищный период. Это имеет важное значение для нормализации у животных обменных процессов и воспроизводительной функции. Поскольку не хватает пастбищ для всего поголовья, содержащегося в условиях МТК, в первую очередь организуется выпас сухостойных глубокостельных коров, а также нетелей. Положительно себя зарекомендовала круглосуточная загонная и загонно-порционная система выпаса коров. В хозяйствах где это организовано, потребность в кормах в течение пастбищного периода во всех гуртах полностью удовлетворяется только за счёт травы и без использования зерновых концентратов. В результате ежегодно деловой выход телят на 100 коров составляет 95-97%.

Автор на конкретных примерах убедительно доказывает, что безвыгульное содержание животных, ограниченный моцион, твёрдое покрытие полов в помещениях и на выгульных площадках, недостаточная инсоляция, нарушение витаминного и минерального питания – отрицательно влияют на продуктивность и, особенно, на воспроизводительную функцию. Отмечает имеющиеся случаи, когда в хозяйствах применяется привязное содержание маточного поголовья коров. Это приводит к снижению двигательной активности – гипокинезии, снижению оплодотворяемости коров и жизнеспособности телят, появлению трудных отёлов и послеродовых заболеваний (задержание последа, эндометрит, персистентное жёлтое тело и др.), а также к болезням конечностей.

Также Кудрявцева Г.А [161] считает одной из причин нарушения воспроизводительной функции у коров недостаточную двигательную активность в условиях зимнего стойлового содержания. По результатам исследований, пребывание на выгульных площадках в течение 2- 6 часов не устраняет гиподинамии, так как коровы в них только первые 5 минут передвигаются активно. Автор с февраля по май использовала оборудованную кольцевую скотопрогонную установку для дозированного моциона животных по кругу. Для изучения результатов её применения были сформированы опытная и контрольная группы коров, по 15 голов в каждой, аналогов по продуктивности за предыдущую

лактацию, возрасту в отёлах, живой массе. В обеих группах был принят одинаковый распорядок дня, лишь с одним различием: контрольные коровы имели возможность свободного выхода на выгульные площадки, а опытным, кроме того, был организован дозированный ежедневный принудительный активный моцион продолжительностью 30-40 минут.

Установлено, что оставаясь в пределах физиологической нормы, частота пульса и дыхания у животных опытной группы значительно увеличивались к концу опыта. У контрольных коров частота пульса была относительно постоянной в начале и конце опыта и составляла 60-70 ударов в минуту, тогда как у опытных во второй половине эксперимента она увеличилась до 85 ударов. Число дыхательных движений грудной клетки у контрольных животных практически оставалось неизменным на всём протяжении опыта, тогда как у опытных коров оно увеличилось с 29 до 41, или на 40% к первоначальному уровню. Об усилении окислительных процессов в организме коров говорит и увеличение количества гемоглобина в крови опытных коров на 11%, а также эритроцитов – на 14% по сравнению с контрольными.

В начале опыта щелочной резерв был одинаковым у животных обеих групп. Два месяца спустя у контрольных коров он снизился на 15,2%, тогда как у опытных повысился на 7%. Тенденция к снижению щелочного резерва у контрольных коров свидетельствует о накоплении в крови недоокисленных продуктов обмена. Одновременно у них установлено нарушение обмена Са у 50% животных в сторону понижения.

Одним из объективных показателей состояния процессов пищеварения у жвачных животных в условиях производства является сокращение рубца. В контрольной группе они составляли на протяжении опыта 8,2-8,8 - в течение 5 минут, тогда как в опытной - 11,0. Это свидетельствует о большей интенсивности процессов пищеварения у животных опытной группы.

В результате ежедневного активного моциона по кольцевому скотопрогону, в течение 3 месяцев, в положительную сторону изменился ряд клинико-физиологических показателей, улуч-

шилось состояние сердечно-сосудистой и дыхательной систем, активизировалась работа органов пищеварения. Удой увеличился на 140 кг молока на голову, при одновременном сокращении сервис-периода.

Белобороденко А.М. [162] в своих исследованиях изучал влияние моциона на восстановление половой функции и изменение клинико-физиологических показателей коров-первотёлок, в связи с применением активного моциона в зимне-стойловый период года. Для опыта было подобрано 100 коров-первотёлок чёрно-пёстрой породы, из которых сформировали две группы по 50 голов в каждой, с учётом возраста, живой массы, физиологического состояния половых органов. Все они находились в одинаковых условиях кормления, ухода и содержания. Отёл их проходил в родильном отделении на 60 скотомест, в соответствии с зооветеринарными требованиями работы молочно-товарного комплекса. Опытная группа коров, начиная с третьего дня после отёла, регулярно пользовалась активным моционом, контрольная в это время находилась на выгульной площадке. Маршрут проходил за территорией животноводческого помещения по четырёхкилометровому скотопрогону, который при необходимости расчищали зимой от снега бульдозером. Результаты исследований показали, что в среднем от каждой коровы, пользовавшейся активным моционом, получено на 113 кг молока больше, чем в контрольной группе. Период от отёла до плодотворного осеменения составил соответственно 74 против 108 дней. Автор отмечает, что применение активного моциона создаёт более благоприятные условия для плодотворного осеменения коров-первотёлок в послеродовой период, позволяет дополнительно получить 8-10 телят на 100 коров.

В своих исследованиях на 30 головах нетелей Ф. Юлдашев [163] доказал, что проведение активного моциона у нетелей в течение 10 дней после отёла способствовало повышению потребления сена на 1 кг и снижения концентратов на 0,5 кг, увеличению среднесуточного удоя на 2,6 кг по сравнению с коровами без моциона. Такое перераспределение рациона является дополнительным источником снижения себестоимости молока с

учётом особо высокой стоимости концентрированных кормов. Исследования поджелудочной железы показали, что переваримость сухого и органического вещества кормов у коров прямо пропорциональна интенсивности мышечной деятельности. Она способствует усилению пищеварения, например, при проведении активного моциона продолжительностью 20 минут при скорости 5,5 км/ч. Автор указывает, что применение пассивного моциона на выгульных площадках, в качестве самостоятельного варианта мало эффективно, но может существенно повлиять на усвояемость корма при его сочетании с активным моционом.

По данным С. Попова [164], нарушение обмена веществ у сельскохозяйственных животных обычно имеет сезонное проявление – в зимний стойловый период, а также в засушливое время года. Высокопродуктивным коровам зимой часто недостаёт кислорода для поддержания на высоком уровне окислительно-восстановительных процессов, ультрафиолетового воздействия и двигательной активности, что приводит к ацидозному состоянию или субклиническому кетозу. Установлено, что если лактирующие коровы не пользуются активным моционом в течение 1-2 месяцев, то у них может появиться ацидотическое состояние. В процессе исследований коровам контрольной группы ежедневно в стойловый период предоставлялся пассивный моцион на выгульной площадке, первотёлки опытной группы пользовались активным моционом, путём препровождения по скотопрогону на расстояние 3 км. Летом животные обеих групп паслись на пастбище.

В результате исследований незначительное снижение уровня кальция обнаружено у животных в обеих группах осенью, а в контрольной группе весной. Причиной фосфорно-кальциевой недостаточности, кроме невысокого содержания солей кальция и фосфора в кормах, могут быть нерегулярные активные прогулки, плохое освещение и недостаток ультрафиолетовой радиации для синтеза витамина Д в организме. Кроме того, установлено, что в зимний период изменяется щелочной резерв крови в сторону ацидоза, иногда значительного. Ацидотическое состояние лактирующих животных ведёт к дистрофическим и дегенеративным

изменениям органов и тканей, нарушению воспроизводительной способности и ухудшению качества продукции, рождению слабого молодняка, часто болеющего токсической диспепсией. Щелочной резерв отражает состояние буферной гидрокарбонатной системы крови. При избыточном поступлении с кормами кислых элементов щелочной резерв снижается. Уже в начале стойлового периода обнаружено незначительное снижение резервной щёлочности в обеих группах, что авторами объясняется дефицитом углеводистых кормов в рационе и содержанием в силосе масляной кислоты (в среднем 0,11 абс. %). В конце стойлового периода величина резервной щёлочности у животных опытной группы была на 31,6 об% выше, чем у свестниц, не пользующихся активными прогулками. При этом у последних этот показатель был критическим и указывал на острую форму ацидоза у всех животных, в то время как в опытной группе он проявился лишь слабо выраженной клинической картиной. По мнению авторов это происходит вследствие накопления недоокисленных продуктов обмена.

Снижение белкового состава сыворотки крови в весенний период обнаружено у животных контрольной группы. Установлено, что при отсутствии ежедневных активных прогулок в стойловый период происходят атрофические и дистрофические поражения в органах и тканях, а также своеобразная «кормовая аллергия», при которой значительная часть белков рациона (до 25%) не усваивается организмом.

Таким образом, активный моцион способствовал увеличению резервной щёлочности и общего белка в сыворотке крови, что отразилось на улучшении воспроизводительных и продуктивных качеств животных, пользующихся активным моционом. Сервис-период у первотёлок опытной группы оказался на 49 дней короче, выход молочного жира увеличился на 16%.

Науменков А. [160] приводит результаты опытов ряда авторов. В одном из них первая группа коров (25 голов) в сухостойный период получала активный моцион в режиме 2 раза в течение дня. Животным на 3- 4 день после отёла проводился моцион на 4 км до обеда, затем пребывание в загоне в течение 3 ч. Вто-

рая группа (контрольная) находилась в загоне по 2,5 ч в день. Кормление животных 1 и 2 групп было одинаковым. В итоге в 1 группе пришло в охоту в течение 40 дней после отёла 19 гол. (76%), во 2-й только одна (4%). Продолжительность сервис-периода у коров с активным моционом составила 58 дней, в контрольной группе – 96 дней.

В другом опыте группы животных формировали из тёлочек 7-месячного возраста двух пород (красной степной и чёрно-пёстрой). При этом на 60 животных изучали влияние моциона на степень проявления воспроизводительной функции. Все тёлочки находились в одинаковых условиях кормления, но в 1 группе их содержали на привязи без моциона, а во 2 – они пользовались моционом на выгульном дворе в течение 6 часов. Установлено, что все тёлочки, пользовавшиеся моционом, плодотворно осеменялись в возрасте 17-19 мес. У чёрно-пёстрых тёлочек, не пользовавшихся моционом, оплодотворяемость в этом возрасте была ниже на 27%, у красных степных – на 33%. Показатели воспроизводительной функции коров, не пользовавшихся моционом, была значительно хуже, чем у животных с моционом. Так, оплодотворяемость от первого и второго осеменения у них составила лишь 42,7%, в то время как в группе с моционом – 66,6%. За 2 года по причине бесплодия из группы коров, содержащихся без моциона, было выбраковано более половины животных (53,3%), а из группы с моционом – только 6,6%. Отсутствие моциона у коров 1 опытной группы отрицательно сказалось и на их молочной продуктивности. Так, удои коров чёрно-пёстрой породы без моциона по первой лактации были на 1352 кг ниже, чем с моционом, а у коров красной степной породы снижение молочной продуктивности составило 737 кг. Аналогичные результаты получены и по 2 лактации. Таким образом, по результатам проведённых исследований установлено, что содержание тёлочек и коров без моциона ведёт не только к ухудшению у них воспроизводительной функции, но и к значительному снижению молочной продуктивности. При отсутствии моциона у коров и тёлочек практически невозможно выявить охоту и своевременно осеменить, что ведёт к увеличению бесплодия. К тому же содержание

животных в стойловый период в закрытых помещениях без прогулок, как правило ведёт к недостаточному образованию в их организме витамина Д и нарушению минерального обмена веществ в организме [165].

При изучении влияния разного режима моциона С. Поповым [166] было сформировано по принципу аналогов 2 группы тёлочек случного возраста, а затем первотёлочек по 20 голов в каждой. Животным 1 (контрольной) группы ежедневно в стойловый период предоставлялось ограниченное движение на выгульной площадке. Тёлочки 2 (опытной) группы ежедневно пользовались активным моционом путём прогона на расстояние 3 км, а оставшееся время также проводили в загоне. Летом животные обеих групп паслись в общем стаде. Установлено, что безмоционный режим содержания нетелей в последующем отрицательно сказался на отёле, состоянии приплода и сроках инволюции матки. В контрольной группе было зарегистрировано 5 тяжёлых отёлов и один случай рождения мёртвого телёнка. У животных, пользующихся активным моционом, был лишь один тяжёлый отёл, 4 задержания последа, в том числе одно с оперативным удалением. В результате сервис-период у первотёлок опытной группы оказался на 49 дней короче при сравнительно более низком индексе осеменения. Также данные исследований показали, что удои первотёлок опытной группы были выше, чем у сверстниц из контрольной группы на 688 кг. По продукции молочного жира животные, пользующиеся активным моционом, имели превосходство на 23,9 кг.

Таким образом, активный моцион стимулирует воспроизводительную способность коров, сокращает число неблагополучных отёлов и продолжительность сервис-периода, способствует увеличению удоя на 15,5%, выходу молочного жира на 16%.

Исследования отечественных и зарубежных исследователей показывают, что ограниченная двигательная активность коров в условиях молочного комплекса сопровождается повышением нервно-мышечной возбудимости, уменьшением функциональной стабильности гипофиз-адреналовой системы, увеличением продолжительности сервис-периода. Менее изученными явля-

ются состояние обменных процессов по результатам исследования крови, показатели молокоотдачи и секреции молока у коров, пользующихся моционом, в условиях беспривязно-боксового содержания и доения на групповых доильных установках. В связи с указанным, В. Третьевичем и др. [150] на коровах-первотёлках, аналогах по живой массе и срокам отёла, проведены исследования по изучению влияния моциона на молочную продуктивность коров. В подготовительном периоде подопытные животные содержались беспривязно в боксах, доение их было двукратное на доильной установке. В опытный период коровам опытной группы, в отличие от контрольной, был предоставлен моцион на выгульных площадках продолжительностью 2,5-3 часа после утреннего кормления. В течение опыта в пробах венозной крови определяли содержание катехоламинов, пероксидазы, азота общего и остаточного, глутатиона, общих липидов. Пробы крови для анализов отбирали один раз в подготовительный период и на 10-, 40-й день – в опытный. Из физиологических показателей учитывались скорость молоковыведения, латентный период рефлекса молокоотдачи, сервис-период, оплодотворяемость, а также молочная продуктивность. Проведёнными исследованиями установлено, что предоставление моциона коровам сопровождается в первую декаду повышением в крови глутатиона общего, глутатиона окисленного, белковосвязанного йода. На напряжённость обменных процессов указывает достоверно более высокий уровень общих липидов, участвующих в энергетических процессах. Моцион оказывает влияние на сократительную функцию молочной железы и сопровождается вначале увеличением латентного периода рефлекса молокоотдачи, при повышении скорости молоковыведения в сравнении с подготовительным периодом, а также с контрольной группой. В результате среднесуточные удои в опытной группе были выше на 4-5%, чем в контрольной, сервис-период составил соответственно 77 и 83 дня, или был короче на 6 суток при повышении оплодотворяющей способности коров на 8,3%.

Однако существуют и отрицательные мнения о влиянии как принудительного активного, так и пассивного моционов на мо-

лочную продуктивность коров. Z. Pasierbski [167] по результатам своих исследований доказал, что активный принудительный моцион приводит к снижению молочной продуктивности животных. В других исследованиях экспериментально доказали, что пассивный моцион при беспривязном свободно-выгульном содержании не обеспечивает необходимой двигательной активности животных для поддержания высокого уровня обмена веществ в организме. При этом на крупных молочно-товарных комплексах с беспривязным содержанием отмечается высокая яловость, при выходе телят от 100 коров – 70-76 голов. Продолжительность сервис-периода в пределах 120-160 дней, низкая оплодотворяемость от первого осеменения, а также большой отход телят в первые дни после рождения. При этом авторы сравнивают указанные показатели с результатами исследований, приведёнными W. Saudals [168], которые считают, что оптимальными показателями воспроизводства молочного скота следует считать продолжительность сервис-периода до 85 дней, оплодотворяемость от первого осеменения – менее 85 дней, оплодотворяемость от первого осеменения – не менее 80% и индекс осеменения – 1,3. При этом учёные отмечают, что наиболее распространёнными последствиями гиподинамии животных является задержание последа, которое регистрируется у 11,2% коров.

Наблюдения за поведением животных в условиях беспривязного содержания показали, что при передвижении в доильный зал и обратно (двукратное доение) коровы проходят за сутки 0,5 км и на выгульно-кормовых площадках ещё 1 км или всего 1,5 км /4/. Для сравнения, применение принудительного активного моциона на расстояние 2-4 км при беспривязном содержании коров на глубокой соломенной подстилке способствует повышению обменных процессов и лучшему усвоению питательных веществ, снижению заболеваемости маститом в 1,2-3 раза; конечностей в 1,5-2,5 раза; органов воспроизводства в 1,2-2,1 раза; повышению оплодотворяемости в первую охоту на 8,8-21,3% и молочной продуктивности за 305 дней лактации – на 4,2-9,6%. При этом активный моцион оказывает положительное влияние на работу сердечно-сосудистой системы. Сердце обес-

печивает кровообращение на 60%, а остальные 40% обеспечиваются за счёт сокращения и расслабления мускулатуры всего организма. Отсутствие активного моциона в сухостойный период, особенно в последние месяцы беременности, приводит к накоплению в организме продуктов метаболизма, которые выводятся только при наличии механической энергии. Тонус мышечной ткани матки способствует обеспечению нормальных физиологических процессов, сокращению сроков проявления охоты, своевременному созреванию и выходу яйцеклетки, оплодотворению, течению беременности, родов и инволюции половых органов в послеродовой период, что в конечном счёте приводит к повышению плодовитости. Активный мотцион повышает резистентность тканей молочной железы у коров, а также организма в целом, т.е. повышается устойчивость к возникновению акушерско-гинекологических заболеваний. Усвояемость корма повышается при активном моционе примерно на 10-12%.

В своих исследованиях Н. Борискин и др. [153] изучали степень влияния регламентированной двигательной активности сухостойных коров на их воспроизводительную способность в послеродовой период. По принципу аналогов было отобрано 3 группы сухостойных коров: 1 группа животных содержалась на привязи, 2 пользовалась пассивным моционом на выгульной площадке и для 3 были организованы ежедневные активные прогулки на расстояние 2 км. В результате, из числа отелившихся животных, содержащихся на привязи, 32% имели послеотёльные осложнения. При этом 75% из них – патологические изменения в матке и 25% – заболевания яичников. Продолжительность послеотёльного периода достигала 56 дней и сервис-периода 92 дня. Общая оплодотворяемость животных не превышала 81,8%, в том числе 44,4% от первого осеменения, при высоком показателе индекса осеменения - 3,9. Полученные низкие показатели репродуктивной функции у животных авторы объясняют скученным содержанием их, ограниченностью в движении, приводящих к нарушению обменных процессов и гормонального фона в организме самок. Это, в свою очередь, снижает воспроизводительную способность животных в целом.

Таким образом, проведение сухостойным коровам регулярных активных прогулок протяжённостью 2 км позволяет значительно снизить число послеродовых осложнений, обеспечить нормальное течение инволюции матки и яичников, повысить оплодотворяемость коров с минимальным расходом спермы на одно плодотворное осеменение.

Изучено влияние продолжительности и вида моциона на клинический статус, гематологические показатели подопытных коров в зависимости от уровня их двигательной активности. В условиях молочно-товарного комплекса по принципу аналогов были сформированы 3 опытные и одна контрольная группы коров (по 60 голов). Животные 1 и 2 опытных групп пользовались активным моционом на расстояние 5 и 3 км, 3 – пассивным, 4 – контрольная группа без моциона. Установлено, что коровы 1 и 2 групп характеризовались лучшим клинически выраженным статусом по изучаемым показателям. Количество эритроцитов к концу периода использования моциона у них возросло соответственно на 11,2; 9,1%, гемоглобина – на 12,0 и 6,9%, кислотная ёмкость повысилась на 13,2 и 13,3%. Содержание общего белка у них было больше на 0,45 и 0,48 г%, чем у аналогов контрольной группы. Одновременно возросло количество гамма-глобулиновой фракции. Авторы отмечают, что для улучшения клинико-физиологического состояния и уровня обменных процессов в организме, необходимо предоставлять коровам активный моцион на расстояние не менее 3 км.

В других исследованиях авторами дана сравнительная характеристика влияния разных видов моциона на их воспроизводительную функцию [169]. Выяснено, что продолжительность индипенданс-периода в 1 группе (активный моцион 5 км) составила 47,4, во 2 (активный моцион 3 км) – 50,6, в 3 (моцион на выгульной площадке) – 72,6, в 4 (без моциона) – 76,6 дней соответственно. Оплодотворяемость в первую охоту в 1 и 2 группах составляла 63,3 и 60,0%, в 3 и 4 – 56,6 и 53,3% соответственно. Длительность сервис-периода составляла в 1 группе 63,4, во 2 – 69,6, в 3 – 96,4, в 4 – 108,4 дней. Следовательно, для повышения

эффективности воспроизводства стада наиболее целесообразен активный моцион коров на расстояние 3 км.

При определении продуктивности, качества молока и частоту заболеваемости коров при различных способах содержания в зимне-стойловый период года Р. А. Каламов и др. [170] провели исследования на двух группах коров-аналогов, по 20 голов в каждой, содержащихся в одном помещении, при одинаковых условиях кормления и содержания. Коров опытной группы ежедневно, после утренней дойки и кормления, прогоняли по специально оборудованному скотопрогону на расстояние 3 км в течение 1 часа. Животные контрольной – имели возможность свободного выхода на выгульную площадку. Продолжительность опыта 6 месяцев – с ноября по апрель. В период его проведения оценивали параметры микроклимата по основным показателям, ежемесячно определяли молочную продуктивность, а у 6 коров из каждой группы – сухое вещество, СОМО, жир, белок, сахар, плотность, кислотность, бактериальную обсеменённость и количество соматических клеток. Ежемесячно коров проверяли на мастит с помощью димастиновой пробы. В результате исследований выявлено, что содержание коров в зимне-весенний периоды года стойлово-выгульным способом оказало определённое влияние на их молочную продуктивность. К концу второго месяца опыта у коров контрольной группы удой молока снизился, а молочная продуктивность коров, содержащихся с предоставлением ежедневного активного моциона, повысилась на 1,6 кг, чем в контроле.

Молоко, полученное от коров контрольной группы, имело сравнительно более высокий показатель кислотности – разница составила  $0,6^{\circ}\text{T}$ . В тоже время, плотность молока коров безвыгульного содержания была ниже на  $0,004 \text{ г/см}^3$  по сравнению с плотностью молока коров опытной группы.

На качественные показатели молока и её сортность большое влияние оказывают бактерии и соматические клетки, которые всегда присутствуют в молоке здоровых коров. Установлено, что общая бактериальная обсеменённость и содержание соматических клеток в молоке коров контрольной группы были

соответственно в 2,0 и 3,1 раза выше, чем в молоке коров опытной группы.

По основным физико-химическим показателям молоко от обеих групп коров соответствовало первому сорту, однако полученное от коров контрольной группы в последние 3 месяца опыта (февраль – апрель) оно по общему содержанию бактерий и соматических клеток не соответствовало молоку первого сорта, и было реализовано как второсортное.

За период опыта, в группе коров, не пользовавшихся в стойловый период моционом, заболеваемость составила 45% (4 коровы с маститом, 2 – с задержанием последа и 3 – с эндометритом), в опытной группе установлена и подлежала лечению 1 корова с диагнозом мастит. За указанный период стойлового содержания и лактации можно получить дополнительно 309,6 кг молока от одной коровы.

Таким образом, содержание коров дойного стада в стойловый период года стойлово-выгульным способом с ежедневным принудительным активным моционом на расстояние 3 км, позволяет повысить молочную продуктивность, улучшить качественные показатели молока и снизить заболеваемость их маститом.

В исследованиях Э.С. Прозора и др. [171] изучена эффективность моциона животных в условиях поточно-цеховой технологии производства молока в стойлово-зимний период года. Для этого в процессе запуска были подобраны 40 стельных коров и сформированы две группы по 20 голов – аналогов по срокам стельности и молочной продуктивности за предыдущий год.

В подготовительный период опыта коровы обеих групп не пользовались моционом. В опытный период коровам 2 опытной группы предоставляли ежедневный активный моцион продолжительностью 2,5-3 часа после утреннего их кормления.

В результате у коров 2 группы в опытный период отмечено значительное повышение концентрации гемоглобина – на 9,7%, количества эритроцитов – на 18,8%, содержания в сыворотке крови общего белка – на 9,2%, а также сахара и витаминов В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>, по сравнению с подготовительным периодом.

Нормализация обменных процессов в организме глубоко стельных коров за счёт активного движения на свежем воздухе благотворно сказалась на показателях крови после их отёла. У коров опытной группы после отёла установлена более высокая её насыщенность (на 7,1%) гемоглобином; большим (на 10,7%) содержанием эритроцитов, а также белка (на 7,4%).

Результаты исследования белкового состава крови показали, что моцион положительно влияет на состояние отдельных белковых фракций. Из глобулиновых фракций сыворотки крови наиболее заметные изменения отмечены со стороны  $\alpha$ -2,  $\lambda$ -1 и  $\lambda$ -2, уровень некоторых у растелившихся коров опытной группы превышал таковой у животных контрольной, соответственно, в 1,6 раза, на 23,2 и 21,6%.

Характерным для обеих гамма-глобулиновых фракций является то, что их концентрация после отёла коров снижается почти наполовину. Авторы объясняют это тем, что организм коровы может обеспечивать новорожденных телят иммунными белками только за счёт накопления их в молозиве на протяжении сухостойного периода, поскольку иммуноглобулины и антитела через плаценту плода не проникают. Поэтому чем больше белков перешло из крови матери (что оценивается по снижению их уровня после отёла), тем больше их находится в молозиве. Эту же закономерность можно отнести и к минеральной части крови. Авторами установлено, что содержание неорганического фосфора в крови обеих групп коров первые 3-5, а кальция 7-15 дней после отёла было значительно ниже физиологической нормы, и только после указанного срока нормализовалось. Это свидетельствует о том, что интенсивное развитие плода в утробе матери приводит к снижению в организме коровы содержания основных питательных веществ перед отёлом, насыщая ими молозиво и организм плода, который должен родиться.

Один из наиболее известных американских специалистов, С. Kotter [172] отмечает, что у сухостойных коров, которые пользуются принудительным активным моционом, улучшается общее физиологическое состояние, лучше заживают копыта после лечения, выпрямляется спина, исчезает излишек жира.

За три месяца лактации от коров контрольной группы (пассивный моцион) было надоено 1223 кг молока, опытной (активный моцион) – 1297 кг. Межгрупповая разница по надою составила 74 кг, или 6% в пользу проведения моциона; среднесуточный удой соответственно 13,3 и 14,1 кг со скоростью его отдачи в минуту 0,99 и 1,2 кг. Таким образом, активный регулярный моцион (кроме дней плохой погоды) стельных сухостойных коров, вплоть до перевода их в родильное отделение, способствует нормализации обменных процессов в организме животных, улучшению их физиологического состояния и повышению молочной продуктивности.

По результатам научно-хозяйственного опыта, проведённого в зимнее-стойловый период на сухостойных коровах 2-3 лактации, Т.С. Голдырев [173] делает вывод, что проведение активного моциона является важным элементом прогрессивной технологии производства молока. При этом ею было установлено, что ежедневный активный моцион облегчает отёлы, повышает резистентность их организма, положительно сказывается на молочной продуктивности. Так, коровы 1 группы, находящиеся в течение сухостойного периода на привязном содержании имели удой за 100 дней лактации – 2053 кг; 2 группы – находящиеся в условиях беспривязно-боксового содержания с возможностью пользования моционом в общем стаде на кормовыгульной площадке – 2094 кг; 3 группы – на беспривязно-боксовом содержании без моциона в помещении комплекса – 2077; 4 группы – на беспривязно-боксовом содержании с использованием прогулки на расстояние 3-3,5 км по скотопрогону в течение 50-55 дней – 2152 кг. У коров 4 группы установлен самый короткий сервис-период, который составлял 93 дня, против 111, 106 и 129 соответственно в 1; 2 и 3 группах. На основании полученного результата исследований автор рекомендует на фермах промышленного типа в стойловый период выделять сухостойных коров в секции беспривязно-боксового содержания и использовать для них принудительный активный моцион.

В своих исследованиях в условиях Закавказья Г.Н. Чохатриди и др. [174] также подтвердили, что наряду с качеством

кормления, большое влияние на здоровье, рост, воспроизводительные и продуктивные качества коров оказывают условия содержания их в сухостойный период. Для этого по принципу аналогов отбирали стельных сухостойных коров и распределили их на 2 группы, по 10 голов в каждой. Животных 1 (контрольной) группы содержали традиционным способом, т.е. безпривязно в помещении со щелевыми полами при свободном доступе на выгульную площадку. Коров-аналогов 2 (опытной) группы содержали под лёгким навесом с возможностью использования выгульной площадки но, кроме того, им предоставлялся активный моцион на расстояние 2 км. Полученные данные показали, что лучшими воспроизводительными качествами отличались коровы, содержащиеся в сухостойный период с предоставлением активного моциона. По сравнению с аналогами 1 группы, они в более ранние сроки проявляли признаки охоты и оплодотворялись при общем снижении кратности осеменения на 31,6%. В связи с этим, продолжительность сервис-периода у них была короче на 23,6 дня или на 31,5%. Существенные различия установлены и по живой массе телёнка как при рождении (на 2,0 кг или 7,0%), так и в 3-х месячном возрасте (на 8,5кг или 10,6%).

Лучшие условия содержания стельных сухостойных коров положительно сказались и на сохранности телят. Из 2 группы переболел диспепсией 1 телёнок или на две головы меньше, чем в 1 контрольной группе. Из общего количества родившегося молодняка впоследствии пало в 1 группе 2 головы, в опытной – падежа не установлено.

Проведение контрольных доек позволило установить молочную продуктивность коров, которая на 225 кг молока больше оказалась у животных 2 группы. При этом не установлено существенных различий по содержанию жира в молоке обеих групп.

Ущерб, причинённый бесплодием в расчёте на корову 1 группы, был почти в два раза выше по сравнению со 2-ой. Следовательно, наиболее подготовленными для дальнейшего воспроизводства явились коровы, которые в сухостойный период содержались под навесом с предоставлением ежедневного активного моциона на расстояние 2 км. Наряду с этим, они отлич-

чались большей молочной продуктивностью по сравнению с аналогами при их традиционном способе содержания.

В исследованиях М.М. Рибалка и др. [175] на 3-х группах подопытных сухостойных коров-аналогов по времени запуска, числу отёлов, живой массе, удою за последнюю лактацию, изучали эффективность стимуляции их воспроизводительной функции. Для этого подопытных коров 2 и 3 группы ежедневно, до стадии глубокой стельности, прогоняли по скотопрогонной дорожке, имеющей общую длину в одну сторону – 1 км, для активного движения по ней со скоростью 3 км/ч. В 1-й (контрольной) группе животные имели возможность свободного выхода на выгульные площадки. Для 2-й (опытной) группы организован принудительный моцион на расстояние 2 км утром, а для 3-й – на 4 км, но в два этапа: 2 км утром и 2 км во второй половине дня.

Как показали результаты исследований, животные всех групп поедали корма рациона почти полностью (93,4-95,3%), независимо от вида и режима моциона. В то же время каждое животное 3-й группы потребляло в среднем на 0,2 к.ед. больше, чем их аналоги из 1 и 2 групп. Прирост живой массы одной коровы 1 и 2 групп за период сухостоя (в среднем за 57 дней) составил 74 и 72 кг, в то время как у их аналогов из 3 группы – 63 кг. Однако на живую массу новорожденных телят это существенно не отразилось. Телята от коров 3 группы родились с большей живой массой в среднем на 2,3 и 1,9 кг, по сравнению с аналогичным показателем у телят 1 и 2 групп.

В 1-й группе пятой части коров оказывалось родовспоможение, тогда как у животных 3 группы этот показатель составил лишь 5%, даже с учётом более высокой живой массы приплода. Первая охота после отёла у коров 1 группы наступала в среднем через 45,9 дней, 3-й – 39,6, то есть на 6,3 дня меньше.

Из результатов исследований авторы делают вывод, что пассивный моцион коров в условиях выгульной площадки, а также активный – на расстояние 2 км в сухостойный период, в условиях беспривязного содержания на МТК, не является оптимальным для поддержания на достаточном уровне воспроизво-

дательной функции коров. Организация принудительного моциона сухостойных коров на 4 км в 2 этапа со скоростью 3 км/час обеспечивает более лёгкие роды, сокращение сроков инволюции половых органов, более высокую оплодотворяющую способность и сокращение продолжительности сервис-периода.

Аналогичные исследования проведены С.А. Поповым [164]. При этом было установлено, что коровы первотёлки, пользовавшиеся активным моционом до отёла (опытная группа) с 18-месячного возраста, имели впоследствии более высокую молочную продуктивность, чем аналоги при пассивном моционе (контроль). При этом автором установлено, что принудительный моцион способствовал повышению уровня окислительно-восстановительных процессов и защитных свойств организма животных. Биохимические исследования крови показали, что в конце стойлового периода резервная щёлочность у коров опытной группы была на 13,61 об% выше, а содержание белка в сыворотке крови соответственно на 0,99 г%, кальция на 1,14 мг%, по сравнению с контрольной.

Применение активного моциона позволило улучшить репродуктивную функцию животных. Так, продолжительность сервис-периода у первотёлок опытной группы была на 48 дней короче, а межотельного периода соответственно на 46 дней, по сравнению со сверстницами. Индекс осеменения первотёлок опытной группы составил 1,2, контрольной – 1,4. У коров после 2 отёла данный показатель был 1,46 и 1,71 соответственно. Коэффициент воспроизводительной способности в опытной группе составил 1,0 и в контрольной – 0,9.

Молодняк, полученный от первотёлок опытной группы, отличался лучшим здоровьем и развитием. Сохранность телят до 2-х месячного возраста была на 9,7% выше; превосходство по живой массе в возрасте 6-ти месяцев составило 12 кг. Также и в 18-месячном возрасте, они отличались лучшими морфофункциональными свойствами вымени. Чашеобразная форма вымени была у 85% первотёлок опытной и у 75% контрольной групп.

По величине удоя за первую лактацию первотёлки опытной группы превзошли сверстниц из контрольной на 688 кг (соответ-

ственно 4428 против 3739 кг), по выходу молочного жира преимущество составило 23 кг. Коэффициент молочности первотёлочек опытной группы был выше на 133 кг. Преимущество в удое коров опытной группы сохранилось и во второй лактации и составило 515 кг молока. Таким образом, автор предлагает при существующих условиях содержания коров чёрно-пёстрой породы в условиях МТК обеспечить проведение для них активного моциона по скотонрогону на расстояние 3 км.

Из вышеуказанных источников литературы можно сделать заключение, что в системе мероприятий, обеспечивающих решение Республиканской программы по племенному делу в животноводстве на 2011-2015 годы, целью является совершенствование базы племенного животноводства до уровня развития европейских стран, в том числе по выходу телят и с учётом использования такой продукции как эмбрионы коров-рекордисток. Для повышения эффективности воспроизводства стада необходимо предоставлять животным ежедневный активный моцион. Однако в условиях крупных молочно-товарных промышленных комплексов Беларуси проведение его затруднено, в связи с высокой концентрацией и уплотнённым размещением животных, отсутствием свободных площадей для оборудования скотопрогонных для поголовья сухостойных коров непосредственно возле животноводческих помещений, затратами времени, средств и труда. В связи с этим на протяжении последних 30 лет разрабатываются и совершенствуются механические тренажёры и другие устройства, удобные для проведения активного принудительного моциона животных в условиях молочно-товарных комплексов. При этом отмечается, что пропускная способность известных круговых манежей, кольцевых коридоров, технологических линий недостаточна, поскольку они рассчитаны для одновременного препровождения по скотопрогонному кольцу небольших групп (до 20-30 голов) животных. Не обоснован оптимальный режим и не предложен эффективный способ его осуществления для высокопродуктивных коров, позволяющий значительно повысить воспроизводительную функцию животных, снизить яловость и увеличить вы-

ход молодняка, не снижая при этом их молочную продуктивность. Тем не менее, многолетний опыт по использованию предложенных конструкций и установок – важный шаг на пути к разработке более совершенных устройств, для активного моциона животных.

Требуется изучения вопрос о качестве и степени приживляемости зародышей полученных от не лактирующих коров после завершения продуктивного периода. До конца не выявлена и эффективность использования высокопродуктивных коров-доноров выздоровевших после лечения от эндометрита. Данных научных исследований в этом направлении мало и они носят разноречивый характер. При этом авторы отмечают, что количество и качество эмбрионов во многом зависят от состояния слизистой оболочки матки. При оставшихся очаговых воспалительных процессах, их число в расчете на одного донора сокращается на 50...70% от общего количества извлеченных зародышей [176, 177, 178, 108].

В условиях развития животноводства актуальными задачами являются разработка методов многократного использования коров-доноров и включение в постоянное донорское стадо выбракованных по хозяйственным причинам животных. По данным Бабенкова В.Ю. [179], Ishimori Н. [180], Гарбузова А.А. [181], Горбунова Ю.А. [182], Смирновой Л.Л. [183], Тяпугина Е.А. [184] негативным фактором интенсивного ведения отрасли скотоводства остается высокий уровень выбраковки (25...30%) коров дойного стада, в том числе и коров с высоким генетическим потенциалом. Важной задачей при этом является восстановление репродуктивной функции высокопродуктивных коров с патологией половых органов для дальнейшего использования их в качестве доноров при трансплантации эмбрионов. Авторы указывают, что нарушение воспроизводительной функции у коров (гипофункция яичников, субклинический эндометрит, а также их возраст) не являются основанием исключения таких животных из числа доноров. По мнению вышеуказанных авторов, высокопродуктивные коровы с гипофункцией яичников или субклиническими эндометритами, после их выздоровления мо-

гут быть использованы в качестве доноров эмбрионов, обеспечивать полиовуляторную реакцию у 91% животных, 5,6 эмбрионов пригодных к пересадке, с приживляемостью 50%.

С другой стороны существует мнение, что использование коров, имеющих патологию репродуктивной системы или выбракованных по возрасту, нецелесообразно из-за низкой суперовуляторной реакции и низкого качества эмбрионов Almedia et al. [185], Laing J.A. [186].

Многочисленные противоречивые литературные данные указывают, что ещё окончательно не выяснено влияние высокой молочной продуктивности на качество извлеченных и биологическую полноценность замороженно-оттаянных эмбрионов у коров-доноров. Поэтому исключительно важным условием интенсификации животноводства является как можно более длительное сохранение высокой оплодотворяющей способности коров-доноров, которая в свою очередь зависит от нормального течения целого ряда процессов: гаметогенеза, оплодотворения, пренатального и постнатального их развития. В экспериментальных исследованиях учеными уже установлена последовательность событий, происходящих при оплодотворении высокопродуктивных коров-доноров, а также выяснены условия, необходимые для его осуществления. При этом различают четыре последовательных этапа. Во время первого происходит рассеивание клеток фолликулярного эпителия яйценосного бугорка и разрыхление лучистого венца. На втором – сперматозоиды проникают через прозрачную оболочку яйцеклетки. Однако наиболее ответственным этапом в оплодотворении является третий, который заключается в проникновении сперматозоида в протоплазму яйцеклетки. В яйцеклетку попадают мужской пронуклеус и одна из центриолей. На четвёртом этапе наблюдается слияние пронуклеусов яйцеклетки и сперматозоида и образование диплоидной зиготы [187-191].

Gustafsson H. [192] установил, что первое деление у высокопродуктивных коров-доноров удоем свыше 8 тыс. килограмм молока за лактацию, происходит в течение 48 часов после оплодотворения. Через 72 часа в яйцеводах таких коров можно обна-

ружить уже восьмиклеточный зародыш, на 4 день – 12 клеточный. В процессе дробления восстанавливается ядерно-плазменное отношение, характерное для клеток животного данной продуктивности. Для дробления характерна особая структура клеточного цикла, в которой отсутствует фаза G<sub>2</sub>. Однако, при изучении процесса дробления у таких животных было выявлено, что у зародышей этого типа фаза G<sub>2</sub> сохраняется, а геном в отличие от других, менее продуктивных животных, начинает функционировать очень рано – уже на 2...4 клеточной стадии развития, что авторы объясняют ограниченным запасом питательных веществ в ооцитах.

Дальнейшие деления зиготы приводят к образованию многоклеточной морулы. На 5...6 день развития зародыш крупного рогатого скота насчитывает от 50 до 60 клеток. К 7 дню после оплодотворения начинается дифференцировка клеточной массы эмбриона: образуется трофобласт и внутренняя зародышевая масса. Эмбрион превращается в бластоцисту, имеющую полость или бластоцель. К 9, 10 дню развития, бластоциста освобождается от прозрачной оболочки, с этого момента начинается её интенсивное удлинение. Скорость дробления и роста зародыша видоспецифичны и, по данным исследований, имеют большое значение для сохранения жизнеспособности зародыша.

После выхода бластоцисты из прозрачной оболочки её контакт с маточной средой становится более тесным. Связь зародыша с материнским организмом у млекопитающих животных осуществляется на первых этапах в процессе имплантации. Исследованиями Austin C. [193] установлено, что у высокопродуктивных коров дойного стада имплантация начинается с 11...14 дня развития эмбриона. К концу первого месяца внутриутробного развития начинается образование плаценты. Первые котиледоны появляются на 20...25 дни стельности, к 27 дню их количество достигает уже 70...80. Одновременно с формированием плаценты происходит дальнейшее развитие и дифференцировка эмбриона. На третьем месяце стельности формирование плаценты и закладка всех органов зародыша завершается.

По данным Номенклатуры Международного комитета эмбриональный период в развитии крупного рогатого скота продолжается до 45 дня стельности, после чего начинается плодный период. Во время эмбрионального (зародышевого) периода питание осуществляется за счёт запасов, накопленных в ооците, а также секретами желез яйцевода и эндометрия. В процессе имплантации и плацентации образуется система питания эмбриона через трофобласт и плаценту. Особенностью развития зародышей крупного рогатого скота, является наличие смешанного питания. Так, наряду с новым гемотрофным типом питания изменяется и весь период внутриутробного развития, сохраняется и гистiotрофный тип питания, благодаря специфике строения плаценты жвачных [194, 195].

Как показывают данные исследований проведённых в условиях Беларуси, у коров, имеющих высокую молочную продуктивность, сохранение беременности связано с взаимодействием эндокринных систем матери и эмбриона. При увеличении молочной продуктивности коров на уровне 3 тыс. кг молока проявление гипофункции яичников составляет 5,4%, при 5 тыс. кг учащается до 11,3%. Одновременно снижается оплодотворяемость после первого осеменения соответственно на 5 и 21,5%. В процессе оплодотворения яйцеклетки и развития зародыша основная роль принадлежит гонадотропным гормонам, выделяемым гипофизом, и стероидным гормонам яичника. В передней доле гипофиза коров секретируется три гонадотропных гормона: фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий (ЛГ) и пролактин. Действие ФСГ заключается в стимуляции развития в яичнике фолликулов, пролиферации клеток гранулёзы. ФСГ подготавливает морфологические структуры яичника к биосинтезу ферментов, которые осуществляют последний этап синтеза эстрогенов. Биологическое действие ЛГ заключается в стимуляции интерстициальной ткани яичника и секреции эстрогенов, в осуществлении овуляции, превращении постовуляторного фолликула в жёлтое тело и секреции прогестерона [196, 197, 141].

По данным Erb R.E. [198], важная роль в регуляции эмбрионального развития у коров-доноров эмбрионов принадлежит стероидным гормонам, выделяемым яичниками: эстрогенам и прогестерону. Эстрогены секретируются гранулёзными клетками фолликулов. Синтез и выделение эстрогенов увеличивается под влиянием ФСГ и ЛГ. Биологическое действие эстрогенов многогранно: они обуславливают пролиферацию маточных и вагинальных тканевых структур, в том числе способствуют повышению проницаемости капилляров эндометрия, улучшают кровоснабжение половых органов, увеличивая приток кислорода к ним, активизируют белковый и другие виды обмена.

Прогестерон, секретируемый жёлтым телом яичника, вызывает пролиферацию секреторных клеток эндометрия, способствует образованию эмбриотрофа маточными железами, оказывает сосудорасширяющий эффект на кровеносные сосуды матки и яичников, увеличивая кровоток в половых органах самки. По принципу обратной связи прогестерон влияет на гипофиз, тормозя выделение гонадотропных гормонов. В присутствии прогестерона увеличение концентрации эстрадиола не вызывает пика ЛГ. Необходимость секреции прогестерона жёлтым телом для сохранения беременности доказана для всех видов животных. Процессы, регулирующие существование и функцию жёлтого тела яичника у высокопродуктивных коров молочного направления продуктивности до конца ещё не выяснены и всесторонне изучаются. У большинства видов сельскохозяйственных животных поддержание функциональной активности жёлтого тела при беременности находится под контролем комплекса гормонов, в котором ведущая роль принадлежит гормонам гипофиза – ЛГ и ФСГ. Они оказывают прямое стимулирующее действие на лютеальные клетки, продлевая их существование и способствуя секреции прогестерона [199, 200].

Механизм, посредством которого находящийся в матке у коров-доноров эмбрион предотвращает лизис жёлтого тела, еще до конца не изучен. Основным фактором, вызывающим лютеолизис у коров, является простагландин  $F_2\alpha$  маточного происхождения. В организме беременных коров секреция простагландина

F<sub>2</sub>α значительно снижена и не увеличивается в ответ на введение окситоцина или эстрадиола. Присутствующий в матке эмбрион выделяет специфические белки, которые обладают антилютеолитическим действием. Эти белки секретируются зародышем с 15 дня развития. При этом установлено, что источником синтеза антилютеолитического фактора является трофобласт зародыша. В экспериментальных исследованиях доказано, что только достигший определённых размеров эмбрион (не менее 15 мм) способен выделять достаточное, для предотвращения регрессии жёлтого тела, количество белка [201].

В настоящее время много исследований посвящено изучению биологически активных веществ (прогестерон, лютеолизин и др.), способных усилить функциональную деятельность репродуктивных органов и систем, повысить приживляемость эмбрионов при искусственном осеменении животных [202, 203].

Однако полностью оценить возможные преимущества вышеуказанных разработок пока не удалось применительно к высокопродуктивным коровам, используемым при трансплантации эмбрионов, поскольку проявление фенотипических признаков обусловлено генетическими и внешними условиями. Если жизнеспособность после извлечения или выживаемость замороженно-оттаянных эмбрионов после трансплантации в матку рассматривать как фенотипический признак, то его гибель может происходить в результате отклонения от нормы генетических или внешних условий жизнедеятельности, а также их взаимодействия. Поэтому при современных условиях вступления Беларуси в эпоху рыночных экономических отношений стоит задача усовершенствовать один из ключевых элементов метода трансплантации, а именно технологию криоконсервации эмбрионов полученных от выдающихся по продуктивности коров-доноров. Поскольку имеющееся в РУСП «Племзавод «Россь» поголовье генетически высокоценных животных представляет собой созданное последними тремя десятилетиями стадо лучших генотипов на территории республики, злободневным становится вопрос о реализации генетического материала (эмбрионов), как внутри Беларуси, так и за ее пределы. Это требует дополнитель-

ных научных разработок со стороны учёных УО «ГГАУ», а также РУП «Институт животноводства НАН Беларуси» в направлении изучения механизма замораживания и оттаивания эмбрионов, влияния на процесс криоконсервации различных биотехнологических факторов. Это также относится к диагностике, профилактике и терапии послеродовых заболеваний коров, являющихся основными причинами эмбриональных потерь.

#### **1.4. Эмбриональные потери и их предупреждение**

В течение последних двадцати лет собрана достаточно полная информация о причинах, приводящих к увеличению эмбриональных потерь у сельскохозяйственных животных. В значительной степени этому способствовало развитие исследований в области биотехнологии. Появление и совершенствование радиоиммунологического исследования гормонального статуса животных в различные физиологические периоды, синтез и выделение гормонов, участвующих в регуляции их воспроизводительной функции, развитие метода трансплантации эмбрионов дало ученым возможность установить влияние различных факторов на эмбриональное развитие, а также выявить механизмы повреждающего действия на эмбрионы различных агентов.

Известно, что как после естественной случки, так и после искусственного осеменения только 50% коров остаются стельными. Долгое время этот факт объясняли исключительно неудачами оплодотворения [204]. Однако впоследствии было убедительно доказано, что у высокопродуктивных коров оплодотворяется 80...90% яйцеклеток, но затем на разных стадиях развития происходит отмирание значительной части зародышей. Пренатальные потери у крупного рогатого скота составляют, по данным учёных, 60% всех воспроизводительных потерь.

Как показывают исследования большая часть эмбрионов у коров-доноров погибает в ранний период внутриутробного развития, а именно, до 45 дня. Потери эмбрионов, по данным учёных, в это время достигают 75%. На различных стадиях внутриутробного развития гибель эмбрионов не одинакова. В онтогене-

зе всех животных существуют периоды, когда чувствительность организма бывает повышенной, а приспособительные способности уменьшены. Эти периоды получили название «критических». Специальными экспериментами, проведёнными Неверовой Л.Г. [205] на коровах дойного стада, а впоследствии на коровах-донорах эмбрионов, установлено, что к «критическим» периодам их репродуктивной функции относят стадии оплодотворения, дробления, имплантации и плацентации. Используя метод нехирургического извлечения эмбрионов она установила, что максимальная гибель эмбрионов у коров наступает между 3 и 4 днями стельности. В это время их погибает до 40%.

Решетникова Н.М. [206] в своём обзоре литературных данных приводит несколько иные результаты, в соответствии с которыми наибольшие потери эмбрионов приходится на 7 и 8 дни внутриутробного развития, когда зародыши коров попадают в матку и освобождаются от прозрачной оболочки. Авторы указывают, что в это время происходит отмирание 70% эмбрионов, 10...15% зародышей гибнет во время имплантации и 5...9% в период плацентации. Гибель эмбрионов установлена на следующих стадиях развития: зиготы – 8%, бластоцисты – 23%, при закладке органов 36%. При этом отмечено, что потери эмбрионов увеличиваются к 16...17 дням внутриутробного развития, а также между 28 и 43 днями.

Важное значение, для нормального развития эмбрионов, имеет возраст гамет к моменту оплодотворения. Исследованиями Осташко Ф.И. и др. [207], Betteridge К.Ж. [208] установлено, что несвоевременное осеменение самок крупного рогатого скота отрицательно сказывается на сохранении беременности. Старение как мужских, так и женских гамет вызывает в них необратимые изменения, которые не препятствуют оплодотворению, но приводят к резкому снижению жизнеспособности эмбрионов и их гибели.

Экспериментальными исследованиями установлено, что на уровень эмбриональной смертности существенное влияние оказывает время осеменения коров после отёла. Из-за неподготовленности эндометрия для развития зародыша ранние осеменения

приводят к прерыванию стельности у коров, а результаты осеменения в первый месяц после отёла бывают низкими. На основании морфологического и гистологического изучения слизистой оболочки матки коров в различные сроки после отела авторами был сделан вывод о том, что ее полное восстановление происходит к 50 дню.

К прерыванию внутриутробного развития могут приводить различные половые инфекции. Основную роль в гибели эмбрионов у крупного рогатого скота отводит таким специфическим инфекциям как инфекционный ринотрахеит и вирусная диарея. Кроме того, в последние годы в связи с высокой концентрацией животных и ростом их продуктивности появилась тенденция к увеличению числа самок с послеродовыми осложнениями, что свидетельствует о снижении естественной резистентности таких животных. В этих условиях происходит контаминация половых путей коров даже неспецифической, непатогенной микрофлорой, широко распространенной в окружающей среде.

Авторы обнаружили в матке коров-доноров эмбрионов с субклиническим эндометритом кистозное перерождение маточных желез. Выживаемость эмбрионов у таких животных была значительно снижена.

Большинство учёных связывают снижение плодовитости с ростом молочной продуктивности коров. Они выдвигают гипотезу об ингибирующем действии высокой молочной секреции на половую функцию самок. В исследованиях Чалаева А.М. [138] обнаружена прямая корреляция между уровнем молочной продуктивности и продолжительностью сервис-периода у коров. Автор отмечает, что повышение удоя приводит к снижению оплодотворяемости коров и выживаемости эмбрионов. Анализ воспроизводства стада показал, что повышение удоя за лактацию на каждые 1000 кг молока приводит к снижению воспроизводительной способности коров: стельность от первого осеменения снижается на 5...15%, увеличивается на 7...27 дней продолжительность сервис-периода и на 6...16% количество коров с межотельным периодом более 365 дней.

В ряде исследований выявлена связь плодовитости высокопродуктивных коров с сезоном года. По наблюдениям Казаровца Н.В. [209] подавляющее большинство коров плодотворно осеменялись в летний и осенний периоды по сравнению с зимне-весенним. Данное явление автор связывает со снижением витаминной обеспеченности животных во время стойлового содержания. Также выявлена зависимость плодовитости крупного рогатого скота от молочной продуктивности. Ученые отмечают, что при её возрастании результативность осеменения коров резко снижается.

Также было установлено, что с увеличением продуктивности животных происходит удлинение сервис-периода. Средняя продолжительность его по стаду составляла 132 дня. Причем наивысший показатель наблюдался у животных с удоем 5,0... 5,5 тыс. кг и составлял 208 дней. Наименьший установлен у животных с удоем от 2,5 до 3,0 тыс. кг молока за лактацию – 93 дня. При увеличении удоя на 1,2...2,0 тыс. кг сервис-период удлинялся на 115 дней. С увеличением продолжительности сервис-периода на 1 день, удой за лактацию возрастал на 13...17 кг. Кроме того, с повышением продуктивности увеличивался коэффициент осеменения, который в среднем по стаду составлял 2,3; у животных с уровнем продуктивности от 5,0 до 5,5 тыс. кг – 2,8. Наименьший коэффициент наблюдался у коров с удоем за лактацию до 2,5 тыс. кг молока – 1,3.

Известно, что на воспроизводительную функцию коров огромное влияние оказывает кормление, которое должно удовлетворять потребности животных во всех основных питательных и биологически активных веществах, в том числе и витаминах. Существующий в настоящее время силосно-сенажно-концентратный тип кормления, направленный на получение высоких удоев, отрицательно влияет на состояние обмена веществ и процесс воспроизведения коров, в том числе на образование полноценных гамет, рост и развитие эмбрионов и плодов. По данным Попова Н.И. [210], Шубина А.А. и др. [211] недостаточная обеспеченность рациона высокопродуктивных коров по витаминно-минеральному составу приводит к снижению плодовитости, со-

проводится уменьшением концентрации прогестерона в сыворотке крови и увеличением случаев эмбриональной смертности. При изучении влияния рационов с различным содержанием концентратов на состояние обмена веществ жвачных учёные установили, что при увеличении доли концентрированных кормов в рационе, происходит снижение уровня каротина и витамина А в сыворотке крови животных.

Интенсивное использование культурных пастбищ требует внесения в почву больших доз азотных удобрений. Повышенное содержание нитратов и нитритов в зелёном корме оказывает отрицательное влияние на здоровье высокопродуктивных животных, ухудшает использование каротина и превращение его в витамин А в организме. Исследования проведённые в ряде хозяйств в летний период показали, что несмотря на значительное поступление каротина в организм животных с зелёным кормом (1900...3000 мг на животное) концентрация каротина в сыворотке крови нетелей, первотёлок и коров существенно снижалась, а содержание витамина А составляло 280...400 мг на 1 л., то есть было значительно ниже нормы [212].

Таким образом учёными доказано, что несбалансированное кормление, недостаток в рационе животных витаминов, оказывают неблагоприятное воздействие на организм высокопродуктивных животных.

Изучение причин, вызывающих гибель эмбрионов у коров, показало, что у них имеются стойкие нарушения в соотношении гормонов, ответственных за становление стельности и создание благоприятной для развития эмбрионов маточной среды. При изучении гормонального статуса у коров с многократными безрезультатными осеменениями установлено, что выживаемость эмбрионов у них зависит от соотношения эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови в ранний период после осеменения. Так животные с нормально развивающимися эмбрионами имели более высокую концентрацию прогестерона на 3 и 6 день после осеменения, чем с неоплодотворёнными ооцитами и дегенерированными эмбрионами. Эмбриональная смертность, по данным автора, является результатом нарушения баланса стероидных

гормонов у коров. По другим данным, нарушение гормонального статуса организма высокопродуктивных коров-доноров приводит к изменению состава среды яйцеводов и матки, снижению секреции маточных желез, кистозному перерождению яичников [213].

С внедрением в практику животноводства трансплантации заморожено-оттаянных эмбрионов нехирургическим методом, процент стельности используется как показатель гибели эмбрионов, связанный с его применением. Исследования большинства специалистов при этом согласуются по трём основным положениям:

1. Независимо от применяемых современных технологических приёмов, процент гибели эмбрионов всегда имеется;

2. Чем более длительному холодовому воздействию подвергается эмбрион, тем выше эмбриональная стельность;

3. Результативность пересадки эмбрионов повышается в соответствии с уровнем профессиональной подготовки специалистов на местах. При этом подчёркивается глубина знания ими возможных причин, приводящих к нарушению процесса оплодотворения яйцеклеток или развития зиготы.

По результатам исследований доказано, что в технологии трансплантации эмбрионов большое значение имеет учёт закономерности изменения гормонального статуса животного в течение полового цикла. Как известно, гормон прогестерон продуцируется желтым телом яичника, корой надпочечников и плацентой у стельных коров и способствует сохранению беременности. Одновременно он нейтрализует действие окситоцина на маточную мускулатуру, тормозит рост фолликулов и др.

Большинство авторов сходятся во мнении, что одной из причин, вызывающих гибель эмбрионов, является недостаточная активность жёлтого тела, приводящая к нарушению процесса оплодотворения и эмбрионального развития в организме самок крупного рогатого скота. При этом делается вывод, что после прихода реципиента в охоту его матка приобретает способность реагировать на повышенные концентрации прогестерона при внутримышечном инъекции 12 мл 12,5% раствора оксипро-

гестерона капроната пролонгированного действия: первый раз за 48 часов до эмбриопересадки и повторно на 15-й день полового цикла. Это способствует повышению приживляемости эмбрионов на 23%. По мнению авторов, морфологическая оценка стадии развития эмбриона непосредственно перед пересадкой – субъективна. Пересадка эмбрионов, которые находились на разных стадиях развития, дала возможность определить, что ранние бластоцисты лучше пересаживать через 45 ч после введения прогестерона, а поздние – через 52 ч. Так, эмбрионы от суперовулировавших доноров имеют интервал в развитии, эквивалентный 24 ч и более.

Поскольку одной из причин, вызывающих неудачи оплодотворения и гибель эмбрионов при проведении их трансплантации, является недостаточность функции жёлтого тела яичников Грызловым В.П. [135], Горбуновым Ю.А. и др. [214], Клинским Ю.Д. и др. [215, 216] указано на возможность эффективного применения прогестерона осеменённым животным-донорам эмбрионов для снижения пренатальных потерь у крупного рогатого скота. По данным Хилькевич С.Н. [217], Смылова Н.И. и др. [218] целесообразным является создание базовой концентрации прогестерона в первые два дня после охоты, а затем повторное введение его в период активного жёлтого тела, т. е. на 6...7 день. Трёх-пятикратное введение различных доз прогестерона коровам снижало эмбриональную смертность на 10...15%, А десятикратная инъекция, начиная с 10 дня после осеменения, повышала оплодотворяемость тёлочек на 10...13%. Однократное применение прогестерона пролонгированного действия – капронат оксипрогестерона, сократило эмбриональную смертность у многократно безрезультатно осеменённых коров с 45,4 до 13,3%. По результатам исследований, эффективность применения инъекции гестагеновых препаратов объясняется наличием статистически достоверного подъёма среднего уровня прогестерона на 3-й день после его введения.

На основании многочисленных и разносторонних исследований было установлено, что пролонгирующее действие препарата (КОП-17а) способствует нормальной обеспеченности про-

гестероном организма животных и повышению приживляемости эмбрионов после искусственного осеменения на 8...12%, а после трансплантации их животным-реципиентам – на 23%. Одновременно выявлена тенденция роста концентрации гормона в крови после инъекции данного препарата животным на 5 и 15-й дни полового цикла и заметное её снижение после введения на 25 день. Прокофьевым М.И. [219] рекомендуется обрабатывать животных стероидным гормоном пролонгирующего действия – 17-гексаноксипрогестероном на 6 и 10 дни полового цикла, с целью профилактики патологических процессов, связанных с недостаточностью функционирования жёлтого тела беременности у животных.

В других аналогичных исследованиях ученые указывают на эффективность двукратной обработки тёлочек при искусственном осеменении прогестагеном, первый раз за 48 часов до введения спермы в половые пути и повторно – на 15-й день цикла. Оплодотворяемость повысилась на 23%, что подтверждает специфичность действия 12,5%-го раствора КОП-17а. Он отличается от традиционного 1-2,5%-х растворов гормона тем, что в положении C<sub>17</sub> содержит остаток капроновой кислоты. Пролонгированное действие его продолжается в течение от 10 до 15 суток после каждого парантерального введения. Следовательно, как указывают результаты полученных автором экспериментальных данных, двукратная обработка самок препаратом в дозе 12 мл может быть использована с целью профилактики ранней эмбриональной и плодовой смертности [202].

Положительный эффект объясняется тем, что инъекции препарата совпадают с критическими периодами развития зародышей на ранних стадиях беременности. Ими, при пересадке 7-дневных эмбрионов, является возраст между 10 и 30 днями. В это время зародыш после выхода из прозрачной оболочки попадает в неблагоприятные условия маточной среды, которые иногда не соответствуют стадии его развития. Динамика уровня прогестерона у реципиентов с погибшими зародышами может быть такой же, как при нормальном половом цикле (4,86 нг/мл на 12-й день цикла и 0,63 нг/мл на 18-й день). Второй такой пе-

риод отмечен между 16 и 17-м днём. У реципиентов с прижившимися эмбрионами наблюдалось снижение уровня прогестерона с 4,86 нг/мл (на 12-й день) до 1,88 нг/мл (на 18-й день), т. е. это указывает на лизис (рассасывание) жёлтого тела.

Однако, по мнению Sreenan I. [220], применение прогестерона отрицательно сказывается на развитии и секреторной активности жёлтого тела и на его сохранении у коров. Аналогичные данные получили по результатам своих исследований также Neuman I. [221], Maurer R.R. [222], которые также не обнаружили положительного влияния инъекций прогестерона на выживаемость эмбрионов у коров и тёлочек, несмотря на то, что обработка стимулировала заметное увеличение размера и образования дополнительного количества жёлтых тел, а также рост в периферической крови данного гормона.

Таким образом, имеются довольно противоречивые мнения о роли экзогенного прогестерона в повышении приживляемости зародышей после искусственного осеменения или трансплантации эмбрионов. Они обусловлены тем, что эффективность действия гормонов в каждом отдельном случае зависит от чувствительности и состояния тканей – органов мишеней.

Анализ данных обзора литературы показывает, что гибель эмбрионов является одной из причин снижения плодовитости высокопродуктивных коров в условиях интенсификации молочного скотоводства. Многочисленные факторы внешней среды могут вызывать нарушения нейро-гуморальной регуляции организма и изменять состояние трофических процессов в половых органах самок, что приводит к прерыванию внутриутробного развития, эмбриональным потерям и гибели плодов. Несмотря на многообразие неблагоприятных факторов механизм их воздействия на эмбриогенез высокопродуктивных коров, как установлено исследованиями последних лет, заключается в изменении гормонального баланса и состава маточной среды, которая становится неблагоприятной для развития эмбриона.

Из приведённых литературных данных также видно, что в процессе эмбрионального развития всех животных имеются периоды, получившие название критических, когда адаптационные

и защитные возможности организма значительно снижены. Как следует из представленных результатов исследований, именно эти периоды связаны с наибольшими эмбриональными потерями у крупного рогатого скота. Однако, существующие в настоящее время многочисленные методы предупреждения эмбриональной смертности направлены на последний, плодный период внутриутробного развития и не учитывают критические периоды раннего эмбриогенеза.

Очевидно, что при переходе животноводства на промышленную основу изменились условия кормления животных. Для получения высоких удоев увеличивается доля концентратов в рационе при применении силосно-сенажно-концентратного типа кормления. Из-за повышенной кислотности в преджелудках организм животного испытывает недостаток в витаминах и гормонах. Поэтому изучение действия экзогенных биологически активных веществ на воспроизводительную функцию животных, с учётом «критических» периодов развития, даст возможность разработать новые методы профилактики эмбриональных потерь у коров-доноров.

Основой для разработки нами способа повышения приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов у коров-доноров могут служить исследования вышеуказанных учёных. Однако они проведены, без учета уровня молочной продуктивности и в большинстве случаев за пределами Республики Беларусь. Поэтому необходимо изучение особенностей проявления воспроизводительной функции у коров в зависимости от продуктивности, а также применительно к условиям работы центра трансплантации эмбрионов в РУСП «Племзавод «Россь» Волковысского района Гродненской области. Это позволит осуществлять более ускоренное размножение животных желательного генотипа посредством использования криобанка эмбрионов.

Генетическая ценность и биологическая жизнеспособность эмбрионов во многом зависит от возможности отбора быков-лидеров, обладающих высокой плодовитостью, для определения которой необходимы точные и объективные методы оценки получаемой от них спермопродукции. Учитывая, что высокая эф-

фektivность трансплантации замороженно-оттаянных эмбрионов достигается при использовании для осеменения высококачественной спермы быков-производителей, на современном этапе развития животноводства появилась необходимость в разработке точного, простого, доступного и объективного метода ее оценки.

### **1.5. Оценка замороженно-оттаянной спермы**

Исследований по изучению связи между качеством спермы быков-производителей и биологической полноценностью и приживляемостью эмбрионов в организме реципиента пока не проводили. Это объясняется, прежде всего, тем, что применяемая в настоящее время визуальная оценка качества спермы под микроскопом по подвижности спермиев слишком приближительна и субъективна. Два других используемых метода оценки - на выживаемость спермиев и по концентрации их в дозе для осеменения не позволяют дать достаточно объективной и точной характеристики. Между тем известно, что в отличие от ядра плазматическая мембрана, и акросома спермиев представляют собой гликопротеидные образования которые содержат много воды и поэтому являются лабильными структурами, а следовательно в первую очередь подвергаются криогенному воздействию. Это зачастую приводит к ошибкам в прогнозировании оплодотворяющей способности спермы, поскольку показатели их подвижности и выживаемости практически не меняются [223, 224, 225, 226, 227].

Авторы указывают, что ценность эякулята определяется генетическим потенциалом спермы и ее оплодотворяющей способностью, зависящей, прежде всего, от жизнеспособности спермиев. Метод прямого определения оплодотворяющей способности спермы по количеству живых телят, полученных от самки после первого осеменения, требует много времени, поэтому необходима ее предварительная оперативная оценка. Следует иметь в виду, что результативность осеменения зависит также от индивидуальных особенностей самок, условий их кормления, содержания, состояния репродуктивных органов и

квалификации осеменаторов. Однако если параметры этих факторов нормальные, главная роль отводится качеству спермы.

Известна оценка спермы по концентрации спермиев методом биохимиolumинесценции, подвижности спермиев методом лазерной спектроскопии оптического смещения, электронно-микроскопическое исследование целостности спермиев [228]. По данным Раковского Я.П. и др. [229], Рустенова А.Р. и др. [230], Graham E.F. et al. [231] наиболее распространенный на практике и применяемый в настоящее время способ определения качества спермы по подвижности спермиев, включающий 10-балльную ее оценку под микроскопом несовершенен, прежде всего в силу своей субъективности и недостаточной точности. Предварительно было осуществлено много попыток разработать более точные, объективные методы. Так подвижность спермиев можно определить, применяя сложный метод фильтрации спермы через сефадекс, являющийся молекулярным ситом и представляющий собой гранулированный гель полисахарида – декстран, у которого после соответствующей обработки цепи сшиваются трехуглеродными мостиками. Неподвижные спермии при этом не проходят через фильтр. Данный способ позволяет определить количество неподвижных спермиев сравнивая концентрацию спермиев до и после фильтрации [232].

Морозовым В.А. [233] еще в 1938 году для более точного определения числа подвижных и неподвижных спермиев в дозе для осеменения впервые был предложен метод прижизненного окрашивания их эозином. Этот метод объективной оценки известен как счисление мертвых и живых спермиев, длительное время применяемый на госплемпредприятиях. Он основан на том, что живые спермии не окрашиваются, так как не впитывают в себя краситель, в то время как мертвые окрашиваются в розовый цвет. Но он мало приемлем для спермы, разбавленной средами содержащими желток и глицерин, так как в их присутствии живые спермии также в большинстве своем окрашиваются эозином. Кроме того, подсчет 500 спермиев с одновременным дифференцированием их на окрашенных и неокрашенных трудоемок и утомителен. Было осуществлено множество неудачных

попыток для поиска приемлемых вариантов этого метода другими учеными в разных странах.

Установлено, что показатели подвижности и количества живых спермиев в дозе после оттаивания не являются достаточно надежными критериями оценки качества спермы, так как они не всегда коррелируют с оплодотворяющей способностью спермиев. Поэтому наряду с оценкой спермиев по подвижности авторы предлагают оценивать сперму перед осеменением по показателю выживаемости спермиев в часах. Принцип данного метода заключается в установлении подвижности спермиев за каждый последовательный интервал времени в процессе хранения спермы при +2 и +5°C или при + 38°C. При этом сперма после оттаивания должна обладать следующими показателями: выживаемость при 38°C – не менее 5 ч и абсолютный показатель живучести – 14. Хотя данные показатели дают больше информации о жизнеспособности спермиев по сравнению с другими существующими методами, но и они не являются достаточно объективными. Известны также более сложные методы оценки подвижности спермиев: электронефелометрический и с использованием ультрафиолетового спектра; оценка подвижности и скорости движения спермиев с помощью телесъемки [234, 235, 236].

Однако применение всех этих методов в практических условиях малодоступно из-за трудоемкости, сложности, необходимости иметь специальное дорогостоящее оборудование и недостаточной точности оценки. Принципиальный недостаток предложенных методов в том, что при подсчете засчитываются все виды движения спермиев, в том числе маневренное и колебательное.

Другой важнейший тест определения биологической полноценности спермиев – по состоянию акросом, предложенный не был внедрен в практику из-за несовершенства отдельных элементов его применения. Отмечена высокая положительная корреляция между оплодотворяемостью коров замороженно-оттаянной спермой и целостностью акросом спермиев после оттаивания.

Другим предложением по оценке качества спермиев быков было осуществление контроля за состоянием апикального края акросомы, хорошо различимого под фазовым контрастным или интерференционным микроскопом Номарского, касающегося ее утолщения. Была обнаружена положительная корреляция ( $r=0,60$ ) между процентом спермиев с интактной акросомой и их оплодотворяющей способностью. Только благодаря применению этого метода стало возможным развитие техники замораживания спермы хряков. Однако для спермиев жеребцов и кобелей этот метод оказался не пригоден из-за отсутствия утолщения апикального края. Предложен также метод, заключающийся в окрашивании акросом флуоресцентными красителями и определении коэффициента вариаций площади и сухой массы головок спермиев для оценки качества спермы. При использовании спермы с содержанием 76, 64 и 46% спермиев с сохранившимися акросомами оплодотворяемость ооцитов составила 53,0; 48,6 и 37,8% соответственно.

Большинство повреждений акросом происходит в основном при разбавлении, а само замораживание повреждает их в меньшей степени. Акросома вырабатывает ферменты гиалуронидазу, акрозин и кислую фосфатазу, участвующие в оплодотворении. Набухание, отслоение и разрывы акросомы наблюдаются при разбавлении спермы. Это также зависит от состава среды и криопротектора, а также от соблюдения технологии при охлаждении, эквilibрации, в результате чего может произойти холодовой удар, в процессе замораживания и оттаивания. На сохранность акросом влияют индивидуальные особенности организма быка. Например, заболевание придатков семенников обусловлено увеличением повреждений спермиев. Акросома разрушается, когда часто, например 2...3 раза в сутки в течение нескольких месяцев извлекают канистры с замороженной спермой из жидкого азота сосудов Дьюара. Поэтому очень важно регулярно следить на пунктах искусственного осеменения за уровнем жидкого азота, не поднимать канистры высоко из горловины сосуда, приобретать сперму в небольшом количестве (на 2-3 месяца) или хранить ее в нескольких канистрах [237].

По результатам исследований Горбунова Ю.А. и др. [238], Будевича А.И. и др. [142, 239, 240, 241, 242] спермии, утратившие акросому, неспособны оплодотворить ооциты. Выявлена высокая корреляция между результатами осеменения и состоянием акросом спермиев. Поэтому, для более достоверной оценки биологической полноценности спермиев признано необходимым учитывать их количество с поврежденными или разрушенными акросомами. Оценка спермы по состоянию акросом применяется во многих странах. В Республике Беларусь этот метод в настоящее время пока не используется, хотя авторами и разработана простая и доступная для практических условий методика, имеются материалы и необходимые приспособления к оборудованию. К ним относятся: конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 к микроскопам МБИ и МБР, Zasilacz-zh-100 (Польша), осветители дающие сильную освещенность или микроскопы с вмонтированным источником освещения. По разработанной авторами методике для оценки состояния акросом и замедления скорости движения спермиев на предметное стекло наносят глазной стеклянной палочкой 1 маленькую каплю оттаянной спермы и рядом с ней однограммовым шприцем 3 капли из слоя содержащего жидкий белок свежеснесенного куриного яйца, такого же объема. Капли белка и спермы тщательно перемешивают. Подсчитывают число подвижных спермиев в поле зрения микроскопа, отдельно регистрируя с неподвижными и частично или полностью разрушенными акросомами, а затем в этом же поле в таком же порядке – неподвижных. Ведут подсчет спермиев в 10...15 полях зрения микроскопа а затем вычисляют их процент. Однако данная методика также требует усовершенствования, прежде всего в сторону точности оценки состояния акросом, которую можно повысить использованием микроскопа с более высокой разрешающей способностью [243] .

В результате многолетних исследований рядом ученых доказано, что в исследованных образцах отчетливо различаются три категории спермиев: 1. Биологически полноценные – яркое свечение всего контура головки, тела и жгутика; 2. Неполюценные – разбухшая акросома (слабо заметен тусклый контур пе-

редней половины головки, но отчетливо выражен на подобие вилочки задний ядерный колпачек и жгутик); 3. Полностью разрушенные акросомы и задний ядерный колпачек (контуры всей головки незаметны). Реже встречаются еще две категории неполноценности спермиев: расслоение акросомы и ее зернистый распад. При этом делается учеными вывод, что спермии лишены акросомы неспособны оплодотворить ооциты. Потеря фермента – глютаминовой щавелевой трансминазы, наблюдаемая при замораживании спермиев, вследствие нарушения целостности мембраны, также может служить показателем их повреждения. Потерю фермента выражают числом межд. ед. (МЕ) в расчете на  $10^9$  клеток. Однако при применении метода замораживания высушивания этот показатель недостаточно отражает качество спермиев [244, 245, 246, 247, 248, 249].

В современных условиях, в результате внедрения метода трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота в производство, назрела необходимость в точном прогнозировании оплодотворяющей способности каждой дозы используемой спермы. Это объясняется тем, что снижение биологической полноценности ее оказывает влияние в дальнейшем на рост и развитие зиготы и эмбриона. Во Всероссийском НИИ животноводства Ельчаниновым Л.П. [250] разработаны методические рекомендации по объективной оценке спермы быка и прогнозированию результатов искусственного осеменения. Для этого выведено специальное уравнение, по которому вычисляется критерий оплодотворяющей способности спермы. Оно представляет собой произведение логарифма величины миграции спермиев в начальный период после оттаивания. Автор отмечает, что, хотя данный метод требует существенных затрат, времени и навыка в проведении математических расчетов, он позволяет с высокой точностью прогнозировать оплодотворяющую способность спермы.

Поскольку спермий представляет собой гамету с определенным периодом выживаемости и высокой степенью подвижности, то в работах многих других ученых уделено внимание определению связи между скоростью движения спермиев и их оплодотворяющей способностью. Математически дано описание

понятия «миграция», как произведение числа прямолинейно-поступательно движущихся спермиев на среднюю скорость их движения. Установлено, что в замороженно-оттаянной сперме производителя первоначальная средняя скорость движения половых гамет характеризует их оплодотворяющую способность. С увеличением скорости движения спермиев с 59 мкм/с и выше наблюдалось снижение их оплодотворяющей способности [251, 252, 253, 254].

В исследованиях авторов описана оценка спермы с помощью длительно экспонированной фотографии, компьютерной видеомикрофотографии в автоматизированных системах Cell Soft, НТС, дающих характеристику концентрации, подвижности и скорости движения спермиев. Применение микрокиносъемки движущихся спермиев с целью спектрофотометрического и турбодиметрического контроля подвижности, путем лазерно-компьютерного анализа качества спермы и проведенного посредством прибора «ЛАОКС-2», позволяют измерять количество подвижных клеток, частоту вращения головок спермиев, среднюю скорость и распределение по скорости движения, энергию движения, как показатель выживаемости и оплодотворяющей способности и концентрацию спермиев. Установлена спонтанная биохимилюминисценция половых клеток, отражающая физиологическую полноценность спермиев. Методом ультразвуковой цитолозиметрии определена механическая резистентность спермиев под действием ультразвука с частотой 880 кГц, интенсивностью 1 Вт/см<sup>2</sup>, которая в 98% случаев позволяет дать количественную объективную оценку эякулятам, не прибегая к микроскопическим исследованиям [255, 256, 257, 258, 259, 260, 261]. В том числе предложен объективный метод оценки качества спермы по резистентности спермиев (устойчивость оболочки спермиев к воздействию 1%-ного раствора хлористого натрия). Его сущность в том, что резистентность к действию раствора хлористого натрия определяется мощностью липопротеидного покрова спермиев. Ионы хлора постепенно разрушают этот покров и спермии, лишённые защитной оболочки, погибают.

В ряде других исследований авторы разработали метод оценки целостности акросомы и оплодотворяющей способности спермы быка посредством использования метода прижизненной окраски спермиев. Elmore R.G. [262] установил, что окраска по Бриан-Акруку является наиболее точной для оценки акросомальных мембран спермиев. Это позволяет правильно характеризовать состояние акросом в популяции спермиев при капацитации *in vitro* и более точно определять время необходимое для достижения ими биофизического состояния, обеспечивающего максимальную оплодотворяющую способность. разработал метод оценки качества спермы быков-производителей по морфологическим признакам. Для этой цели готовят мазки спермы, окрашивают эозин-нигрозином и подсушивают на воздухе. Под микроскопом с использованием иммерсионного объектива подсчитывают не менее 100 спермиев. Спермии классифицируются как нормальные с первичными и вторичными дефектами. С первичными дефектами выходят из канальцев семенников с изменением формы головок, двуххвостыми, с повреждением осевой нити в средней части клеток, проксимальной протоплазматической капелькой, закручиванием хвоста. С вторичными – из выводящих протоков выходят отдельные головки, обнаруживаются дистальная протоплазматическая капелька и частичный отрыв хвоста.

Для оценки качества спермы по морфологическим признакам предложена система баллов: сперма очень хорошего качества – 40, хорошего – 24, плохого – 3. Особое значение придается наличию примордиальных зародышевых клеток, появление которых указывает на наличие дегенеративных изменений в семенниках [263, 264, 265].

Имеются данные исследователей, где оцениваются способы окрашивания, применяемые для установления целостности плазматических мембран и мембран акросом. При этом авторы используют сперму баранов и быков как свежеполученную, так и заморожено-оттаянную. Для окрашивания применяют: нигрозин-эозин, нигрозин-эозин-гимза, Hoechst 33258, карбоксифлуоресцеин + пропидиум йодид (ПИ), SYBR -14+ПИ, Pisumsativum

+ флуоресцеин изотиоцинат (ФиТЦ), хлортетрациклин и ФИТЦ-меченные моноклональные антитела мышей против акросомальных белков человека. Способы окраски оценивают по точности, простоте использования, требующейся для этого аппаратуре, повторяемости. Однако в дальнейшем установлено, что ни по отдельности, ни в комбинации эти способы не обеспечивают надежную окраску плазматической и акросомной мембраны спермиев [266, 267, 268].

Авторами также был предложен способ определения морфо-функционального состояния акросом спермиев по концентрации ионов калия в жидкой части спермы как до, так и после добавления в нее средства, разрушающего плазматические мембраны, например дигитонина. Состояние акросом спермиев достаточно высоко и статистически достоверно коррелирует с результатами искусственного осеменения. В других исследованиях проводили оценку спермы с помощью анализатора Гамильтона НТМ-2030. По их результатам установили, что этим прибором можно быстро, точно и объективно определять параметры качества спермы по подвижности и концентрации спермиев в дозе [269].

В других опытах [270] изучали проблему быстрой и точной оценки качества спермиев быков посредством биохимических тестов. За основу брали такие показатели, как подвижность спермиев, окислительную способность и процент клеток, мембраны которых проницаемы для этидиум бромид и сукцината. Однако в связи с вовлечением в процессы обмена разных факторов и механизмов регуляции, эти тесты не во всех случаях отражали жизнеспособность спермиев. Следовательно, получить четкую характеристику функциональных возможностей спермиев по этим параметрам сложно.

Таким образом, известно много объективных и субъективных методов оценки качества спермиев в дозе спермы, основанных на биохимических, морфологических, биологических и других свойствах спермиев. Среди них можно выделить три основных: определение подвижности, выживаемости и состояния акросом спермиев. Этим методам достаточно для оценки заморо-

жено-оттаянной спермы. Однако используемый в практике метод определения их подвижности субъективен, а потому требует дальнейшего совершенствования, равно как и оценка спермиев по состоянию акросом. Другие известные методы определения качества спермиев, разработанные в основном за рубежом, трудоемки, сложны, недостаточно точны и дорогостоящи. Они не нашли широкого применения в производственных условиях.

По мнению специалистов, отсутствие метода акросомной оценки качества спермы быков-производителей является одной из причин низкого показателя стельности коров от первого осеменения – не более 50%. Поэтому особый интерес представляют исследования, направленные на изучение влияния частоты встречаемости морфологических изменений и повреждений акросом спермиев в замороженно-оттаянной сперме быков [271]. Его применение в совокупности с двумя указанными методами и уже широко применяемыми в республике, может явиться одним из вполне реальных и действенных рычагов, способных повысить качественный отбор эякулятов для осеменения коров-доноров эмбрионов. Позволит получать больше жизнеспособных эмбрионов от коров-доноров, а значит, и генетически ценных быков-трансплантантов для Госплемпредприятий республики. Через использование их спермы можно оказывать селекционное давление на популяцию отечественного поголовья крупного рогатого скота, с целью реализации имеющегося продуктивного наследственного потенциала.

### **1.6. Методы индукции охоты и полиовуляции. Определение оптимального времени осеменения коров-доноров**

Репродуктивная функция коров тесно связана с состоянием эндокринных механизмов регуляции на всех этапах воспроизводства. Достигнутые в последнее время успехи в познании закономерностей нейроэндокринной регуляции половой функции в послеродовой период у коров, создали необходимые предпосылки для разработки эффективных методов управления процессом воспроизводства. При ослаблении контроля воспроиз-

водства стада животноводческие хозяйства несут большие убытки. Одним из основных путей познания этих закономерностей, является изучение динамики секреции гонадотропных и половых гормонов при спонтанном половом цикле. Уровни секреции этих гормонов являются источником информации о функциональной активности половых желез и основным критерием контроля эффективности вмешательств и прогноза воспроизводительной функции у коров. Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что характер родового процесса является одним из определяющих факторов протекания послеродового периода.

Ряд исследователей изучали индукцию и секрецию стероидных гормонов в послеродовой период у крупного рогатого скота. Однако приведённый ими обзор литературы по вопросу об уровнях данных гормонов не позволяют дать убедительных заключений, так как не представляется возможным определить степень идентичности технологического обеспечения методик по определению гормонов. Более успешная интерпретация таких результатов может быть получена, если оценивать динамику изменений концентрации гормонов в процессе восстановленного полового цикла. Так, на протяжении большей части полового цикла коров среди половых гормонов преобладает прогестерон. По данным, на уровень прогестерона в крови могут влиять кормление и сезон года. Очень низкие концентрации его выявляют в крови животного уже через 3-4 дня после образования жёлтого тела, а к 8 дню цикла количество прогестерона возрастает до постоянного уровня. В период охоты содержание в периферической крови прогестерона составляет 0,1-0, 8 нг/мл. В фазу жёлтого тела уровень прогестерона повышается в среднем до 6-7 нг/мл. Уровень прогестерона в крови в эту фазу сказывается на оплодотворяемости в следующую охоту. Многочисленные данные свидетельствуют о резком падении уровня прогестерона в крови за 1-4 дня до начала охоты. У некоторых коров концентрация прогестерона в крови снижается с 10 до 1 нг/мл за полдня, у других этот процесс длится не менее двух дней. Продолжительность периода от минимального уровня прогестерона до начала охоты может колебаться под влиянием нескольких

факторов: упитанности, стресса, лактации и др. Имеются данные, что резкое прекращение секреции гормона в конце цикла может зависеть от породы животного [97].

Ключевое значение в период полового цикла имеет процесс рассасывания жёлтого тела. Доминирующая роль в этом явлении отводится простагландину  $F_2\alpha$  маточного происхождения. Рассасывание жёлтого тела происходит на протяжении 24-28 часов от начала процесса увеличения выделения простагландина. Поэтому одной из причин увеличения продолжительности полового цикла животного на 12-24 часа может быть недостаточное количество простагландина  $F_2\alpha$ . Данные определения концентрации прогестерона в молоке и крови подтверждают реальность затянувшейся функции задержавшегося жёлтого тела у некоторых коров в первые несколько месяцев после отёла [85].

Количество эстрогенов в периферической крови колеблется от 3,6 нг/мл, за период полового цикла, до 2 нг/мл – в фазу жёлтого тела. Основным источником эстрогенов (эстрадиол-17 $\beta$ ) является фолликул яичника. В литературе имеется достаточно сведений относительно уровня эстрогенов в период охоты и после неё. По данным ряда авторов, секреция гормонов имеет 3 пика на протяжении полового цикла: 3-6; 7-10 дни и перед овуляцией, что обуславливается влиянием фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) на развитие фолликула. Максимум выделения эстрогенов происходит в последний день цикла и первые часы охоты, что совпадает с предовуляторным выбросом лютеинизирующего гормона. Концентрация эстрогенов при этом достигает 7,4 нг/мл, через несколько часов она снижается наполовину, а в течение 41 часа после начала охоты возвращается к исходному уровню.

Увеличение количества эстрогенов в конце полового цикла до максимума может продолжаться от одних суток до четырёх, после чего наступает охота. Прогестерон и эстрогены у коровы перед началом охоты находятся в противоположных (минимаксных) концентрациях. По достижении определённого уровня происходит выделение из гипоталамуса гонадотропин – релизинг гормона (Г-РГ), который поступает в переднюю долю ги-

гофиза. Ответ гипофиза на воздействие Г-РГ зависит от многих факторов, в том числе от количества стероидных гормонов яичников [272].

Гормональная система животного связана со всеми органами и системами организма, поэтому уровень гормонов в крови может зависеть от различных внешних воздействий и изменений в организме.

Знание особенностей нейрогуморальной регуляции половой функции является теоретической основой для разработки практических приемов управления ею. В настоящее время зооветспециалисты хозяйств располагают гормональными препаратами, которые позволяют индуцировать охоту и полиовуляцию у коров-доноров, находящихся в определенной стадии полового цикла. Например, наиболее высокая эффективность стимуляции возможна лишь при обработке животных в фолликулярной фазе полового цикла. В тоже время индуцированная овуляция в лютеальной фазе не обеспечивает необходимого уровня оплодотворяемости и дальнейшего нормального развития эмбрионов, поскольку в организме донора в это время находится большое количество гормона прогестерона, а фолликулы яичников содержат недостаточно зрелые яйцеклетки.

Процесс воспроизводства основывается на комплексе биологических и физиологических закономерностей. В результате сложного взаимодействия между нервной и гуморальной системами создается сложный регулирующий механизм управления функцией размножения. В настоящее время разработаны и внедрены в практику гормональные методы воздействия на процесс воспроизводства и его управление.

Чаще всего, для вызывания полиовуляции у крупного рогатого скота используются гонадотропные препараты (гонадотропин сыворотки жеребых кобыл – ГСЖК – плацентарный и фолликулостимулирующий гормон – ФСГ – из гипофиза животных), для синхронизации половых циклов – аналоги простагландина Ф<sub>2</sub>-альфа (эстрофан, магэстрофан, клопростенол, суперфан, ремофан, клатрапростин, эстуфалан и др.). Препараты ГСЖК обладают комплексной фолликулостимулирующей и лютеинизи-

рующей активностью. Период полураспада экзогенного ГСЖК у коров составляет около 6 дней. Соотношение ФСГ и ЛГ в различных партиях неодинаковое, что сказывается на результативности полиовуляции. Стимуляция роста фолликулов препаратами ГСЖК сопровождается, как правило, увеличением массы яичников, образованием после овуляции разного числа и величины желтых тел. Из-за длительного распада ГСЖК в крови животных накапливаются повышенные концентрации гормонов. Изменение эндокринного статуса при индукции полиовуляции может оказывать неблагоприятное действие на оплодотворяемость яйцеклеток, развитие зародышей, а также на физиологическое состояние половых органов (в частности, наблюдается кистозное их перерождение). Для исключения длительной стимуляции роста фолликулов применяется анти-СЖК. Обработка антисывороткой в день проявления охоты нейтрализует циркулирующую в крови животных ГСЖК и тем самым прекращает дальнейшую стимуляцию роста фолликулов в яичниках. Это создает более благоприятный фон для овуляции, оплодотворяемости яйцеклеток и последующего развития зародышей. В практике используются стандартные гонадотропные препараты высокой степени очистки: сергон (Чехия), фоллигон (Голландия), прегмагон (Германия). Эти препараты инъецируют донорам на 11-12-ый день полового цикла, однократно, в дозе 50 И.Е. на 100 кг живой массы животного. Применение этих гонадотропинов обеспечивает вызывание множественной овуляции у 75-78% животных и получение в среднем 3,5-4,0 жизнеспособных эмбрионов на донора [107].

Для вызывания полиовуляции у коров используются также гипофизарные препараты. Основное физиологическое действие фолликулостимулирующих гормонов – регулирование процесса течки. Лютеинизирующий гормон совместно с фолликулостимулирующим вызывает овуляцию и стимулирует образование желтого тела. Желтое тело само выполняет функцию гормональной железы и вырабатывает гормон прогестерон, который обеспечивает сохранение беременности. В практике используются гипофизарные препараты производства США (ФСГ-п),

России (ФСГ-Супер) и др. В отличие от ГСЖК, препараты ФСГ вводятся многократно, так как период полураспада ФСГ очень короткий (5-6 ч). Применение ФСГ в сочетании с простагландинами обеспечивает получение 5-6 жизнеспособных эмбрионов и 10-12 овуляций на донора. Оптимальными параметрами использования гипофизарных гонадотропинов являются: доза ФСГ-п – 40-50 мг, ФСГ-Супер – 50 А.Е., фолликотропина – 480 М.Е., фоллитропина - 1200 ЕД. Начало экзогенного их введения – 10-12-ый день полового цикла; инъекция аналога простагландина – Ф2-альфа – на 3-й день от начала обработки в дозе 750 мкг [273].

Совершенствование схем индукции полиовуляции фолликулов в яичниках у коров-доноров все чаще требует изыскания новых подходов к решению данной проблемы, поскольку не исключает образования в яичниках не овулировавших фолликулов, наличие которых приводит к нарушениям гормонального статуса доноров. С целью исключения длительной стимуляции роста фолликулов и наступления одноэтапной овуляции фолликулов рекомендуются синтетические аналоги гонадотропин релизинг-гормона (Гн-РГ). Инъекция донору Гн-РГ в день охоты способствует выделению лютеинизирующего гормона и овуляции в фиксированное время .

Авторы отмечают, что инъекция Гн-РГ (25 мкг сурфагона или 200 мкг диригестрана) в 2-3 раза снижает число не овулировавших фолликулов, повышает на 6-9% количество овуляций и на 11-19% число эмбрионов, пригодных к пересадке в расчете на одного донора.

На современном этапе в республике и странах ближнего зарубежья для вызывания полиовуляции у коров-доноров широко используется гипофизарный гонадотропный препарат высокой степени очистки – ФСГ-супер. По сообщениям ряда авторов, ФСГ-супер обеспечивает получение полиовуляции у 70-75% обработанных коров, однако обладает высокой вариабельностью как по числу вызванных овуляций (9,0-16,0), так и выходу полноценных эмбрионов (4,1-6,8). Существенными недостатками при использовании гонадотропина ФСГ-супер являются: трудоемкость обработки, наличие не овулировавших фолликулов и

стрессовые воздействия на донора в виду многократных (до 8-10) инъекций препарата, что обусловлено коротким периодом инактивации его в организме животного.

Кроме того, установлена высокая эффективность вызывания полиовуляции у коров-доноров путем однократного введения общей дозы ФСГ-супер в комплексе с 4% раствором декстрана. Полученные результаты свидетельствуют о превосходстве опытной группы доноров (на 6,3%) по количеству положительно реагирующих полиовуляцией животных по сравнению с контрольной. Так, из 9 коров, обработанных ФСГ-супер пролонгированного действия, 7 реагировало (77,7%), в то время как из 14 коров после многократного введения стандартного ФСГ-супер реакция на гонадотропин отмечена только у 10 животных (71,4%). По числу овуляций у доноров опытной и контрольной групп получены примерно одинаковые результаты (11,0 против 10,7). Более высокая вариабельность по числу овуляций, вызванных однократной инъекцией (74,2%), по сравнению с многократными инъекциями ФСГ-супер (65,5%), вероятно, объясняется индивидуальной чувствительностью коров-доноров на гонадотропину.

Выявлено, что важным критерием оценки эффективности применения различных схем индуцирования полиовуляции у коров-доноров, помимо качественных и количественных характеристик эмбриопродуктивности, является последующая приживляемость пересаженных реципиентам эмбрионов. Уровень приживляемости зародышей отличного, хорошего и удовлетворительного качества в контрольной группе был 83,3, 58,3 и 25,0%, а в опытной – 62,5, 60,0 и 20,0% соответственно.

С целью получения максимального количества зародышей предложена методика дополнительной обработки коров малыми дозами ФСГ в начале лютеиновой фазы полового цикла, что позволяет стимулировать развитие поверхностных фолликулов. При этом была сделана попытка замены гипофизарного ФСГ гонадотропином СЖК. Выход полноценных эмбрионов составил 4,6 на донора, однако увеличилось количество дегенерированных эмбрионов и яйцеклеток.

Установлена возможность высокой эффективности вызывания полиовуляции путем введения ФСГ-супер как отдельно, так и в комплексе с 4% раствором декстрана, позволяющая вызвать полиовуляцию у 77,7% обработанных коров с получением в среднем на донора 11,0 овуляций, выходом качественных зародышей в расчете на одного положительного донора 5,86 или 70,7% от общего числа извлеченных эмбрионов, состав которых отличается высокими оценочными критериями: 88% зародышей соответствуют категориям отличного и хорошего качества. В целом при сравнительном анализе эффективности использования пролонгированного и стандартного ФСГ-супер для вызывания суперовуляции у коров-доноров не установлено существенных различий по числу вызванных овуляций, ановуляторному состоянию фолликулов, выходу биологически полноценных эмбрионов и их последующей приживляемости.

Оценку биологической полноценности эмбрионов крупного рогатого скота можно проводить несколькими методами: морфологическим, с использованием специальных красителей и культивированием. Наибольшее распространение получил морфологический метод. Установлено, что результаты имплантации зародышей зависят от того, насколько полно оценена их жизнеспособность. Работу с эмбрионами проводят в стерильных условиях в специальном помещении – боксе при температуре воздуха +22 - +25<sup>0</sup>С.

Эмбрионы с асинхронным дроблением, с бластомерами разной величины, с повреждением прозрачной оболочки, с лизисом бластомеров и нарушением связи между ними, а также с множественными включениями в перивителлиновом пространстве не пригодны для трансплантации. Для неоплодотворенной яйцеклетки характерна однородность клеточной массы, округлая форма, отсутствие бластомеров [274].

Не менее важным, а может и определяющим фактором при отборе доноров, является объективная диагностика состояния их репродуктивных органов. Причем, для гормональной обработки следует отбирать животных не ранее, чем через 2,5-3 месяца после отела. При этом уменьшение размеров матки до первона-

чальных (дородовых) размеров не может служить гарантией готовности давать эмбрионы высокого качества. Такой гарантией может быть, например, проведение исследований физико-биологических свойств течковой слизи во время охоты, которое дает возможность своевременно определить готовность половых органов к зачатию.

В результате исследований установлено, что состояние всех участков половых путей и физико-биологические свойства секреции слизистых оболочек у самок закономерно связаны с функцией их яичников. На этом основаны методы, пользуясь которыми можно определить оптимальные для зачатия сроки осеменения коров. Известно много других аналогичных методов: по рефлексу неподвижности у коров, интенсивности покраснения слизистой оболочки влагалища, прозрачности или степени помутнения выделяющегося из половых путей самки секрета, времени, прошедшему после начала охоты. Реже используют для этого ультразвуковой диагностический прибор, коров с кистами яичников (нимфоманок) и специально подготовленных собак, наблюдение за поведением животных с помощью телевидения и др. Однако органы чувств не могут с достаточной точностью определить качественные и количественные изменения, происходящие в половых путях самок. Ограниченность органов чувств компенсируется посредством применения приборов. Приборы – важнейшие средства исследования микропроцессов, которые недоступны непосредственному восприятию человека. Так, более точный результат можно получить по микроскопической картине кристаллизации секрета половых путей самки, взятого у коровы во время течки, а также изменению его степени вязкости и эластичности посредством специальных приборов. Причём, для успешного искусственного осеменения очень важно точное определение половой охоты. Ошибки в наблюдениях и интерпретациях признаков эструса приводят к значительным экономическим потерям, выражающимся, в частности, в увеличении межотёльного периода. Считается, что убытки при пропуске одного полового цикла (21 день) составляют 16 фунтов стерлингов. Низкое содержание прогестерона в молоке

не является положительным индикатором эструса, а высокая концентрация – определённое подтверждение его отсутствия, несмотря на то, что животное может проявлять признаки эструса (ложная охота). Для коров, находящихся вне или близко к эструсу, варьирует от 0 до 60% животных в стаде. Важнейшей проблемой для современных промышленных комплексов является проявление «незаметной» или «тихой» охоты у коров. При наличии у половины из них овуляции признаков течки и охоты не наблюдается. В целом у 80% обследованных животных не менее 1 раза наблюдалась «незаметная» охота.

Считается, что на проявление симптомов в значительной степени влияет обеспечение животных энергией. В течение первых недель после отёла баланс энергии отрицательный, поскольку именно высокопродуктивные коровы на ранней стадии лактации уже не могут получать необходимую энергию с кормом. Чтобы компенсировать дефицит энергии механизм обмена веществ мобилизует собственные запасы энергии в виде жира, а это сказывается на гормональном балансе, поскольку прогестерон в виде жирорастворимого гормона в период образования жёлтого тела в значительном количестве накапливается в жире. Усиленная мобилизация в период течки приводит к заметному повышению минимальной концентрации прогестерона в крови и молоке, которая может быть достаточной для подавления симптомов охоты. В хозяйствах, где ведут трёхкратное наблюдение за охотой, удалось выявить до 90% случаев охоты, но, несмотря на это, искусственное осеменение иногда всё равно проводили не в оптимальные сроки. Слабо выраженные симптомы течки и недостаточное распознавание клинических признаков охоты обуславливают высокий процент ошибочного осеменения. Например, 45,4% всех проведённых осеменений не привели к зачатию. Почти половина этих осеменений была проведена в ошибочные сроки (36,7% – слишком рано, 11,5 – в период образования жёлтого тела). Для устранения потерь, связанных с неправильным определением оптимального времени осеменения, которые только в Германии составляют 0,5 млрд. евро в год, следует проводить контроль с момента проявления течки путём од-

нократного, в течение дня, взятия пробы молока. Минимальные различия в содержании прогестерона в период течки можно определить с помощью чувствительного радиоиммунологического метода (РИА). Этот метод выявления оптимального времени осеменения наиболее точный, эффективный и распространённый в европейских странах.

В ряде других исследований установлено, что наибольшая оплодотворяемость после осеменения была при низких концентрациях прогестерона в молоке, однако 25,6% коров на фермах и 37,7% в приусадебных хозяйствах оплодотворялись при высоком уровне прогестерона (28,8 ммоль/л), предельном для нормальной активности жёлтого тела. Важным этапом в развитии РИА-метода стало появление публикаций, сообщающих, что определение прогестерона в молоке можно использовать для диагностики патологических изменений в яичниках. Проблема в том, что часто трудно дифференцировать овариальные кисты на фолликулярные и лютеиновые посредством пальпации. Однако, если овариальная киста определена пальпацией, дифференцирование можно провести, определяя концентрацию прогестерона в молоке. Коровы, в молоке которых концентрация прогестерона низкая, имеют фолликулярные кисты, высокая – лютеиновые кисты. Наличие фолликулярных кист можно проконтролировать путём двукратного взятия проб с интервалом 7 дней, т. е. в день проведения искусственного осеменения и на 7 день. Отсутствие увеличения показателей свидетельствует о наличии кисты.

Путём определения концентрации прогестерона методом РИА также была установлена связь укороченных половых циклов с сезоном года или молочной продуктивностью. Это дало возможность установить интервал от отёла до начала лютеиновой фазы эстрального цикла. Авторы утверждают, что в настоящее время не существует единого мнения относительно времени суток отбора проб молока или крови для определения в них гормонов. Аналогичная ситуация сложилась и для методов подготовки взятых проб. Такой неупорядоченный подход приводит к тому, что процент правильной диагностики носит весьма переменный характер – на уровне от 70 до 90% .

Более точный результат можно получить путём измерения физико-биологических свойств цервикального точкового секрета коров, которые существенно изменяются при смене физиологического состояния организма и функции матки и яичников. Выяснено, что эти изменения, происходящие в период течки и охоты, наиболее связаны с оплодотворяемостью [275]. Эпителиальные клетки шейки матки и верхней части влагалища постоянно секретируют в период между точками, а также во время беременности слизистый секрет, который отражает физиологическое состояние половых органов животных, указывает на определенные изменения протекающих процессов в матке и яичниках. Основной компонент, который его образует – муцин или гликопротеины – вещества, молекулы которых состоят из углеводной части, т. е. гликозаминогликана и белка, связанных между собой ковалентной связью. Поэтому к отличительным физико-биологическим свойствам муцина относится способность давать метохромазию (свойство клеток и тканей окрашиваться в присутствии хромотропных веществ в тон, отличающегося от цвета красителя). В биологических объектах такими хромотропными веществами чаще являются мукополисахариды или гликозаминогликаны. Это объясняется полисахаридной структурой углеводной части муцина. Эпителиальный муцин играет роль биологических протекторов, защищающих слизистые оболочки от физических воздействий внешней среды, проникновения в половые органы микробов и вирусов.

Установлено, что во время беременности в цилиндрических клетках эпителия шейки матки под влиянием эндогенного прогестерона происходит накопление густой слизи (муцина), которая затем выталкивается в канал шейки матки (цервикальный канал), где образует пробку из густой уплотнённой желтоватой массы. Первая половина течки характеризуется наличием большого количества стекловидно-прозрачного секрета во влагалище. Он в начале загустевает, а затем теряет слизистый характер и образует мазеподобную консистенцию. Секрет имеет способность на начальном этапе проявления течки впитывать в себя большое количество жидкости, выделяемой слизистой оболоч-

кой шейки матки, в связи с чем концентрация гликопротеинов и плотность секрета заметно снижаются. Так продолжается на протяжении всего периода охоты. По её окончании, когда набухание переходит в пептизацию, он теряет эластичность и становится вязковатой жидкостью, слабопроницаемой для сперматозоидов. Установлено, что основной компонент слизистых секретов животного происхождения – муцин, который содержится в слюне, секретах слизистой оболочки желудка. Из цервикальной слизи выделен муцин, который сходен со специфическими мукопротеидами, но имеются указания на незначительные отличия в составе углеводного компонента цервикального мукопротеида, выделяемого при беременности.

Наиболее тесно коррелировала с оплодотворяемостью эластичность точечной слизи, измеряемая специальным прибором “эластомером”. При наивысшей эластичности оплодотворяемость достигала 90%. По мнению авторов, она наиболее отчетливо связана с результатами осеменения и по этому показателю можно с высокой степенью точности судить о готовности самки к зачатию. Получают максимальную оплодотворяемость (88%) при показателе эластичности слизи от 21 до 30 см. Такой показатель достигается в момент установления охоты быком-пробником, т.е. в первой её половине. Если до 2 часов от её начала эластичность слизи составляла 16,7 см, то через 6 часов она становится самой эластичной – 24,7 см. Повышение было статистически достоверным. Изменение эластичности в период охоты авторы объясняют тем, что в полимерных макромолекулах муцина (гликопротеинов) при набухании разрываются некоторые молекулярные связи и в структурной решётке слизи эти связи между полипептидными цепями становятся более разряженными, пружинящими. При дальнейшем оводнении студня эти пружинящие связи разрушаются и набухание его переходит в пептизацию. При изучении микроскопической картины сухих неокрашенных мазков цервикального секрета было установлено, что образующиеся при его высыхании формы кристаллизации отражают физиологическое состояние животного. Способность слизи, взятой

из канала шейки матки, образовывать кристаллы на предметном стекле была названа феноменом «листа папоротника» [276].

Известно, что созревание фолликула во время охоты сопровождается нарастанием эстрогенов в организме, которые стимулируют секрецию шейчных и вестибулярных желез. Такая же картина наблюдается и в случае повышения тонуса парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. Во время наибольшей готовности организма коровы к зачатию, степень ослизнения достигает своего максимума, что создаёт благоприятные условия для осеменения. Установлено, что при плотном фолликуле первой степени зрелости, а также при незначительном его увеличении до 10-12 мм в диаметре и при одновременно тугой флюктуации фолликулов (вторая степень) у животных отмечен самый низкий процент зачатий (от 0 до 50%). По мере дальнейшего его созревания оплодотворяемость заметно увеличивалась и при третьей степени зрелости была уже в пределах от 69 до 76%. Четвёртая степень (стадия размягчения) отличалась максимальным числом стельных животных и составляла от 71 до 87%. При определении времени осеменения по признакам течки и степени раскрытия шейки матки оптимальным сроком осеменения считается период, когда наступает помутнение цервикально-влагалищного секрета, отмечается минимальная вязкость и наибольшая растяжимость (эластичность) секрета, что, как правило, указывает на достаточное раскрытие канала шейки матки. С другой стороны, его закрытие, а также выделение из влагалища слабо эластичного, липкого (с белым оттенком) секрета свидетельствует об уже завершившейся овуляции. В специально проведённых автором исследованиях установлено, что в случае отсутствия клинических признаков течки в период охоты и при осеменении коров и тёлочек оплодотворяемость их снижается на 30-47%. При введении спермы в хорошо раскрытый канал шейки матки (за 3-ю складку) количество зачатий от первого осеменения составляет от 58 до 77%, а в случае введения её в начальную часть шейки т.е. за первую складку (при закрытом канале) – от 9 до 23%.

Следовательно, в настоящее время не проводились исследования по применению точных и простых методов объективной оценки готовности половых органов доноров к зачатию при проведении работы по трансплантации эмбрионов.

Из других важных и требующих незамедлительного решения проблем, касающихся вопросов трансплантации эмбрионов в условиях МТК, называется необходимость разработок:

- Средства, способствующего приживляемости эмбрионов;
- Способа профилактики и лечения эндометритов у коров-доноров;
- Усовершенствованного элемента трансплантации эмбрионов коров-доноров.

При этом исходили из того, что эффективность селекционно-племенной работы с коровами-донорами в племенных хозяйствах республики определяется средней продолжительностью продуктивного периода коров-доноров на уровне 2-х лактаций (удой от 10 и более тыс. кг молока за лактацию). Поэтому самым эффективным, перспективным и удобным методом получения потомства от этих животных является время после завершения максимально продуктивного периода. Имеется возможность минуя длительный период селекционного отбора получать ежегодно не одного а сразу нескольких потомков: бычков – для оказания селекционного давления на стадо через спермопродукцию. Телочек – использовать для ремонта основного стада. Внедрение технологии трансплантации эмбрионов значительно расширит возможности работы зооветспециалистов в условиях молочно-товарных комплексов, где имеется хорошая возможность отбора необходимого количества телок-реципиентов для пересадки им эмбрионов. Также важно, что при использовании метода криоконсервации появляется возможность их пересадки реципиентам в любое удобное время. Технология ускоренного размножения ценных генотипов, с применением заморожено-оттаянных эмбрионов, существенно повышает рентабельность метода трансплантации. При этом учитывается: продуктивный период, сохранность приплода, удой матерей, течение родов, невосприим-

чивость к ряду заболеваний, получение животных с заданными хозяйственно полезными признаками.

Поскольку в условиях работы МТК Беларуси подобные исследования не проводились, гипотеза состояла в том, чтобы повысить продолжительность использования коров-доноров и устранить предпосылки преждевременной непроизводительной их потери, снизить затраты валютных средств на закупку ветпрепаратов за рубежом. Разработанные элементы метода трансплантации могут явиться важным подспорьем в ускоренном воспроизводстве высокопродуктивных коров и, в целом, популяции черно-пестрого скота Беларуси.

Анализ достижений науки в области практического применения метода трансплантации эмбрионов коров позволяет сделать вывод, что растущий интерес научных кругов к его применению вскоре позволит применять его как общедоступный и относительно дешевый. Одновременно отмечается необходимость дальнейшей разработки и совершенствования в направлении его надёжности, упрощения, а также использования наиболее эффективных способов и приемов для его осуществления. При этом особый интерес вызывает применение биологически активных веществ, которые позволяют значительно повысить их качество у доноров и приживляемость у реципиентов.

Следует отметить, что грамотная селекционная работа, проводимая зоотехнической службой в РУСП «Племзавод Россь» Волковысского, ОАО «Василишки» Щучинского и СПК им. Воронежского Берестовицкого районов, позволила достичь надоев от 19-37% коров – потенциальных доноров эмбрионов в пределах от 10,1 до 13,6 кг молока за лактацию.

Экономическую эффективность полученных данных рассчитывали согласно «Методических указаний по внедрению достижений науки, техники и передового опыта в сельскохозяйственное производство», утвержденных Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь в 2010 г.

При этом учитывали, что хотя метод трансплантации эмбрионов и был создан как средство реализации генотипической селекции, однако большой их потенциал остается не реализо-

ванным в направлении увеличения выхода и приживляемости эмбрионов. Также больших перспектив можно ожидать от применения современных биологически активных веществ, что позволит целенаправленно совершенствовать традиционные механизмы оценки жизнеспособности и сохранности биологического объекта, подготовки эндометрия и яичников к nidации зародыша в сторону интенсификации, ресурсосбережения и производительности труда зооветеринарных специалистов.

## **2. Цель, задачи и методика исследований**

Научно-производственные опыты проведены на базе научно-исследовательской лаборатории УО «ГГАУ», на производственных базах: РУСП «Племзавод «Россь» Волковысского района, ОАО «Василишки» Щучинского, СПК им. Воронежского Берестовицкого, СПК «Октябрь-Гродно», Щучинском филиале РУСП «Гродненское племпредприятие» Гродненской области, ОАО «Александрийское» Шкловского района Могилевской области, на поголовье коров и телок черно-пестрой породы отечественной и зарубежной селекции, сперме быков отечественной и зарубежной селекции, а также свежеполученных и замороженно-оттаянных эмбрионах.

Содержание и кормление коров-доноров и телок-реципиентов опытных и контрольных групп было одинаковым и организовано в соответствии с требующимися нормами.

В качестве доноров-эмбрионов использовали коров черно-пестрой породы живой массой 550...650 кг с удоем от 10,0 до 11,5 тыс. кг молока за лактацию, жирностью 3,2...3,6%. Возраст коров находился в пределах от 2 до 5 лактаций. В качестве реципиентов использовали телок в возрасте-16...18 месяцев с живой массой 380...410 кг.

Согласно схеме исследований (рис.1), работу выполняли в два этапа.

На первом – изучали факторы, влияющие на уровень полиовуляции и выход полноценных эмбрионов у коров-доноров. Изучали влияние возраста, физиологического состояния орга-

низма коров, а также молочной продуктивности на реакцию полиовуляции фолликулов и выход полноценных эмбрионов, а также влияния качества замороженно-оттаянной спермы на уровень полиовуляции и выход полноценных эмбрионов.

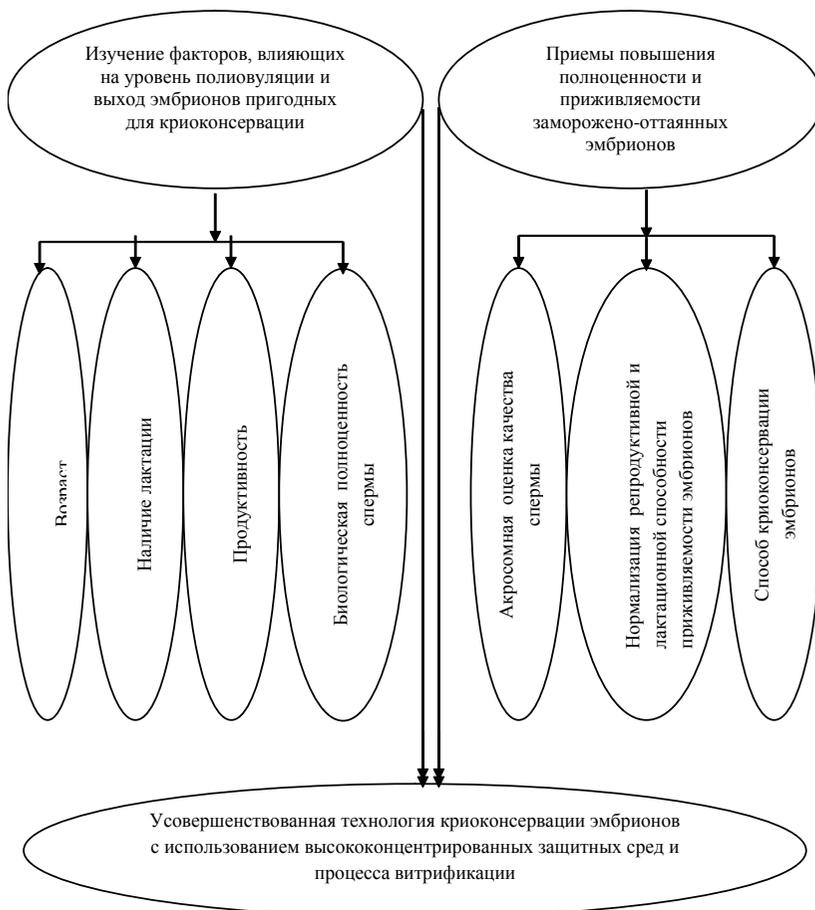


Рисунок 1 – Схема проведения 1-го этапа исследований

Использовали комплексную оценку качества спермы полученной от быков-производителей различного происхождения для получения эмбрионов.

Впоследствии были изучены результаты их пересадки телкам-реципиентам. В опытных группах быков определяли показатели качества спермы по подвижности, выживаемости сперматозоидов, а также по целостности акросом. Для определения биологической полноценности замороженно-оттаянной спермы, полученной от быков-производителей различного происхождения было проведено 324 анализа спермодоз 36 быков по трем показателям (выживаемость, сохранность акросом спермиев, активность спермиев) согласно «Инструкции по взятию, оценке и замораживанию спермы быков-производителей на племпредприятиях» [253], по состоянию акросом спермиев [277].

Разрабатывали приемы: 1. Повышения полноценности и приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов.

Для этого проведены исследования в направлении изучения:

- биологических свойств спермы быков-производителей (n=11) по результатам: оценки целостности акросом, выхода эмбрионов у доноров (n=45), а также из приживляемости после пересадки телкам реципиентам (n=66);

- результатов применения способов нормализации репродуктивной и лактационной способности у доноров (n=91);

- степени биологической полноценности эмбрионов после криоконсервации эмбрионов (n=116).

На втором (рис.2) – дать научное обоснование и разработать:

- оптимальный *режим моциона* коров-доноров в сухосойный период;

- способ повышения качества эмбрионов (активное вещество – *аминазин*: получен патент на изобретение);

- способ повышения приживляемости эмбрионов (активное вещество – *капронат оксипрогестерона*: получен патент на изобретение);

– способ нормализации репродуктивной функции у доноров (активное вещество - *ихтиоглюкобикарбонат*: получен патент на изобретение);

– способ нормализации лактационной функции у доноров (лазеропунктурное рефлексотерапевтическое *воздействие на БАТ*: получен патент на изобретение).



Рисунок 2 – Схема проведения 2-го этапа исследований

Для определения пригодности к криоконсервации эмбрионов полученных с использованием спермы, взятой от быков-производителей различного происхождения, было сформировано две группы коров-доноров; 1-я контрольная: с использованием спермы отечественных быков –  $n=17$  и 2-я опытная – спермы быков зарубежного происхождения –  $n=28$ . Впоследствии эмбрионы, полученные с использованием замороженно-оттаянной спермы этих быков, были также заморожены, а затем пересажены 2 группам телок-реципиентов ( $n=66$ ), аналогов по возрасту, живой массе и физиологическому состоянию половых органов.

При совершенствовании приемов нормализации репродуктивной и лактационной функции у доноров использовали препарат ихтиоглюкобикарбонат (ИХБ), а также в его сочетании с метрикуром и тилозинокаром согласно методики Горбунова Ю.А. и др. [182], а также лазеропунктурную рефлексотерапию маститов – магнито-инфракрасно-лазерным излучением [278].

Для отработки приема повышения приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов с использованием гормональных средств, были сформированы 2 группы телок-аналогов по возрасту (18-19 месяцев), живой массе (380-410 кг), по 18 голов в каждой. Капронат оксипрогестерона-17 $\alpha$  инъецировали согласно наставлений Главного ветеринарного управления Госагропрома РФ [90] внутримышечно, в дозе 12 мл., в модификации Горбунова Ю.А. и др. [202].

При проведении научных исследований извлечение, оценку, замораживание и оттаивание, а также пересадку эмбрионов полученных от коров контрольной группы ( $n=38$ ), осуществляли согласно «Рекомендаций по трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве» [120], с использованием замораживателя английского производства марки «DB 1». Для опытной группы ( $n=34$ ) разработан и использован состав высококонцентрированной защитной среды, что обеспечивало проведение заморозки эмбрионов в ускоренном режиме, без применения программного замораживателя по запатентованной нами методике [279, 280, 281].

Экономическую эффективность разработок учитывали по фактическим затратам на производство и стоимости полученной дополнительной продукции с использованием «Методики расчета экономической эффективности ветеринарных мероприятий», разработанной Главным управлением ветеринарии МСХП [282].

Биометрическую обработку материала производили по Рокитскому П.Ф. [283] на персональном компьютере с использованием стандартных программ «Статистика», «Корреляционный анализ», «Пошаговая множественная регрессия». Достоверность связи между признаками определяли по таблице необходимых значений коэффициента корреляции. В работе приняты следующие коэффициенты уровня значимости \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .

Более подробное изложение конкретных методик исследований дано при описании соответствующих разделов монографии.

### **3. Способы повышения эффективности трансплантации эмбрионов**

#### **3.1. Требования по организации моциона сухостойных коров-доноров в переходный период**

В Беларуси пастбищный сезон продолжается около 155 дней. За это время необходимо произвести не менее 50-55% валового надоя молока и более 40% годового производства говядины. Всё, что упущено животноводами по вопросам воспроизводства в стойловый период, можно с успехом компенсировать летом.

Сохранение здоровья сухостойных коров является одной из самых важных проблем молочного скотоводства. При этом требуется соблюдать оптимальные условия содержания коров при переходе от зимнего кормления к летнему. Переходное кормление сухостойных коров в условиях МТК должно продолжаться не менее одной недели, в течение которой зимний рацион

уменьшается, а летний увеличивается. Приспособляемость микрофлоры к сильно изменённым условиям из-за появления в рубце жвачных молодой травы продолжается минимум неделю. Однако переходного кормления недостаточно, необходимо продолжать давать богатые сырой клетчаткой корма (сено, солому). Это связано с тем, что суточный рацион, состоящий в основном из молодой зелёной травы, содержит, в противоположность зимнего рациона, слишком много воды и мало клетчатки, имеет плохо усвояемую животным структуру.

Для осуществления ежедневного активного принудительного моциона сухостойных коров лучше использовать прямой скотопрогон (рис. 3), который заканчивается загонами: для содержания скота в зимний период (рис.4, 5) или для пастьбы – в летний (электропастух; рис.6).

Выгул коров второй половины сухостоя организуют недалеко от молочно – трварного комплекса (рис.7).

По мере созревания растений содержание воды снижается и по энергетической питательности сухое вещество зелёных кормов в ранние фазы вегетации приближается к зерновым кормам (0,7- 0,8 к.е. в 1 кг сухого вещества), но превосходит их по биологической ценности протеина и содержанию витаминов.

Содержание протеина в зелёных кормах очень высокое и зависит от вида растений, фазы вегетации и может достигать 25%.

По мере старения трав количество протеина в них уменьшается, однако соотношение аминокислот практически не изменяется. Но следует иметь в виду, что в состав небелковой части протеина зелёных растений входят кроме аминокислот амиды, нитраты и нитриты. В отдельных случаях количество нитратов может резко возрасти, например, при недостатке влаги и пониженной температуре. Нитраты образуются и в скошенных растениях, если они находятся в больших валках или сложены в кучу и начинают разогреваться. При недостатке в рационе углеводов (сахара, крахмала) эти соединения оказывают отрицательное действие на усвоение каротина и обмена веществ между матерью и плодом, а иногда приводят к его гибели.



Рисунок 3 – Прямой скотопрогон для сухостойных коров



Рисунок 4 – Загон в конце скотопрогона для сухостойных коров



Рисунок 5 – Содержание сухостойных коров-доноров в загоне



Рисунок 6 – Загонная пастьба сухостойных коров-доноров в летний период

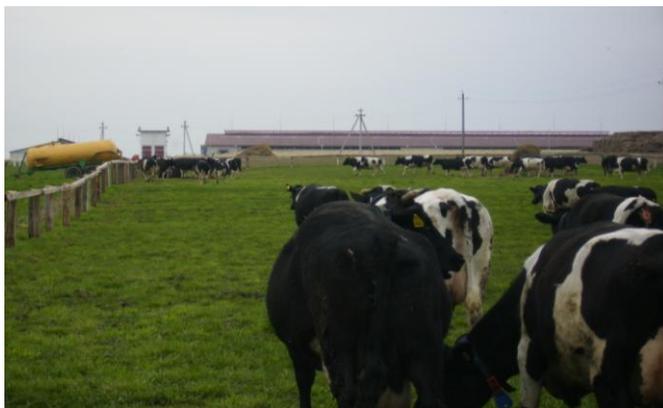


Рисунок 7 – Выгульная площадка для коров-доноров второй половины сухостоя

*Минеральное питание.* Пастбищная трава дефицитна по содержанию фосфора, магния и натрия.

На зелёные корма стельных сухостойных коров переводят постепенно. В первый день их дают не более 15 кг и до полного объёма доводят на 7-10-й день.

В летних рационах сухостойных коров больше всего недостаёт фосфора, что приводит к снижению содержания каротина и витамина А в крови и длительному нарушению воспроизводи-

тельной функции в послеродовой период. Лучшими фосфорными подкормками являются монокальцийфосфат, мононатрийфосфат, кормовой преципитат.

В летний период значительно повышается потребность стельных сухостойных коров в натрии, поскольку содержание этого элемента в пастбищной траве обеспечивает их потребность лишь на 45-60%. Недостаток натрия можно определить по поведению животных: они становятся беспокойными, грызут крупностебельную древесную растительность, минеральные удобрения, неохотно поедают сочную траву. Основным источником натрия является поваренная соль или галитовые отходы.

Острый недостаток магния может привести к пастбищной тетании. Проявлению этого заболевания способствует высокое содержание азота и калия в траве, при котором заметно снижается усвоение магния, что приводит к нарушению мобилизации кальция из костей в кровь и этим способствует возникновению родильного пареза. Содержание магния в пастбищной траве зависит от почвы и удобрения. Калийные удобрения, внесённые в больших дозах, снижают количество магния в растениях, а азотные удобрения повышают. Одним из местных источников магния является доломитовая мука, содержащая в своём составе до 10-11% этого элемента. Наиболее распространённым способом балансирования летних рационов скота по макро- и микроэлементам является приготовление специальных минеральных смесей, которые скармливают путём обогащения концентратов, или же из специальных кормушек в составе полисолей.

*Правильное использование травостоя* в первом цикле стравливания во многом определяет дальнейшую продуктивность пастбищ, предназначенных для использования стельными сухостойными коровами. За первые полтора месяца, с 15 мая по 30 июня, с пастбищ обычно получают 40-50% урожая, а на остальные 3 месяца пастбищного сезона (июль-сентябрь) приходится только 50-60% зелёного корма от общего урожая. Поэтому при первом цикле стравливания всегда бывает избыток зелёного корма, так как почти половина площади выпасов остаётся не стравленной.

Для того, чтобы избежать возможного критического периода, когда в погоне за более высоким сбором корма скашивают оставшийся травостой на сено в фазу колошения злаков, а скорость отрастания трав, убранных в более поздние фазы, резко снижается и скошенную на сено половину пастбища можно использовать на выпас скоту только через 35-50 дней, оставшаяся же часть не обеспечивает животных кормом в течение этого периода. При этом следует не допустить ещё одну ошибку, усугубляющую вышеуказанную – повторно стравливать не отросший травостой на всей площади.

Опыт показывает, что в засушливое время не следует стравливать загоны с урожаем зелёной массы менее 20 ц/га. В этом случае основная часть корневой системы остаётся жизнедеятельной и травы быстро отрастают после выпадения осадков. Если выпасать скот до начала колошения злаков (поскольку позже пасти нельзя из-за низкого уровня потребления травостоя) то весенний избыток травы примерно на 30-35% площади неорошаемого пастбища, а если орошаемого, то на 20-30%, скашивают в фазу трубкования злаков на сенаж, силос, витаминную муку, зелёную подкормку. Подкашивание осуществляют параллельно с выпасом животных на оставшейся части с таким расчётом, чтобы к концу стравливания трава успела отрасти.

На неорошаемом участке дополнительно 10-15% площади скашивают на сено в фазу колошения злаков. В этом случае вследствие более медленного темпа отрастания трав на площади сенокосного использования травостоя избытка травы во втором цикле не бывает. В то же время достигается разновременное отрастание трав до пастбищной спелости и скот получает без перерыва сочный не огрубевший зелёный корм.

Выпас на отаве начинают при достижении ею высоты 15-20 см. Период отрастания трав до пастбищной спелости составляет 34-51 дней.

Заканчивать пастьбу сухостойных коров осенью следует не позднее третьей декады сентября. Более позднее стравливание ослабляет растения, поскольку они не успевают накопить достаточный запас пластических веществ, обеспечивающих благо-

приятную перезимовку. Поэтому загоны, стравленные последними, на следующий год используют для более позднего выпаса или оставляют для сенокосения.

В увеличении продуктивного долголетия травостоя важное место принадлежит пастбищному обороту, основой которого является периодическое чередование пастьбы со скашиванием. Он включает: отвод раз в 3-4 года каждого загона под сенокосение; ежегодную смену очерёдности скашивания на подкормку и сенаж загонов, оставшихся неиспользованными после первого цикла стравливания.

Исходя из того, что бобовые травы менее пастбищеустойчивы, чем злаковые, их следует чаще в системе пастбищеоборота чередовать со скашиванием.

Здоровье коровы и новорожденного молодняка находится в прямой зависимости от условий содержания сухостойных коров в летний период. При этом, чем моложе трава, тем она лучше поедается животными и полнее усваивается организмом. Поэтому эффективнее для пастьбы использовать травы высотой 10-15 см. Если травостой выше, то в нём грубеет клетчатка и питательных веществ – белка, сахара и витаминов в таком корме становится меньше. Кроме того, при высоте травостоя 10-15 см корова в сутки съедает 70-80 кг корма, в то время как при высоте 20-25 см – только 30-35 кг. Это связано с тем, что при длине травяной массы более 10 см корова перед заглатыванием вынуждена её пережевать, а при длине до 10 см – заглатывает без пережёвывания. Во втором случае на поедание 1 кг корма затрачивается в 2-3 раза меньше времени.

Нормально организованное пополнение кормушек минеральной подкормкой, а также бесперебойный водопой – важный фактор в обеспечении нормального обмена веществ между матерью и плодом. Следует исходить из расчёта, что каждой корове требуется не менее 60 литров воды в сутки. При этом необходимо следить за тем, чтобы воды было достаточно и она была постоянно свежая, а корыта для неё чистыми.

Необходимо строго соблюдать схему пастбищного оборота, то есть так рассчитывать перевод скота с одного загона на дру-

гой, чтобы высота травостоя на свежем загоне не превышала 15 см. Чтобы рационально использовать пастбище, с утра следует пасти коров до 1 часа по вчерашней делянке, но при этом необходимо отмерить и подготовить с вечера следующий участок. При этом если в загонах, где предстоит пасти скот, трава уже перерастает, её немедленно следует подкосить и использовать скоту на подкормку.

На пастбищах, где в травостое преобладает клевер, пастьбу скота надо начинать только после того, как спадёт роса. В противном случае у сухостойных коров возможно проявление признаков тимпаниии (вздутие рубца).

Следует строго соблюдать загонную систему пастьбы, так как при свободно выгульной пастьбе скот так вытаптывает молодую траву, что она потом медленно отрастает. Кроме того, при бессистемной пастьбе животные поедают, как правило, наиболее съедобные травы, а сорняки остаются и потом обсеменяют пастбища, что снижает выход культурного травостоя.

Необходимо помнить, что загонная система пастьбы позволяет увеличить выход зелёной массы на 20-25%, сохранить качество зелёного корма, повысить усвояемость пастбищного корма на 10-15%.

*При организации пастбищной территории* большое значение имеет правильный выбор площадей для их закладки, величина массива, его удалённость от МТК, почвенные особенности участка. Для закладки культурных пастбищ не годятся песчаные почвы, верховые и переходные торфяники.

Целесообразно отводить прилегающие к МТК территории. Отводимые земельные массивы должны быть компактными. Удалённость самого дальнего загона от комплекса не должна превышать 1 км. Чем компактнее будет массив, тем легче его эксплуатировать и тем ниже затраты на его использование.

Пастбищное содержание сухостойных коров требует соответствующего оборудования массива: разбивка его на загоны, устройство скотопрогонов, организация водопоя, минеральной подкормки и потребления сена, а также площадки для отдыха скота. Скотопрогон должен идти по наиболее короткому пути к

МТК. Для его ограждения используются деревянные столбики и прикреплённые к ним 2 ряда гладкой проволоки или капронового шпагата для обматывания тюков. При наилучшем варианте скотопрогоны должны иметь гравийное покрытие, а поверх его слой песка, что оказывает благоприятное массирующее и очищающее от навоза воздействие на всю поверхность копыт. Столбики, изготовленные из ели, осины или берёзы, для продления срока службы очищают от коры, просушивают и пропитывают специальным раствором, а заделываемые в землю концы можно обрабатывать смолами, картерным маслом или покрыть нефтебитумом. Столбики из лесоматериала заготавливают диаметром 12-16 см, длиной 1,8-2,0 м. Толщина готовых столбиков внизу 12-14 см, а сверху – 8-10.

В Республике Беларусь в соответствии с типовыми проектами организации пастбищной территории, стационарными изгородами, кроме скотопрогонов огораживают территорию каждого пастбища по наружному контуру и вдоль открытых каналов, а загоны в процессе использования массива выделяют с помощью переносных электроизгородей.

Количество загонов рассчитывается с учётом периода времени между стравливаниями, необходимого для получения урожая, запланированного на выпас в каждом цикле (80 ц/га) и принимаемой продолжительности пастьбы сухостойных коров в загоне (3 дня). Расчёт производится следующим образом: среднюю продолжительность интервала отрастания трав между стравливаниями (30 дней) разделить на количество дней пастьбы в загоне (3дня), получится количество отдыхающих загонов и плюс один загон с выпасом скота. Таким образом, требуется 11 загонов для стада сухостойных коров 200 голов, площадью загона 5,4 га.

*Уход за пастбищем* предусматривает подкашивание не съеденных остатков травы после стравливания. Животные обычно плохо поедают культурные травы, разрастающиеся в местах отложения экскрементов, а также грубые растения плохого кормового достоинства и пересохшие травы. На не подкашиваемых пастбищах их количество нередко составляет 30% и более.

Остатки травы надо подкашивать на высоте 5-6 см. Если их мало, то убирать скошенную траву с пастбища экономически не выгодно. Быстро увядая, она не оказывает вредного влияния на травостой. Подкашивание не съеденных остатков производится два-три раза за сезон, не позднее 3-5 дней после стравливания. Увядшую траву полезнее стравить утром следующего дня. Если не съеденных остатков много, то из них заготавливают сенаж, силос или сено.

При пастьбе животные оставляют на пастбище значительное количество твёрдых и жидких экскрементов. Так, например, в загоне площадью 2,4 га после каждого стравливания травостоя сухостойными коровами (45-50 голов) и нетелями (86-90) количество оставляемых экскрементов и площадь вокруг них в 6,3 раза больше, чем занимали сами каловые массы. Если не проводить разравнивание экскрементов при средней нагрузке на пастбище, осталось бы не использованными до 7% площадей, а потери корма составили бы в среднем 296 к.ед. с 1 га.

### **3.2. Результаты трансплантации эмбрионов в связи с использованием активного моциона коров-доноров**

На первом этапе изучали степень влияния пассивного (1 контрольная группа) и активного (2 опытная группа) моциона коров-доноров, организованных в течение сухостойного периода, на выход и качество эмбрионов в условиях КСУП «Племзавод «Россь» (всего по 15 голов в каждой группе). Животные 1 группы содержались в помещении МТК с возможностью свободного выхода на выгульную площадку. Для коров 2-й группы был организован активный моцион в режиме: 2 км по скотопроектной дорожке до пастбища и обратно + загонная пастьба в течение дня (табл. 1).

Установлено, что из имеющихся 15 коров-доноров в каждой из групп реакцию яичников проявили соответственно 13 голов в опытной и 12 в контрольной. Это оказало влияние и на общее количество извлечённых и пригодных для замораживания эмбрионов. Всего было заморожено 72 эмбриона в опытной

группе (5,54 в расчёте на 1 голову) или на 25% больше, чем в контрольной (54 или 4,50 – на голову).

Таблица 1 – Результаты трансплантации эмбрионов, в связи с условиями содержания доноров, n = 30

Показатели	Группы (n=15/15), из них проявили реакцию полиовуляции – голов									
	1 контрольная, n = 12					2 опытная, n = 13				
	количество	качество и число эмбрионов, n-%				количество	качество и число эмбрионов, n-%			
		до замораживания		после оттаивания			до замораживания		после оттаивания	
отличное		хорошее	пригодные	непригодные	отличное		хорошее	пригодные	непригодные	
Всего, n – %	54-100	31-57,4	23-42,6	47-87,0	7-13,0	72-100	40-55,5	32-44,4	65-90,3	7-9,7
в т. ч. на 1 гол.	4,50±0,31	2,58±0,20	1,92±0,16	3,92±0,32	0,58±0,05	5,54±0,42*	3,08±0,28	2,46±0,21*	5,0±0,35*	0,54±0,05

Уровень сохранности их в обеих группах существенно не различался и составил – в опытной группе 90,3% (65 из 72) и контрольной 87,0% (47 из 54). Однако за счёт того, что в опытной группе отреагировало полиовуляцией на одно животное больше, общий уровень выхода пригодных для пересадки эмбрионов после оттаивания составил 65 (в том числе 5,0 – на одну голову), что оказалось на 27,7% больше, чем в 1-ой контрольной – (65 против 47) или на 1,08 эмбриона в расчете на одну голову (5,0 против 3,92; P<0,05).

Из приведённых данных видно, что в опытной группе установлен более высокий процент эмбрионов, пригодных к пересадке после оттаивания, по сравнению с аналогичными стадиями развития в контрольной группе.

Результаты выхода телят-трансплантантов, в зависимости от условий содержания доноров, представлены в табл. 2.

Применение условий содержания в режиме – активный рацион + загонная пастьба коров-доноров в сухостойный период способствовали повышению приживляемости эмбрионов по сравнению с контрольной: на 2,1% – по поздним морулам; 4,6% – по ранним бластоцистам.

Таблица 2 – Выход телят в зависимости от условий содержания доноров

Показатели	1 контрольная, n= 54			2 опытная, n= 72		
	стадии развития					
	поздние морулы	бластоцисты		поздние морулы	бластоцисты	
ран-ние		позд-ние	ран-ние		позд-ние	
Заморожено эмбрионов, п	18	24	12	26	27	19
Из них пригодных к пересадке после оттаивания, п	16	19	12	24	25	16
% от числа замороженных	89,0	79,0	100	92,3	92,6	84,2
Кол.-во реципиентов, гол.	16	19	12	24	25	16
% стельности	43,7	47,4	58,3	45,8	52,0	50,0
Получено телят, гол.	7	9	7	11	13	8
Всего телят, гол.	23			32		

Это выразилось в получении дополнительного количества телят-трансплантантов: после пересадки поздних морул – на 36,4% (соответственно 11 против 7 гол.); ранних бластоцист – на 30,8 (13 против 9 гол.), поздних бластоцист – на 12,5% (8 против 7 гол.). Всего дополнительно получено 9 телят-трансплантантов (39%) на сумму 13594,5 тыс. руб.

На втором этапе изучали степень влияния пассивного (1 контрольная группа; 600 гол.) и активного + загонная пастьба (2 опытная группа; 600 гол.) моционов на проявление воспроизводительной функции и выход телят от коров дойного стада, организованных в течение сухостойного периода в условиях ОАО «Василишки». При этом было установлено, что использование активного моциона обеспечивает повышение эффективности работы МТК за счет дополнительно полученных 78 телят при искусственном осеменении, на сумму 117819 тыс. руб. (табл. 3).

Таким образом, применение активного моциона обеспечивает повышение эффективности работы МТК за счет дополнительно полученного молодняка: 78 телят после искусственного осеменения, на сумму 117819 тыс. руб.; а также 9 телят стоимостью 13594,5 тыс. руб., после трансплантации эмбрионов.

Таблица 3 – Результаты применения разных видов моциона сухостойных коров

Группы, п	Изучаемые варианты содержания	Получено телят, гол / %	Стоимость 1 гол. приплода тыс. руб.	Стоимость полученных телят, тыс. руб.	Экономический эффект, тыс. руб.
1. Контрольная, 600	выгульные площадки	480 (-78) /80	1510,5	725040	-117819
2.Опытная, 600	активный моцион	558(+78) /93	1510,5	842859	+117819

Всего общий экономический эффект составил 131413,5 тыс. руб. (табл. 4).

Таблица 4 – Экономическая эффективность применения активного моциона

Экономический эффект за счет дополнительного получения:	Экономический эффект, тыс. руб.	Акт внедрения
Телят от искусственного осеменения (+ 72 гол.)	117819	ОАО «Василишки» от 10.11.2011 г
Телят после пересадки эмбрионов (+ 9 гол.)	13594,5	КСУП «Плезавод Россь» от 1.11.2011 г
Общий экономический эффект	131413,5	

### 3.3. Компьютеризированный прием определения состояния репродуктивных органов у коров-доноров

Сразу после перевода коровы из секции сухостоя в секцию производства молока организуют работу по наблюдению за проявлением у нее охоты. Для этого на ошейнике устанавливается датчик активности (рис.8 и 9).

Его основная функция заключается в том, что информация о движении каждого отдельного животного считывается процессором (рис.10) с датчиков и накапливается за весь период её продуктивного использования в стаде. При этом изначально определяют прибором средний режим активности движения в течение 5 дней. Это позволяет получить объективные данные, характеризующие особенности проявления клинических признаков охоты каждого из животных. В дальнейшем, после проведения указанных расчетов, данные сохраняются в компьютере.



Рисунок 8 – Датчик активности



Рисунок 9 – Корова с датчиком на шее



Рисунок 10 – Процессор, анализирующий активность передвижения коровы

Проявления клинических признаков полового возбуждения, охоты и овуляции отличаются для каждого отдельного животного. Они зависят от возраста, темперамента, состояния обмена веществ в послеродовой период и др. В результате применения датчика активности удастся получить объективную и высоко достоверную информацию, как в виде сводного цифрового анализа, так и в форме диаграммы – графического анализа изображения по сумме движений каждой коровы данной секции.

Процессор, таким образом, не только считывает информацию и хранит записи данных за весь период хозяйственного использования животного, но и формирует закономерную модель поведения, которая складывается, в основном, из периодов движения и отдыха коровы в течение дня. Эта модель поведения постоянно обновляется, поскольку каждый час новые данные включаются в расчет. Для своевременного установления у животного периода возбуждения полового цикла и охоты, специалист должен принимать во внимание последние данные. Одновременно вся более ранняя информация будет постепенно терять свою значимость. Таким образом, модель цифрового и графического изображения поведения коровы будет соответствовать любому изменению в её поведении.

Следовательно, работа датчика активности заключается в том, что данные по каждому движению коровы в течение суток размещаются рядом друг с другом на прогнозной модели поведения. Она представляет собой постоянную оценку, суммированную через каждый час, а также за период в 6 часов. Любая тенденция на увеличение активности животного моментально регистрируется и отображается графиком. Изменение активности может быть либо быстрым и очевидным у молодых коров, когда процессор сообщает о высокой половой активности. С возрастом период наступления пика половой активности постепенно увеличивается – в среднем на 6 часов, пока процессор полностью не определит, что это увеличение статистически значимо.

Процессор точно рассчитывает наступление охоты для каждой коровы, а также имеет индивидуальную базу данных, где

хранится информация о ее почасовой активности. Хранящиеся данные активности в период охоты можно сравнить с предыдущими значениями. Почти всегда значение активности коровы в предыдущую охоту равно ныне полученному. Эта тенденция позволяет разработать модель активности для каждой полновозрастной коровы.

Вероятность стабильности, в проявлении животными в последствии аналогичного уровня активности, позволяет получить объективную оценку того, насколько с возрастом значение относительной активности будет характерно для коровы. Эта вероятность рассчитывается по отклонению от стандартно нормальной активности коровы. Уменьшение показателя высокой активности с большой вероятностью указывает, что корова действительно будет постепенно снижать половую активность и выражается коротком периоде проявления рефлекса неподвижности. Это больше характерно для высокопродуктивных коров, поэтому за животными устанавливается контроль через каждые 4 часа.

### **Правила работы датчика активности:**

1. В течение первых 5 дней процессор устанавливает и анализирует индивидуальные особенности активного движения каждой отдельной коровы.
2. С 6 дня, и далее, расчетные данные преобразуются в графическое и процентное изображение уровня двигательной активности, индивидуальное для каждого отдельного животного.
3. Процессор рассчитывает и своевременно указывает, через компьютерную базу данных, на степень выраженности охоты и на основании ежедневно накапливаемых данных о животном.

Таблица 5 – Показатели выявления охоты у коров датчиком активности

Показатели	Ед. измерения	Группы	
		1 опытная (с датчиком)	2 контрольная (без датчика)
Выявлена охота	гол./%	115/94,3	148/81,3
Стебельность, всего	гол./%	96/83,5	107/72,3
Не стельные	гол./%	19/16,5	41/27,7
Сервис - период	дней	102±6,9	123±9,2*

Таким образом, применение датчика активности способствует повышению оплодотворяющей способности коров на 11% за счет более полного выявления охоты.

### 3.4. Диагностика состояния фолликула с использованием узи-сканера

Важным показателем, характеризующим эффективность применения узи-сканера, является экономическая эффективность, которая определяет не только общую результативность проведенных исследований, но и целесообразность дальнейшего использования прибора в практической работе.

Таблица 6 – Результаты искусственного осеменения в связи с применением узи-сканера для ранней диагностики состояния яичников у коров

Виды диагностики	Изучаемые варианты	Использовано коров, гол.	Сервис-период	Установлена стельность, гол./%	Условная стоимость 1 гол. тыс. руб.	Предполагаемый эффект, тыс. руб.
1.	Базовый (мануальная пальпация)	60	117	46/77	- 1080	-7560
2.	Опытный (узи-сканер)	60	84	53/89	+ 1080	+7560

В наших исследованиях в базовом варианте использовали традиционный метод мануальной пальпации состояния рогов матки на 80 день после осеменения. В новом варианте узи-сканером исследовали состояние аллантаической жидкости, околоплодных оболочек и плаценты на 30-й день после осеменения. В таблице 6 представлены данные по изучению эффективности применения узи-сканера по сравнению с использованием традиционной мануальной пальпации.

Установлено, что обеспечение ранней и более точной диагностики состояния матки и яичников коров, способствовало сокращению сервис-периода на 33 дня, ожидаемому дополнительному получению 7 телят, повышению экономического эффекта за счет предполагаемого увеличения выхода живых телят (n=7;

57240 против 49680) по сравнению с использованием стандартного приёма более поздней диагностики (разница на 50 дней). При стоимости одного дополнительно полученного телёнка равной 1080 тыс. руб. общий экономический эффект составит 7560 тыс. руб. ( $7 \times 1080$ ).

### 3.5. Влияние возраста коров-доноров на реакцию полиовуляции и качество эмбрионов

Одним из существенных преимуществ метода трансплантации эмбрионов является возможность использования коров в любом возрасте, в том числе после завершения у них продуктивного периода, но при условии, что они являются генетически ценными животными и не имеют патологических изменений в половых органах.

При проведении исследований важно было установить влияние возраста на реакцию полиовуляции и выход полноценных эмбрионов у коров-доноров. В наших исследованиях в качестве доноров эмбрионов использовались коровы в возрасте от 4 до 10 лет, при этом по возрастному критерию они были разделены на 2 группы по 15 голов в каждой, (1 опытная: 4...6; 2 опытная: 7...10 лет).

Полиовуляцию у доноров вызывали гипофизарным гормоном ФСГ-Супер (Россия) в дозе 50 ЕД по Арморевскому стандарту (1000 ИЕ). Эстрофан в дозе 500 мкг вводили на 11...13 день цикла, что обеспечивало более синхронную овуляцию фолликулов, схема обработки показана в таблице 7.

Таблица 7 – Дозы инъекции ФСГ-Супер (1000 ИЕ)

День цикла	Препарат	Утром	Вечером	Общая
9-11	ФСГ-Супер	8 (160)	8 (160)	16 (320)
10-12	ФСГ-Супер	7 (140)	7 (140)	14 (280)
11-13	ФСГ-Супер + эстрофан, мкг	6 (120) + 500	6 (120) + 250	12 (240) + 750
12-14	ФСГ-Супер	4 (80)	4 (80)	8 (160)
13-15	Охота		1-осеменение	
0-й день	-	2-е осеменение	3- осеменение	
1-й день	-			
7-й день	Извлечение			

Осеменение коров-доноров проводили трехкратно с интервалом 10...12 часов. Извлечение эмбрионов осуществлялось нехирургическим методом, на 7 день полового цикла с использованием двухканального катетера фирмы «Нойштадт» (Германия). В качестве промывной среды применяли сбалансированный солевой раствор Дюльбекко с добавлением сыворотки крови телёнка и антибиотиков. Поиск эмбрионов осуществляли под микроскопом при 60-кратном увеличении. Эффективность извлечения оценивалась по числу вымытых из полости матки зародышей, относительно реакции яичников, характеризующейся соответствующим числом установленных ректальной пальпацией жёлтых тел.

Для изучения влияния возраста коров-доноров на реакцию полиовуляции и выход эмбрионов пригодных для криоконсервации было сформировано 2 группы по 15 голов в каждой, которые имели разный возраст (1-я опытная – 4...6; 2-я опытная 7...10 лет). Результаты исследований приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Реакция полиовуляции и качество эмбрионов в связи с возрастом коров-доноров

Показатели	Единицы измерения	Группы, возраст животных (лет)	
		1 группа 4-6	2 группа 7-10
Количество обработанных животных	гол.	15	15
Положительно реагиовавшие на ФСГ-Супер	гол. / %	11 / 73,3	13 / 86,7
Получено эмбрионов и яйцеклеток, всего	эмб. и яйц.	93	118
из них эмбр., пригодных к криоконсервации	эмб. / %	48 / 51,6	56 / 47,4
в т. ч. на 1 положительного донора, всего	эмб.	8,45±0,81	9,08± 0,79
Из них: – полноценных	эмб./ %	5,35± 0,66/ 63,3	4,31± 0,54/ 47,5
– дегенерированных	эмб. / %	2,10±0,42/ 24,9	3,23±0,47/ 35,6
– яйцеклеток	яйц. / %	1,00±0,30/ 11,8	1,54±0,41/ 16,9
Число фолликулов индуцированных к росту	фол.	158	177
Овулировало фолликулов (число жёлтых тел)	ж. т. /%	121 / 77,6	136 / 77,8
Число овуляций на 1 положительного донора	овул.	11,00±0,94	10,46±0,83
Количество эмбрионов пригодных к криоконсервации на 1 обработанного донора	эмб.	3,20±0,44	3,73±0,51

Возраст коров-доноров не оказал существенного влияния на такой показатель как количество прореагировавших животных. Из 15 голов у 11 (73,3%) в 1-й группе (возраст 4...6 лет) наблюдалась положительная реакция на обработку ФСГ-Супер, в то время как во 2-й (7...10 лет) из 15 доноров у 13 (86,7%).

Различия по такому показателю как соотношение эмбрионов пригодных к криоконсервации, между коровами 1 и 2 групп также оказались различными и составили соответственно 48 (51,6%) против 56 (47,4%).

В связи с этим, разница в показателе количества эмбрионов полученных на 1 положительного донора составила 0,63 эмбриона (соответственно 8,45 против 9,08), из них пригодных к криоконсервации соответственно 5,35 (63%) против 4,31 (47,5%).

По совокупности ряда отдельных показателей, таких как: получено всего эмбрионов пригодных к криоконсервации, в том числе на 1 положительного донора; по количеству полноценных и дегенерированных, а также неоплодотворённых яйцеклеток (рис. 11), различия были статистически недостоверными.

Незначительное влияние возраст оказал и на число овуляций на одного положительного по извлечению донора (11,00 в первой группе против 10,46 – во второй), а также на средний выход полноценных эмбрионов (3,20 против 3,73 соответственно). Зависимости по уровню реакции полиовуляции и выходу биологически полноценных эмбрионов установлено не было, у коров – доноров как первой, так и второй опытных групп.

### **3.6. Влияние наличия (либо отсутствия) лактации у доноров на качество эмбриопродукции**

В дальнейших исследованиях для опеределения связи между наличием (либо отсутствием) лактации у животных – доноров эмбрионов – с одной стороны, и количеством эмбрионов пригодных для криоконсервации – с другой. Для этого было сформировано две группы коров – доноров аналогов по возрасту, живой

массе и физиологическому состоянию половых органов. Во 2-ю (опытную) группу были включены коровы, выбракованные из стада (не лактирующие), в 1-ю (контрольную) – лактирующие, по 19 голов в каждой. Данные по результатам исследований представлены в таблице 9.

Из данных таблицы видно, что положительно прореагировали полиовуляцией на инъекции препарата 84,2% коров второй группы и 73,7%. Процентное отношение эмбрионов и яйцеклеток на одного положительного донора составило у не лактирующих животных – 9,12, против 8,86 у лактирующих. Установлено, что из 19 голов 2-й группы положительно отреагировали на обработку гормональными препаратами 16 голов, в то время как в 1-й группе 14 голов. При этом из второй группе на одного положительного донора получено 146 эмбрионов и яйцеклеток или 9,12 в расчете на 1 положительного донора.

Таблица 9 – Уровень полиовуляции и качество эмбрионов в связи с наличием (либо отсутствием) лактации у коров-доноров

Показатели	Ед. изм.	Лактирующие коровы	Не лактирующие коровы
		1 группа (контрольная)	2 группа (опытная)
Количество обработанных животных	гол.	19	19
Положительно прореагировало на ФСГ – Супер	гол. / %	14 / 73,7	16 / 84,2
Получено всего эмбрионов и яйцеклеток/ из них на 1 положительного донора	n/n	124 / 8,86± 0,84	146 / 9,12± 0,71
в том числе на донора: пригодных	n / %	4,40± 0,52/ 49,2	5,37± 0,54/ 56,1
дегенерированных	n / %	2,71 ± 0,46/ 30,6	2,70 ± 0,43/ 31,6
яйцеклеток	n / %	1,79± 0,37/ 20,2	1,00± 0,25/ 12,3
Количество эмбрионов, пригодных к криоконсерв. на одного обработанного донора	n	3,21± 0,39	4,53± 0,47*

В первой группе эти показатели составили 124 и 8,86 соответственно. На одного донора было получено пригодных эмбрионов соответственно 5,37, что составило 56,1% во 2-й группе, в то время как в 1-й 4,40 эмбриона, т.е. 49,2%.

Общее количество полученных эмбрионов и яйцеклеток составило 146 в 1-й группе (не лактирующих коров).

Таким образом, в большинстве случаев выявлено отсутствие достоверных различий между лактирующей и не лактирующей группами по этим показателям. Это относится также к анализу различий при изучении выхода их в расчёте на 1 положительного донора. Здесь по числу пригодных эмбрионов между группами (соответственно 56,1 против 49,2%) несущественные различия установлены в пользу не лактирующих коров. Однако по количеству извлечённых неоплодотворённых яйцеклеток, наоборот, показатель был меньше во 2 группе, чем в (12,3% против 20,2).

В целом достоверный результат между лактирующей и не лактирующей группами получен лишь по показателю извлечённых пригодных для криоконсервирования эмбрионов в расчёте на одного обработанного донора. Он был выше во 2 группе не лактирующих коров по сравнению со 1-й (дойные коровы) на 1,3 эмбриона и составил 4,53 против 3,21 ( $P < 0,05$ ).

Стадии развития и морфологическая характеристика ооцитов и эмбрионов представлены на рис. 11.



1

2

3



4

5

6

7

продолжение рис.11



Рисунок 11 – Стадии развития и морфологическая характеристика ооцитов и эмбрионов

1. Дегенерированная яйцеклетка; 2. Нормально развитая морула 7-дневного возраста, пригодная к пересадке; 3. Нормально развитая бластоциста ранняя 7-дневного возраста, пригодная к пересадке; 4. Поздняя бластоциста 7,5-дневного возраста пригодная к пересадке; 5. Поздняя бластоциста 9-дневного возраста (вышедшая из оболочки, т.е. на стадии экспондирования); 6. Непригодный для пересадки на 7 день цикла по возрасту 36-клеточный зародыш (разрыв зоны пеллюцида); 7. Непригодная к трансплантации на 7 день цикла (дегенерированная) морула поздняя; 8. Непригодный к трансплантации по возрасту на 7 день цикла 16-клеточный зародыш (распад бластомеров); 9. Нормально развитый 36-клеточный зародыш непригодный для пересадки на 7 день цикла по возрасту; 10. Непригодный для пересадки на 7 день цикла по возрасту 16-клеточный зародыш (компактный); 11. Нормально развитая бластоциста ранняя 7-дневная, пригодная для пересадки.

### 3.7. Влияние уровня молочной продуктивности доноров на реакцию полиовуляции и качество эмбрионов

Для проведения исследований было сформировано 3 группы, 2 опытные и 1 контрольная, со следующим уровнем молочной продуктивности: 1-я (опытная) от 8,0 до 8,5 тыс. кг молока за лактацию (n=19); 2-я (опытная) от 8,6 до 9,0 тыс. кг (n=22); 3-я (контрольная) от 9,1 до 11,5 тыс. кг молока за лактацию (n=16). Результаты приведены в таблице 10.

Установлено, что при росте молочной продуктивности наблюдается тенденция к снижению числа овуляций в расчёте на 1 положительно прореагировавшего на обработку донора. Так, при удое 9,0...9,5 тыс. кг молока за лактацию положительно

реагировало полиовуляцией 89,5% доноров, а при 10,1...11,5 тыс. кг – 75,0%.

Таблица 10 – Реакция полиовуляции и выход полноценных эмбрионов в связи с уровнем молочной продуктивности коров-доноров

Показатели	Ед. изм.	Удой за лактацию ( тыс. кг), группы		
		10,1 – 11,5 3 контроль	9,0 – 9,5 1 опытная	9,6 – 10,0 2 опытная
Обработано животных	гол.	16	19	22
Прореагировало на полиовуляцию	гол. - %	12 - 75,0	17 - 89,5	18 - 82,8
Получено эмбрионов и яйцеклеток, всего	эмб. и яйцекл.	85	139	165
в т. ч. пригодных к криоконсервации в, всего	эмб.	42	83	87
Получено яйцеклеток и эмбрионов на 1 донора	эмб. и яйцекл.	7,08±0,74	8,17±0,66	9,17±0,67*
В т. ч.: пригодных к пересадке	эмб. - %	3,50±0,69 - 49	4,88±0,53 - 60	4,83±0,51 - 53
дегенерированных	эмб. - %	2,73±0,45 - 39	2,29±0,41 - 28	2,59±0,40 - 28
яйцеклеток	яйцекл. -%	0,85±0,29 - 12	1,00±0,10 - 12	1,75±0,33* - 19
Среднее кол.-во эмбрионов, пригодных к криоконсерв. на 1 обработанного донора	эмб.	2,62±0,43	4,37±0,45*	3,95±0,41*

В расчёте на 1 положительного по извлечению донора с повышением удоев достоверно снижается и количество яйцеклеток и эмбрионов. Если при удое 9,6...10,0 тыс. кг молока данный показатель составлял 9,17 эмбрионов, то при 10,1...11,5 – лишь 7,08 ( $P<0,05$ ). Одновременно выявлено, что при более высоком показателе извлечения пригодных эмбрионов у животных 1 и 2 опытных групп (53 и 60%) данный показатель у животных наиболее продуктивных (3 контрольная группа) не превысил 49%, и составил лишь 3,50 зародыша в расчёте на одного донора. Также следует отметить достоверно более высокий показатель во 2-й группе неоплодотворённых яйцеклеток – 1,75/гол., в то время как в 3-й контрольной группе этот показатель составил 0,85%.

Таким образом, молочная продуктивность доноров 3-й контрольной группы, находящаяся на уровне 10,1...11,5 тыс. кг молока за лактацию, оказывает существенное влияние на снижение

уровня реакции полиовуляции на 14,5...7,8% (75,0% против 89,5 и 82,8%, соответственно) по сравнению с 1 и 2 опытными группами. Вместе с тем, установлено аналогичное снижение числа неоплодотворённых яйцеклеток у животных 1 группы на 7% по сравнению со 2-й группой (соответственно 12 против 19;  $P < 0,05$ ).

Среднее число эмбрионов пригодных к криоконсервации в расчёте на обработанного донора также оказалось достоверно ниже по группе животных с максимальным уровнем продуктивности (3 группа). Показатели соответственно составили: 2,62 эмбриона неоплодотворённых в третьей группе против 4,37 и 3,95 соответственно в первой и второй ( $P < 0,05$  в обоих случаях).

Выводы:

1. Применение пастбищного содержания течение 60 дней перед отёлом в последующем способствовало достоверному сокращению сервис-периода у коров как венгерской (на 21,8 дней;  $P < 0,05$ ), так и отечественной (на 28,9 дней;  $P < 0,05$ ) пород.

2. Возраст коров-доноров не оказал существенного влияния на такой показатель как количество прореагировавших животных. Из 15 голов у 11 (73,3%) в 1-й группе (возраст 4...6 лет) наблюдалась положительная реакция на обработку ФСГ-Супер, в то время как во 2-й (7...10 лет) из 15 доноров у 13 (86,7%).

Различия по такому показателю как соотношение эмбрионов пригодных к криоконсервации, между коровами 1 и 2 групп также оказались различными и составили соответственно 48 (51,6%) против 56 (47,4%).

3. В целом достоверный результат между лактирующей и не лактирующей группами получен лишь по показателю извлечённых пригодных для криоконсервирования эмбрионов в расчёте на одного обработанного донора. Он был выше во 2 группе не лактирующих коров по сравнению со 1-й (дойные коровы) на 1,3 эмбриона и составил 4,53 против 3,21 ( $P < 0,05$ ).

4. Молочная продуктивность доноров 3-й контрольной группы, находящаяся на уровне 10,1...11,5 тыс. кг молока за лактацию, оказывает существенное влияние на снижение уровня реакции полиовуляции на 14,5...7,8% (75,0% против 89,5 и

82,8% соответственно) по сравнению с 1 и 2 опытными группами. Вместе с тем, установлено аналогичное снижение числа неоплодотворённых яйцеклеток у животных 1 группы на 7% по сравнению со 2-й группой (соответственно 12 против 19;  $P < 0,05$ ).

Среднее число эмбрионов пригодных к криоконсервации в расчёте на обработанного донора также оказалось достоверно ниже по группе животных с максимальным уровнем продуктивности (3 группа). Показатели соответственно составили: 2,62 эмбриона неоплодотворённых в третьей группе против 4,37 и 3,95 соответственно в первой и второй ( $P < 0,05$  в обоих случаях).

#### **4. Способ оценки сохранности акросом спермиев**

Методы искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов были созданы как средство реализации генотипической селекции. Однако большой их потенциал остается не реализованным в направлении увеличения сроков использования быков-производителей, качества спермопродукции, эффективности способов криоконсервации, использования спермы и эмбрионов. Больших перспектив можно ожидать от усовершенствования эффективного метода отбора производителей и доноров по оплодотворяющей способности спермы, а также эмбрионов и способов повышения их качества путем целенаправленного влияния на процесс криоконсервации [3, 284]

На данном отрезке исследований проводилось изучение биологической полноценности спермы, используемой для получения эмбрионов пригодных к криоконсервации. Всего было произведено 324 анализа спермодоз, от быков производителей различного происхождения.

Отобранные образцы заморожено-оттаянной спермы различных быков оценивали на выживаемость и подвижность (активность) спермиев по общепринятой методике [253], а также по состоянию акросом в нашей модификации [277, 238]. Ее суть состоит в том что, на монитор компьютера (1) выводится обработанное программой Bioscan высококачественное изображение

с микроскопа (2), полученное от цветной цифровой видеокамеры (3) и увеличенное в 1400 раз (рис. 12).

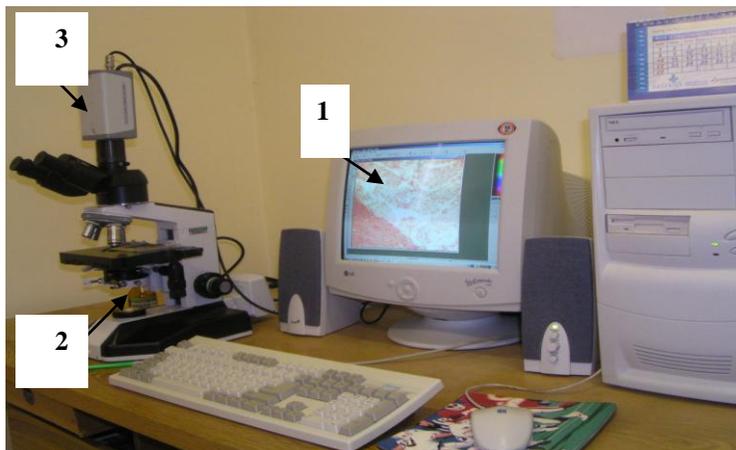


Рисунок 12 – Компьютерная система БИОСКАН

При каждом анализе для оценки качества спермы по состоянию акросом спермиев на предметное стекло наносили глазной стеклянной палочкой одну маленькую каплю оттаянной спермы и рядом с ней три капли из слоя, содержащего жидкую фракцию белка куриного яйца, являющегося изотонической питательной средой.

При этом она должна иметь коэффициент рефракции по шкале прибора ИРФ-22 в пределах 1,3558...1,3590. Смешивали сперму с питательной средой в соотношении 1:3, накрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом при температуре 38°C. Подсчитывали число подвижных сперматозоидов с поврежденными акросомами и число совсем не подвижных в 3 контрольных полях зрения микроскопа. Суммировали аналогичные показатели и вычисляли их соотношение.

Скорость сперматозоидов при этом замедлялась на столько, что они, медленно колеблясь практически стояли на месте.

При этом в большинстве случаев удалось без труда посмотреть не только состояние акросом на движущихся и неподвижных спермиях, но и оценить их подвижность в баллах.

При помощи системы БИОСКАН на мониторе компьютера можно рассматривать снимки спермиев. В ходе исследований, нами были идентифицированы как полноценные сперматозоиды, так и спермии имеющие структурные нарушения, в том числе утратившие акросому, или имеющие различные ее повреждения.

Установлено, что к наиболее часто встречающимся патологическим изменениям в акросомном аппарате спермиев относятся следующие:

1. Со стороны апикальной части головки акросома расслаивается, с одновременным образованием складок (рис. 13).

2. Оболочка базальной части головки спермиев, в области ядерного колпачка, образует ясно выраженное раздвоение (рис. 14).

На рисунках данные участки спермиев указаны стрелками.

Использование метода длительного сохранения эмбрионов и спермы сельскохозяйственных животных в глубоководном состоянии позволяет проводить племенную работу с высокопродуктивным скотом, в целом по республике с привлечением лучшего генетического материала зарубежной селекции.



Рисунок 13 – Спермий с расслаиванием акросомы

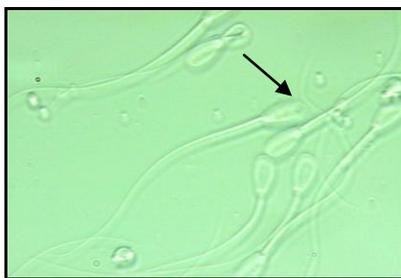


Рисунок 14 – Спермий с оторванной акросомой

Для установления качества заморожено-оттаянной спермы быков-производителей различного происхождения нами были проанализированы спермодозы быков зарубежной селекции по трем таким показателям как: выживаемость спермиев – часов, сохранность акросом – %, активность – баллов (табл. 11).

Таблица 11 – Качество замороженно-оттаянной спермы быков-производителей отечественной и зарубежной селекции

Номер быка	Кличка быка	Показатели качества спермы		
		Выживаемость, час	Сохранность акросом, %	Активность, баллов
Быки зарубежной селекции				
000504		10,5	87,5	4,8
980710		9,5	85,1	5,3
010216		8,5	89,7	5,7
010420		10,5	82,2	4,9
000512		8,5	78,4	6,3
Средний показатель		9,50±1,28	84,58±15,9	5,40±0,50
Быки отечественной селекции				
	Ласковый	7,5	97,4	4,7
1	2	3	4	5
L-37	Стук	8,5	96,9	4,6
400024		7,5	95,4	4,5
400034		8,5	96,1	3,9
400041		10,5	98,8	4,4
400043		8,5	87,0	4,6
400052		7,5	94,7	5,2
400053		6,5	86,6	3,4
400054		9,5	91,3	4,7
400056		8,5	95,5	3,6
400060		9,5	91,6	3,5
400060	Герик	10,5	97,7	4,4
400061		6,5	89,0	3,7
400062		7,5	100	5,2
400063		9,5	100	5,0
400066		9,5	98,4	4,9
400067		9,5	97,4	4,5
400068		7,5	100	4,7
400069		8,5	96,7	4,4
400070		9,5	86,2	3,8
400075		9,5	96,7	4,5
400076		6,5	93,9	5,2
400077		6,5	87,5	3,7
400078		9,5	96,8	4,5
400079		10,5	100	5,4
400080		8,5	97,4	5,1
400082		7,5	95,2	4,8
400083		8,5	100	4,8
400084		8,5	92,3	4,4
400089		7,5	95,4	5,0
400090		8,5	95,2	3,9
Средний показатель		8,47±0,48	95,07±3,91	4,48±0,35

При этом спермодозы были разделены на 2 группы по происхождению, т.е. зарубежные и отечественные. Данные, приведенные в таблице 11, указывают, что в среднем сперма 5-ти импортированных быков лучше, чем 30 отечественных по таким показателям, как подвижность спермиев после оттаивания (соответственно 5,4 против 4,5 баллов), по выживаемости спермиев (9,5 против 8,5 часа), но хуже по сохранности их акросом (84,58 против 95,07%).

При наличии в настоящее время большого количества способов оценки функциональной полноценности генетического материала, ни один из них не имеет непосредственной связи с предполагаемой стельностью [242, 233].

В процессе проведения исследований для установления связи между сохранностью акросом и качеством эмбрионов предназначенных для криоконсервации важно было проанализировать результаты осеменения коров-доноров спермой быков-производителей отечественной и зарубежной селекции.

Для этого было сформировано 7 групп коров-доноров, которые были осеменены заморожено-оттаянной спермой 11 быков различного происхождения (табл. 12).

Наиболее значительные различия в оплодотворяемости отмечены у коров в связи с таким показателем, как сохранность акросом спермиев. При этом количество пригодных к пересадке эмбрионов (85, 55 и 47%) наблюдалось при введении в половые пути самок спермы с уровнем сохранности акросом спермиев соответственно 95, 97 и 93% от быков входящих в группы 6; 7 и 2 (быки РУСП «Племзавод «Россь», РУСП «Племзавод «Красная Звезда» и голландские быки черно-пестрой породы). В тоже время, наименьшее количество их установлено при сохранности акросом в пределах 74, 85 и 83% (соответственно у животных 5; 3 и 1 групп).

Обнаружена заметная тенденция к последовательному снижению качества зародышей, извлеченных у коров доноров, по мере снижения показателя сохранности акросом спермиев до уровня 74-85%. В результате извлечено пригодных к криокон-

сервации эмбрионов лишь от 22 до 32% (соответственно в 3 и 5 группах).

Таблица 12 – Качество эмбрионов, полученных с использованием замороженно-оттаянной спермы производителей различного происхождения

Группы	Место рождения быка, порода	Голов	Средняя продуктивность женских предков (М; МО)	Осеменено доноров, голов	Оценка качества замороженно-оттаянной спермы			Пригодность эмбрионов к криоконсервации, эмб/%	
					удой / % жира	активность, баллов	сохранность акросом, %	выживаемость, часов	пригодные
1	Канада, голштинская	2	3715/4,01	6	5,0	83	9,0	9/26	25/74
2	Голландия, ч/п	2	1094/4,35	6	6,0	93	7,0	15/47	17/53
3	Дания, ч/п	2	1324/4,40	10	5,2	85	9,0	9/22	11/78
4	Германия, ч/п	1	2423/4,03	3	6,3	89	9,5	12/35	22/65
5	Англия, ч/п	1	1659/4,15	3	4,7	74	7,5	7/32	15/68
В среднем (всего)		8	2043/4,18	28	5,4	84,8	8,4	10,4±0,67/32,4	8,0±0,72/67,6
6	РУСП «п/з Россь», ч/п	2	9494/3,95	7	4,9	95	8,0	22/85	4/15
7	РУСП «п/з Красная звезда», ч/п	1	9205/3,95	10	5,0	97	8,5	28/55	23/45
В среднем (всего)		3	349,5/3,95	17	4,9	96,0	8,2	25,0±1,05***/70	3,5±0,81/30

В среднем, при сравнении результатов извлечения эмбрионов в группе доноров осемененных спермой быков зарубежной селекции (n=28), с донорами осемененными спермой быков отечественной селекции установлены достоверные различия по такому показателю, как извлечено эмбрионов пригодных к криоконсервации. Их количество было выше в группе, где для осеменения использовалась сперма быков рожденных в РУСП

«Племзаводы «Россь» и «Красная Звезда» на 14,6 эмбрионов (25,0 – 10,4;  $P < 0,001$ ).

При этом нами установлено, что остальные учитываемые показатели – средняя продуктивность женских особей, активность и выживаемость спермиев определяющего влияния на качество извлеченных зародышей не оказали.

Далее необходимо было выяснить влияние спермы оцененной дополнительно по такому критерию как сохранность акросом, на оплодотворяемость реципиентов, для этого 2-м группам телок были пересажены эмбрионы. В 1-й контрольной группе для пересадки были использованы эмбрионы, полученные при использовании спермы быков-производителей отечественной селекции, а во 2-й опытной для пересадки телкам-реципиентам использовались эмбрионы полученные при использовании спермы быков зарубежной селекции. Установлено, что средняя продуктивность женских предков (М; МО) по 1 контрольной группе составляла 9349 кг молока жирностью 3,95%, что было существенно ниже, чем в опытной: соответственно на 2694 кг и 0,24%. По видимому данное повышение продуктивности во 2-й группе оказало влияние на сохранность акросом спермиев, которая по группе составила 84,8%, т.е. была ниже на 11,2% по сравнению с группой быков-производителей отечественной селекции. Результаты пересадки заморожено-оттаянных эмбрионов, полученных с использованием спермы быков отечественной и зарубежной селекции представлены в таблице 13.

Достоверные различия установлены по количеству пригодных к криоконсервации эмбрионов в пользу животных первой группы на 37,6% ( $P < 0,01$ ). При этом в расчете на одного использованного по извлечению зародышей донора различия были более существенными и составили 1,08 (2,94 против 1,86 соответственно,  $P < 0,01$ ). При пересадке эмбрионов, полученных с использованием спермы быков отечественной селекции, стельность установлена у 55% реципиентов, что оказалось выше их приживляемости во второй группе на 14%, где использовалась сперма быков зарубежной селекции (55 против 41%).

Таблица 13 – Результаты пересадки реципиентам эмбрионов, полученных с использованием спермы быков отечественной и зарубежной селекции

Группа, быки-производители (селекция)	Средняя продуктивность женских предков (М; МО)	Осеменено доноров, голов	Сохранность акросом, спермиев, %	Извлечено эмбрионов пригодных к криоконсервации,		Пересажено эмбрионов реципиентам, голов	Стали стельными	
	удой / % жира			всего шт/%	в т.ч. на 1 донора		гол.	%
1 Контрольная-отечественная	9349/ 3,95	17	96,0	50/70 ±11,11	2,94± 0,21**	29	16	55± 9,24
2 Опытная-зарубежная	12043/ 4,19	28	84,8	52/32 ±8,81	1,86± 0,18	37	15	41± 8,08

Таким образом, наибольшее количество пригодных к пересадке эмбрионов наблюдалось при введении в половые пути коров-доноров спермы с уровнем сохранности акросом спермиев 95-97%, что установлено у быков, рожденных в РУСП «Племзавод «Россь» и РУСП «Племзавод «Красная Звезда». При этом отмечена заметная тенденция к ухудшению качества извлеченных у коров зародышей по мере снижения показателя сохранности акросом спермиев. Вместе с тем было установлено, что другие учитываемые показатели, такие как средняя продуктивность женских предков быков, активность и выживаемость спермиев определяющего влияния на качество эмбрионов не оказали.

Следовательно, использование спермы быков-производителей отечественной селекции при условии дополнительной оценки ее по показателю сохранности акросом спермиев, обеспечивает повышение приживляемости заморожено-оттаянных эмбрионов на 14%, что в расчете на каждые 10 пересадок позволяет получить дополнительно на 1,4 теленка. При стоимости 1 теленка-трансплантата достигшего возраста 18 мес. – 3000 у.е. (6474 тыс. руб.) 1,4 теленка равняется 9063 тыс. руб.

## 5. Нормализация репродуктивной функции у коров-доноров

*Лечение эндометрита.* Установлено, что чем крупнее молочно-товарный комплекс (МТК), тем больше проблем при работе с высокопродуктивными животными и, соответственно, выше процент вынужденной выбраковки. При среднем показателе по республике 31%, на молочно-товарных комплексах он составляет около 45%. Из них: по гинекологическим заболеваниям – 20%; по заболеваниям молочной железы – 15%; по болезням конечностей – 10%. При этом, из-за отсутствия активного моциона у коров в сухостойный период, длительность охоты у 57% из них сокращается до 1-4 часов.

В данных условиях возрастает необходимость в наличии на каждом МТК освобожденной должности ветврача-гинеколога. К сожалению лишь 28% хозяйств области имеют в штате такого специалиста (рис. 15).

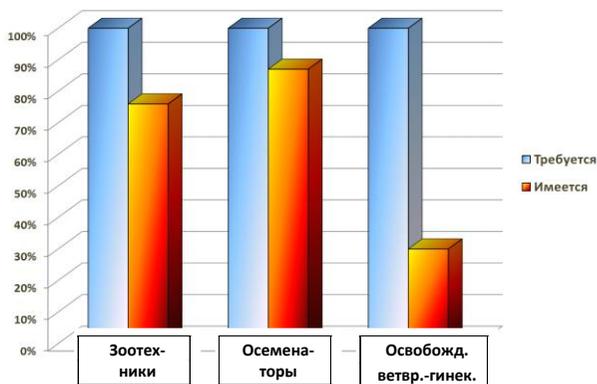


Рисунок 15 – Процент обеспеченности специалистами

По этой причине не всегда решается проблема своевременной диагностики коров на физиологическое состояние половых органов в послеродовой период. Не разработана система профилактики и терапии послеродовых осложнений. В случае отсутствия высококвалифицированного ветврача-гинеколога, примене-

ние гормональных, нейротропных, простагландиновых, внутриматочных и др. препаратов осуществляется несвоевременно а, порой, не по назначению. Прежде всего, это касается таких заболеваний, как гипофункция яичников, персистентное желтое тело, лютеиновая киста.

На рис. 16. (2, 3, 4) представлены яичники при разном физиологическом состоянии коров.

В связи с указанным, решать проблему воспроизводства стада в условиях работы МТК необходимо в двух взаимозависимых направлениях:

1. Организация принудительного активного моциона сухостойных коров, как в летний, так и в стойловый периоды года;

2. Обучение (переобучение) ветврачей-гинекологов, а также работников по искусственному осеменению ректальной диагностике состояния половых органов в норме и при патологии в послеродовой период.

Лишь устранение этих двух указанных недостатков позволит проводить работу по воспроизводству стада в условиях МТК системно, с минимальными затратами труда и средств и увеличить продолжительность продуктивного использования коров дойного стада.

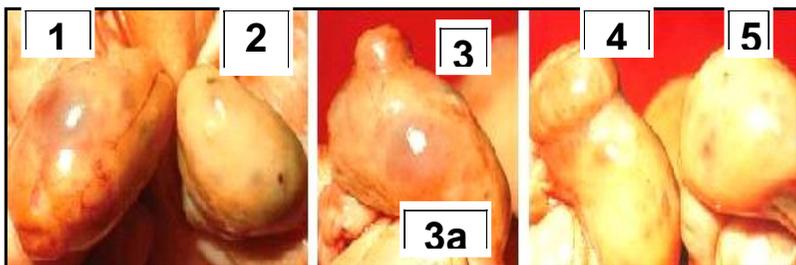


Рисунок 16 – Яичники при разном физиологическом состоянии коров  
1 – Зрелый фолликул (3-й степени зрелости); 2 – Гипофункция яичников; 3 – Остаточное жёлтое тело и одновременно зреющий фолликул (3а) при пропуске охоты у коровы; 4 – Персистентное жёлтое тело; 5 – Лютеиновая киста

По результатам вышеуказанных исследований на кафедре генетики и разведения с.-х. животных УО «ГГАУ» разработана схема искусственной регуляции репродуктивной функции коров в сухостойный (за 30 и 20 дней до отела) и новотельный (первые 2 недели после отела) периоды репродуктивной функции коров в условиях МТК (рис. 17).

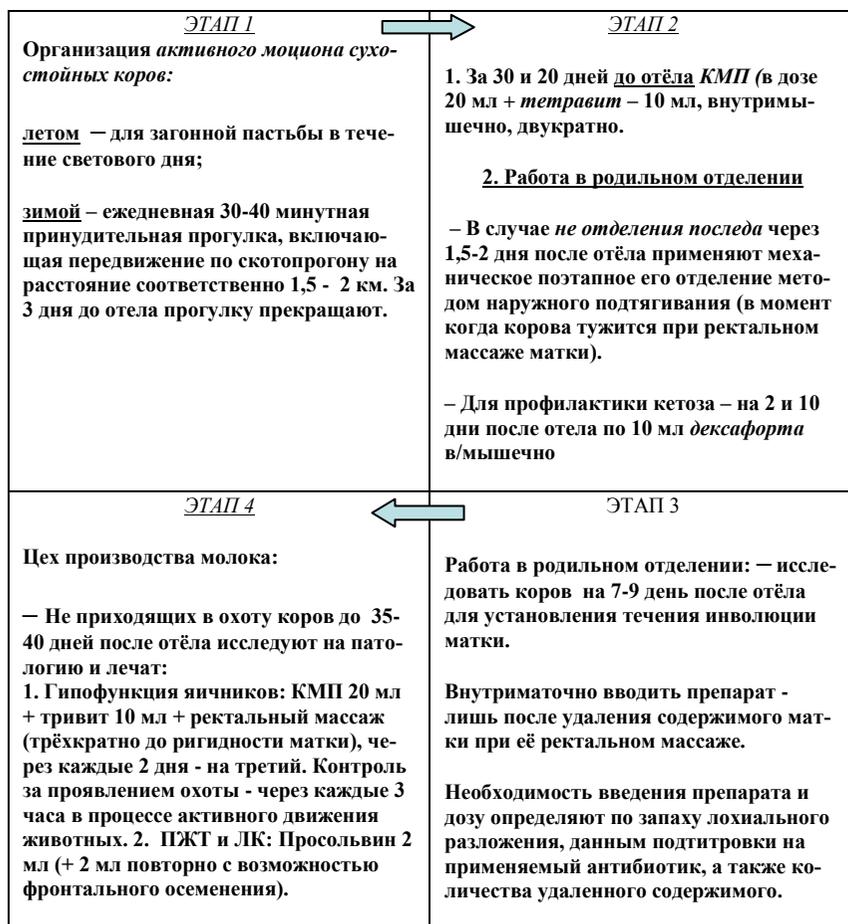


Рисунок 17 – Схема искусственной регуляции репродуктивной функции коров

Доказана экономическая выгода от применения вышеуказанной обработки как до, так и после отёла, до момента перевода их в секцию производства молока.

Одной из причин снижения продуктивности коров в племенных хозяйствах Республики Беларусь является временное или постоянное нарушение способности их к размножению. В связи с этим особенно важное значение имеют: своевременная диагностика послеродовой патологии репродуктивной системы, качественные профилактика и лечение и плодотворное осеменение, позволяющие принять необходимые меры по сокращению сервис-периода и снижению яловости, удлинению сроков продуктивности и использования коров дойного стада.

В наших исследованиях необходимо было определить эффективность терапевтической обработки животных при эндометрите новым препаратом ихтиоглюкобикарбонат и его влияние на результативность осеменения. В опыте использовали коров черно-пестрой породы живой массой 550-650 кг, с удоем 10000...11500 кг принадлежащих СПК «Октябрь-Гродно». Для сравнения профилактического эффекта фармазина и ИХБ было сформировано 1 контрольная и 3 опытных группы. В контрольной группе использовался 3%-ный раствор фармазина. В опытных – ИХБ, ИХБ + метрикур, ИХБ + тилозинокар, во 2-й, 3-й и 4-й соответственно. Острую форму эндометрита диагностировали на 3-6 день после отела по характерным выделениям из полового аппарата животных, а также в процессе проведения ректального исследования. Влапалище и шейка матки были отечны, ярко-красного цвета с точечными или полосчатыми кровоизлияниями. Матка, как правило, находилась глубоко в брюшной полости и была значительно увеличена (не отводилась рукой), имела тестоватую консистенцию и не подтягивалась в тазовую полость. Шейка матки была расположена у входа в брюшную полость, толщиной 8-10 см, также тестоватой консистенции.

Препарат ихтиоглюкобикарбонат, примененный для терапии эндометрита у коров-доноров, имел следующий состав: ихтиол – 5%; сахароза – 10%; бикарбонат натрия – 1,5%; хлористый натрий – 1,5%. При этом ихтиол содержит 10,5% органиче-

ски связанной серы, действует антисептически, местнообезболивающе. Антимикробные свойства обусловлены наличием серы и ароматических веществ. Сахар способствует сокращению миометрия, увеличивает вязкость среды и устойчивость к развитию гнилостной микрофлоры. Хлористый натрий и бикарбонат натрия активизируют секреторную функцию маточных желез и раскисляют содержимое полости матки.

Схема применения препарата: начиная с 3-го дня после отела, через 2 дня на 3-й, внутриматочно по 150 мл (3-й день); 100 мл (6-й день); 100 мл (9-й день). После 12...15 дня препарат для внутриматочного введения применять не рекомендуется, а лишь антибиотики. Экспресс-диагноз на наличие субклинического эндометрита у неоднократно перегуливающих коров ставился по общепринятой методике Флегматова (цитировано из учебника Студенцова А. П. и др. [285]). Терапия животных, не излеченных после первой обработки, осуществлялась по методу, описанному сотрудниками БелНИИЭВ и УО «ВГАВМ» (Нищик Е.В. и др. [286]). Для этого, за 6-8 часов до осеменения коровам вводили антибиотики: пенициллин (200 тыс. ед.), стрептомицин (300 тыс. ед.), растворенные в 20 мл стерильного 0,9%-ного хлористого натрия. При наличии незначительных, единичных вкраплений гноя в слизи проводили осеменение животного спустя 6...8 часов после обработки.

Лечение и профилактика эндометритов у животных с применением фармазина в сравнении с новым препаратом ихтиоглюкобикарбонат (ИХБ), а также его комплексное использование с метрикуром и тилозинокаром осуществлялось по схеме указанной в таблице 14.

Таблица 14 – Доза и дни обработки коров потенциальных доноров эмбрионов ветпрепаратами

№ схемы (группа)	Голов	Препараты	Способ введения	Схема применения и дозы, мл	Дни обработки после отела		
					3	6	9
1	2	3	4	5	6	7	8
1 контрольная	30	фармазин 3%-й	Внутриматочно	150+100+100	+	+	+

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6	7	8
2 опытная	31	ИХБ	Внутрима- точно	150+100+100	+	+	+
3 опытная	15	ИХБ+ метрикур	Внутрима- точно Внутрима- точно	150+ 20+20	+	+	+
4 опытная	15	ИХБ+ тилози- нокар	Внутрима- точно Внутрима- точно	150+ 100+100	+	+	+

Расчет показал, что затраты на одну выздоровевшую после лечения голову составили в среднем по 1 и 2 группам соответственно 15,0 и 3,3 тыс. руб. а по 3 и 4 группам – 93,5 и 25,0 тыс. рублей. Анализ эффективности применения ветпрепаратов используемых для излечения послеродовых эндометритов отображен в таблице 15.

Таблица 15 – Эффективность обработки животных ветпрепаратами в послеродовой период

Показатели	Группы			
	1 контрольная	2 опытная	3 опытная	4 опытная
Обработано коров	30	31	15	15
Выздоровело за одну обработку; голов/ %	13±6,17/ 45	14±6,23/ 49	8/ 53	9/ 60
Из них оплодотворилось в течение 90 дней после отела; гол / %	8/66	10/84	7/87	7/78
Растелилось, голов	8	10	7	7
Стоимость одной обработки, у.е. тыс. руб.	0,86 1,87	0,15 0,3	6,15 13,3	1,65 3,5
Затраты средств в расчете на одну вы- здоровевшую голову, тыс. руб.	15,0	3,3	93,5	25,0

Установлено, что в результате обработки процент выздоровевших и проявивших охоту животных был выше у коров 2-й опытной группы, где применялся ИХБ (49 против 45%) по сравнению с 1-й контрольной. В других группах количество выздоровевших животных возрастало, и составляло 53 – в 3 опытной и 60% в 4-й. Однако количество плодотворных осеменений, учтенных в течение 90 дней после отела, значительно различалось и составляло между животными 1 и 2 групп 18% (соответствен-

но 66 против 84%). В 3 и 4 группах этот показатель составил 87 и 78% соответственно.

На основании проведенных исследований производству предложена эффективная схема лечения и профилактики эндометритов у коров-потенциальных доноров, обеспечивающая выздоровление после одного курса обработки препаратом ИХБ и комплексном его применении с метрикуром и тилозинокаром – 49...60% животных, при оплодотворяемости за период до 90 дней после отела 78...87%. По результатам исследований схема нормализации репродуктивной функции у коров в послеродовой период может быть применена в практических условиях работы пунктов и центров трансплантации эмбрионов. Экономический эффект при сравнении 3%-ного фармазина (1 контрольная) со 2-й, 3-й и 4-й (опытными) группами составляет соответственно +11,7; -78,5; -10 тыс. руб. в расчете на одну вылеченную голову (в ценах на 04.11.2010).

Следовательно, наименее затратная схема обработки коров выявлена при использовании препарата ИХБ (3,3 тыс. руб. за 1 курс введения), при достаточно высокой эффективности по выздоровлению животных - потенциальных доноров - 49% за 1 обработку (табл. 16).

Таблица 16 – Экономическая эффективность применения ИХБ для сухостойных коров

Группы, n	Исследуемые варианты	Получено телят, гол / % (± гол)	Стоимость 1 гол. приплода, тыс. руб.	Стоимость полученных телят, тыс. руб.	Экономический эффект, тыс. руб.
1 контроль, 300	Базовый (фармазин)	245/82 (- 44)	2510,5	615072	- 110462
2 опыт, 300	Опытный (ИХБ)	289/96 (+ 44)	2510,5	725534	+ 110462

*Лечение мастита.* Способ лазеропунктурной рефлексотерапии коров при маститах проводился путем воздействия продолжительностью 2-3 мин. на биологически активные точки молочной железы магнито-инфракрасно-лазерным излучением с частотой следования волн 96 Гц в течение 4-5 сеансов. При этом

использовали аппарат «МИЛТА – МВ» (приложение 3), который предназначен для лечения животных путем воздействия на биологически активные точки (БАТ) вымени животного, расположенные в области основания сосков каждой четверти вымени, а также еще на 2 точки в средней части вымени над сосками, начиная с пораженного участка.

Согласно инструкции по применению сеансы проводили 5-тикратно через день. Аналогичным животным контрольной группы использовали 1%-й раствор диоксида в соответствии с наставлением по применению, который оказывает воздействие на микрофлору вымени и организм животного в целом.

В результате установлено, что разработанный способ лазеропунктурной рефлексотерапии наиболее эффективен при воздействии на каждую из указанных биологически активных точек вымени магнито-инфракрасно-лазерным (МИЛ) излучением с частотой следования продолжительностью 2-3 мин., частотой следования волн 96 Гц в течение 4-5 сеансов.

При этом воздействие оказывают на 4 БАТ, а сеансы проводят через день.

Способ осуществляют следующим образом. При выявлении коровы больной маститом, подходят к животному сбоку со стороны головы, накладывают излучатель прибора МИЛТА – МВ с предварительно установленной частотой волн 96 Гц на БАТ вымени, включают питание и воздействуют в течение 2-3 мин на каждую поочередно, начиная с наиболее болезненной. Проводят 4-5 сеансов через день в зависимости от глубины поражения долей вымени маститом.

Для проверки эффективности способа был проведен научно-хозяйственный опыт по определению эффективности лечения маститов у коров черно-пестрой породы. Для этого было сформировано 3 группы животных: 1 (контрольная) – животным в пораженную долю вымени через сосковый канал вводили 20 мл 1%-го раствора диоксида 1 раз в сутки в течение 7-ми дней и в соответствии с наставлением по применению (базовый способ). 2-й (опытной) группе коров проводили наружную обработку поверхности больной доли вымени путем воздействия магнито-

инфракрасно-лазерным (МИЛ) излучением, т.е. применяли терапию частотой следования волн по 96 Гц с экспозицией воздействия 2-3 мин. прибором МИЛТА – МВ.

Животных 3-й (опытной) группы обрабатывали по вышеприведенному способу аналогичным воздействием на МИЛ, т.е. осуществляли лазеропунктурную рефлексотерапию на биологически активные точки, указанные на рисунке (три парные точки – слева и справа вымени).

Поиск миопатических точек на вымени и оценку их функционального состояния производили ветеринарно-диагностическим прибором (ВДП) согласно общепринятой методике.

Результаты опыта приведены в таблице 17.

Анализ полученных данных показал, что при лечении маститов у коров показал, что при лечении маститов наиболее эффективным методом было воздействие МИЛ-терапии на точки акупунктуры вымени.

Таблица 17 – Акупунктурный метод лечения маститов у коров-доноров

Группа	Голов	Площадь БАТ, мм		Количество излеченных животных в течение 7 дней		Срок от отела до излечения	
		до лечения	после лечения	поголовье	%	дней	± к контрольной группе
1	18	27,2±1,34	13,1±2,55	10	56	23	0
2	18	28,4±1,11	7,4±0,60	9	50	25	± 2
3	18	28,3±1,29	5,6±0,44*	14	78	19	- 3

Его результативность оказалась на 22% выше по сравнению с фармакологическим лечением коров 1-ой группы и на 28% в сравнении с лазеротерапией молочной железы животных 2-й группы. При этом площадь БАТ у коров 3-й группы был достоверно ( $P<005$ ) меньше в сравнении с животными двух других групп и находился в пределах нормы для данного вида животных – 5,6 мм.

Таким образом, предложенный способ лазеропунктурной рефлексотерапии у коров при маститах способствует восстановлению функции вымени за более короткий срок по сравнению с медикаментозным или обработкой магнито-инфракрасно-

лазерным излучением большой поверхности вымени животного. Наставление по применению магнито-инфракрасно-лазерного аппарата «МИЛГА-МВ» в ветеринарии № 13-5-2/1471 утверждено Минсельхозпродом Российской Федерации от 14 января 2004 г.

## **6. Способ повышения приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов**

Одной из главных причин эмбриональных потерь на ранних стадиях развития по данным, представленным Клинским Ю. Д. [215], Прокофьевым М. И. [196], Черемисиновым Г. А. [141], Эрнстом Л. К., [287], является нарушение баланса половых гормонов в организме самок. Из эндокринных факторов наибольшее значение имеет прогестерон, который необходим для возникновения и поддержки беременности. Это, а также недостаточная изученность роли гормона во взаимосвязи – эмбрион, желтое тело, матка послужило основанием для изучения влияния препаратов прогестерона на оплодотворяемость телок-реципиентов.

Для получения максимального эффекта по приживляемости пересаженных эмбрионов с минимальными затратами нами был применен препарат капронат оксипрогестерона КОП-17а, который является синтетическим аналогом гормона желтого тела – прогестерона. Химически отличается от него тем, что в положении С17 содержит остаток капроновой кислоты. Будучи эфиром оксипрогестерона, капронат более стоек в организме, чем прогестерон, действует медленнее и оказывает пролонгирующий эффект. После однократной внутримышечной инъекции масляного раствора капронат оксипрогестерона действие его продолжается до 14 дней. Вызывает переход слизистой оболочки матки из фазы пролиферации, вызываемой фолликулярным гормоном, в секреторную фазу, а после оплодотворения способствует ее переходу в состояние, необходимое для развития оплодотворенной яйцеклетки. Его пролонгирующее действие способствует

нормальной обеспеченности организма животных прогестероном на длительный период. При этом применяется двукратная схема обработки: первый раз – в период за 48 часов до пересадки эмбрионов и повторно – на 15-й день полового цикла. Эти периоды совпадают со временем формирования желтого тела беременности, усиления секреции трофобласта, имплантации зиготы в эндометрий и начальной стадии плацентации. Таким образом, гормональная обработка охватывает все критические периоды внутриутробного развития эмбриона.

Уровень содержания прогестерона, эстрадиола-17 $\beta$ , кортизола, тироксина и трийодтиронина в периферической крови животных определяли радиоиммунологическим методом в ГУ «НПЦ Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси» (г. Гродно). Одновременно с взятием крови проводили ректальную пальпацию яичников на клиническую выраженность в них желтых тел по общепринятой методике, с некоторыми нашими уточнениями, касающимися телок. Морфологическую оценку качества эмбрионов – под микроскопом.

Исследования проводились на базе РУСП «Племзавод «Россь» Волковысского района Гродненской области на телках черно-пестрой породы. Для изучения влияния экзогенного прогестерона на приживляемость эмбрионов в организме реципиентов, были сформированы 2 группы телок-аналогов по возрасту – 14...16 месяцев и живой массе 360-380 кг по 36 голов в каждой. Дозировка препарата для телок – 12 мл 12,5%-ного раствора капронат оксипрогестерона-17 $\alpha$  установлена согласно рекомендациям Главного ветеринарного управления Госагропрома РФ [90] внутримышечно, в дозе 12 мл, с нашими уточнениями [202].

Схема исследований, дозы и кратность обработки Извлечение, оценку, пересадку эмбрионов, осуществляли согласно «Рекомендаций по трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве» отображены в таблице 18.

Криоконсервацию эмбрионов проводили с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации.

Таблица 18 – Схема исследований, доза и кратность введения КОП-17 $\alpha$  телкам-реципиентам

Группы	n	Способ введения, доза, кратность обработки на одну голову
1 Контрольная	36	Внутримышечно 12 мл физиологического раствора хлористого натрия двукратно, на 5-й (за 48 ч до пересадки эмбрионов) и повторно – на 15-й дни полового цикла
2 Опытная	36	Внутримышечно, 12 мл 12,5%-го раствора КОП 17- $\alpha$ двукратно, на 5-й (за 48 ч до пересадки эмбрионов) и повторно – на 15-й дни полового цикла

На первом этапе исследований была изучена степень влияния инъекций препарата КОП-17 $\alpha$  на гормональный статус крови телок- реципиентов, а также на клиническую выраженность в них желтых тел. Результаты приведены в таблице 19.

Таблица 19 – Содержание гормонов трийодтиронина и тироксина

Группы	n	Трийодтиронин (Т3), нг/мл			Тироксин (Т4), мкг/100мл		
		Дни взятия проб крови					
		7-й	17-й	27-й	7-й	17-й	27-й
1 контрольная	36	1,47 $\pm$ 0,15	1,39 $\pm$ 0,13	1,40 $\pm$ 0,07	4,10 $\pm$ 0,35	3,76 $\pm$ 0,27	3,33 $\pm$ 0,21
2 опытная	36	1,51 $\pm$ 0,16	1,41 $\pm$ 0,15	1,25 $\pm$ 0,05	4,10 $\pm$ 0,33	4,40 $\pm$ 0,38	4,45 $\pm$ 0,40 *

Нами не обнаружено достоверных изменений в содержании трийодтиронина (Т3) у опытных телок 2 группы в течение полового цикла, после применения инъекций КОП-17 $\alpha$ , по сравнению с контролем.

Анализ данных по содержанию тироксина (Т4) показал, что концентрация гормона изменяется в неодинаковой для животных разных групп последовательности. Наиболее значительным является снижение его уровня у животных контрольной группы по сравнению с опытной, при наивысшем подъеме к 27-му дню после начала охоты: 4,45 против 3,33 мкг/100 мл ( $P < 0,05$ ).

Сопоставление содержания кортизола в крови телок 1 и 2 групп показало, что динамика секреции гормона к концу первой недели после наступления охоты была примерно одинаковой – соответственно (табл. 20).

Уровень гормона в дальнейшем достигал концентрации к 17-му дню цикла у животных как контрольной, так и опытной групп, при дальнейшем последовательном несущественном по-

нижении показателя к 27 дню (соответственно до 18,4 и 17,6 нг/мл).

Таблица 20 – Содержание гормонов кортизола и эстрадиола

Группы	n	Кортизол, нг/мл			Эстрадиол, пг/мл		
		Дни взятия проб крови					
		7-й	17-й	27-й	7-й	17-й	27-й
1 контрольная	36	14,81±	19,31±	18,4±	19,30±	21,80±	24,68±
		2,75	3,31	3,17	3,39	3,60	3,49
2 опытная	36	12,49±	18,03±	17,6±	20,33±	25,82±	28,12±
		2,19	3,15	3,07	3,42	3,78	3,91

Изучение динамики эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови показало, что концентрация этих гормонов в течение полового цикла изменяется в различной для групп животных последовательности. Установлено, что к 17-й дню полового цикла, при наличии уже хорошо пальпируемых желтых тел у животных обеих групп, уровень концентрации эстрадиола повысился в среднем у животных контрольной группы на 2,5 пг и составил соответственно 21,80 пг/мл. В опытной – этот показатель увеличился на 5,49 пг и достиг величины равной 25,82 пг/мл. Уровень эстрогенной активности имел тенденцию к повышению и к 27 дню показатель уже составлял, по сравнению с 7-м днем, соответственно в контрольной группе, на 5,38 пг/мл (24,68 против 19,30) и на 7,79 – (28,12 против 20,33;  $P<0,05$ ).

Концентрация прогестерона также имела тенденцию к росту после инъекции КОП-17а животным опытной группы, а также физиологического раствора – контрольной (табл. 21).

Таблица 21 – Содержание прогестерона в крови телок-реципиентов

Группы	n	Прогестерона, нг/мл		
		Дни взятия проб крови		
		7-й	17-й	27-й
1 контрольная	36	2,08±0,13	2,16±0,21	2,51±0,36
2 опытная	36	2,36±0,19	3,21±0,45	3,42±0,50*

Уровень его устойчиво возрастал и к 27 дню, в 1 группе контрольных животных, увеличился на 0,44 (2,51 против 2,08) нг/мл, в опытной – на 1,06 (3,42 против 2,36;  $P<0,05$ ) нг/мл.

Приживляемость эмбрионов после введения за 48 часов до их пересадки (7-й день полового цикла) и повторно на 15-й день, представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Эффективность применения препарата КОП-17а в связи с приживляемостью эмбрионов

Группа	n	Препарат	Стали стельными	
			голов	%
1 Контрольная	36	1%-й физиологический раствор хлористого натрия	15±1,90	42
2 Опытная	36	12,5%-й раствор КОП 17-а	22±2,81*	51

После пересадки эмбрионов, процент стельности в опытной и контрольной группах составил 51 против 42% соответственно.

Установлено, что применение капроат оксипрогестерона-17а способствует достоверному повышению приживляемости эмбрионов на 7 голов ( $P < 0,05$ ) или на 9% за счет своевременной стабилизации баланса половых гормонов в организме реципиента в наиболее ответственные для этого периоды.

Использование технологии криоконсервирования эмбрионов позволяет сохранить ценный эмбриоматериал при отсутствии животных-реципиентов, а также проводить трансплантацию зародышей в строго определенное время с максимальной эффективностью. Усовершенствованный способ криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации предусматривает насыщение зародышей криопротектором, охлаждение их в парах жидкого азота и погружение в жидкий азот при температуре минус 196<sup>0</sup>С. Для этого сначала эмбрионы помещают на 5 минут в первую защитную среду, затем – на 70-80 секунд во вторую защитную среду, а затем пайеты с эмбрионами переносят в паты жидкого азота на 60 секунд.

Приготовление защитных сред: *1-я защитная среда* (10%-й раствор глицерина): отмеряют 1 мл химически чистого глицерина и доводят объем раствора до 10 мл фосфатно-солевым буфером Хенкса, приготовленным ранее с добавлением бычьего сывроточного альбумина (5 г/л), гентамицина (12 мкг/мл) и ампициллина (100 ед/мл).

*2-я защитная среда*: отмеряют 3 мл химически чистого глицерина, 1,5 мл химически чистого диметилсульфоксида, 0,5 мл раствора поливидона, смешивают компоненты и доводят раствор до 10 мл фосфатно-солевым буфером Хенкса, приготовленным так, как указано для первой защитной среды.

При стоимости 1 полученного трансплантата достигшего возраста 18 мес. – 600 у.е. (6074 тыс. руб.) стоимость дополнительных 7 телят ровняется 42518 тыс. руб.

По результатам проведенных нами исследований, можно утверждать, что для повышения приживляемости эмбрионов целесообразно проводить двукратную обработку реципиентов: за 48 часов до пересадки и повторно через 10 дней (15-й день цикла), внутримышечно, в дозе 12 мл 12,5%-ного масляного раствора. Применение КОП-17а телкам-реципиентам позволяет получить повышение приживляемости пересаженных эмбрионов на 9%, а в итоге увеличивает общую результативность технологии трансплантации.

## **7. Приемы повышения жизнеспособности эмбрионов**

### **7.1. Результативность применения аминазина коровам-донорам**

Известен способ повышения жизнеспособности эмбрионов у животных – реципиентов с использованием маточных релаксантов и биологически активных веществ, вводимых в организм перед имплантацией им полноценных эмбрионов. В результате несколько повышается жизнеспособность и приживляемость пересаживаемых эмбрионов крупного рогатого скота. Однако использование всех предложенных средств для приживляемости и жизнеспособности эмбрионов у коров и телок-реципиентов низкая и находится в пределах 35-45%.

Много исследований посвящено изучению биологически активных веществ (прогестерон, лютеолизин и др), способных усилить функциональную деятельность репродуктивных орга-

нов и систем, повысить приживляемость эмбрионов при искусственном осеменении животных [199, 288, 202, 203].

Однако полностью оценить возможные преимущества вышеуказанных разработок пока не удалось применительно к высокопродуктивным коровам, используемым при трансплантации эмбрионов, поскольку проявление фенотипических признаков обусловлено генетическими и внешними условиями. Если жизнеспособность после извлечения или выживаемость заморожено-оттаянных эмбрионов после трансплантации в матку рассматривать как фенотипический признак, то его гибель может происходить в результате отклонения от нормы генетических или внешних условий жизнедеятельности, а также их взаимодействия. Поэтому при современных условиях вступления Беларуси в эпоху рыночных экономических отношений стоит задача усовершенствовать один из ключевых элементов метода трансплантации, касающийся повышения жизнеспособности эмбрионов, полученных от выдающихся по продуктивности коров-доноров. Поскольку имеющееся в РУСП «Племзавод «Россь» поголовье генетически высокоценных животных представляет собой созданное последними тремя десятилетиями стадо лучших генотипов на территории республики, злободневным становится вопрос о реализации генетического материала (эмбрионов), как внутри Беларуси, так и за ее пределы. Это требует дополнительных научных разработок со стороны учёных в данном направлении. Это также относится к диагностике, профилактике и терапии послеродовых заболеваний коров, являющихся основными причинами эмбриональных потерь.

Известно, что отрицательные последствия стрессовых воздействий сказываются не только на самочувствии животного, но и на физиологических и биохимических процессах в его организме, в том числе на качестве и дальнейшей жизнеспособности и приживляемости зародышей самок. Влияние транквилизаторов благоприятно сказывается на результате искусственного осеменения у сельскохозяйственных животных с учетом, если животных предварительно обрабатывать аминазином или другим транквилизатором. Под влиянием препарата в дозе от 0,1 до 0,2 г

действующего вещества расслабляется скелетная мускулатура тела, понижается двигательная активность животных, полностью прекращается стресс и защитная реакция в период фиксации самок в станке. При этом улучшаются показатели искусственного осеменения [181].

В результате исследований нами была изучена эффективность применения данного препарата на коровах - потенциальных донорах эмбрионов при искусственном осеменении. Для этого за 10-15 мин. до осеменения обрабатывали животных транквилизатором аминазином, в дозе 4 мл 2,5%-го раствора на 100 кг живой массы животного /Способ трансплантации эмбрионов (положительное решение ВНИИГПЭ РФ о выдаче патента № 5032321 [289]). Для этого на базе СПК им. Воронежского Берестовицкого района Гродненской области были сформированы опытная и контрольная группы коров, по 610 в каждой, продуктивностью 8 и более тыс. кг молока за лактацию (табл.8). Животным опытной группы перед осеменением инъецировали аминазин, контрольной – физиологический раствор хлорида натрия. Результаты исследований представлены в табл. 23.

Таблица 23 – Экономическая эффективность применения аминазина донорам по результатам искусственного осеменения

Показатели	Группы	
	Контрольная (физраствор)	Опытная (аминазин)
Осеменено коров, (n)	610	610
Общая оплодотворяемость, n /%	486/80	550/93
в т.ч. от 1-го осеменения, n /%	314/51	392/64
Сервис-период, дн.	106	76
Получено живых телят, n	481	545
Стоимость 1 теленка, тыс. руб	2510,5	2510,5
Стоимость полученных телят, тыс. руб.	1207550	1368222
Экономический эффект тыс. руб. (± к контрольной группе)	- 160672	+ 160672

Установлена стельность соответственно у 550 голов (93%) опытной и у 80% (486 голов) контрольной групп. Таким образом, экономический эффект, по окончании НИР складывается из разницы в стоимости полученных телят и составляет 160672 тыс. руб.

Для выявления оптимальной дозы введения аминазина донорам, перед извлечением у них зародышей, было сформировано 4 группы животных по 9 голов в каждой. Первая группа была контрольной, животные которой перед извлечением у них эмбрионов подвергались обработке физиологическим раствором NaCl.

Донорам второй группы за 10-15 мин. до извлечения эмбрионов внутримышечно инъецировали по 4 мл 2,5%-го раствора аминазина /0,1 г действующего вещества/ на 100 кг живой массы, животным третьей группы – по 5 мл раствора аминазина /0,125 г вещества/ и донорам четвертой группы – 6 мл раствора аминазина /0,15 г вещества/. Результаты исследований представлены в табл. 24.

Как видно из данных опыта, коров-доноры контрольной группы имели в среднем 64,1% жизнеспособных и пригодных для пересадки эмбрионов. От их сверстниц из второй группы получено 76,8%, из третьей – 88,1 и четвертой – 89,1% полноценных зародышей.

Таблица 24 – Экономическая эффективность применения различной дозировки аминазина донорам по результатам трансплантации эмбрионов

Показатели	Группы животных			
	1 контр.	2 опыт.	3 опыт.	4 опыт.
Количество животных, п	9	9	9	9
Извлечено эмбрионов, п	53	56	59	64
Из них жизнеспособных, п / %	34/64,1	43/76,8	52/88,1	57/89,1
Пересажено реципиентам, п	19	19	19	19
Установлена стельность, гол./%	7/37	8/42	10/53	7/37
Эффективность по жизнеспособности, %	100	126,5	152,9	167,6
Эффективность по приживляемости, %	100	105	116	100

Установлено, что применение предложенного способа повышения жизнеспособности эмбрионов, включающего: предварительную обработку коров-доноров, с продуктивностью свыше 10 тыс. кг молока за лактацию, транквилизатором аминазином за 10-15 мин. до осеменения, в дозе 5 мл 2,5%-го раствора на 100 кг

живой массы животного, позволяет повысить эффективность жизнеспособности эмбрионов на 13%.

Несмотря на то, что введение донорам 3 и 4 группы соответственно по 5 и 6 мл 2,5%-го аминазина /соответственно 0,125 и 0,15 г действующего вещества на 100 кг живой массы/ количество жизнеспособных эмбрионов было соответственно на 11,3 и 12,3 % больше, чем в случае применения минимальной дозировки во второй группе.

Таким образом, разработан способ повышения жизнеспособности эмбрионов. Он включает предварительную обработку коров-доноров с продуктивностью свыше 10 тыс. кг молока за лактацию транквилизатором аминазином за 10-15 мин. до осеменения в дозе 5 мл 2,5%-го раствора на 100 кг живой массы животного. Его применение позволяет повысить жизнеспособность эмбрионов на 13% и их приживляемость у реципиентов – на 52%.

## **7.2. Определение БАТ, отражающих состояние половых органов и уровень их активности у доноров**

Впервые в медицинской практике В.Г. Адаменко в 1969 году [290] привёл перечень функциональных параметров точек акупунктуры на теле человека, как первичного звена в нервной дуге, рецепторами воспринимающих воздействие раздражителя поступающего из внешней среды. Автор в своих исследованиях основывался на измерении в области ГА электрокожного сопротивления при помощи специальных электронных приборов. При этом доказано, что площадь пониженного электросопротивления изменяется в зависимости от состояния органа или системы органов, которые она представляет. На животных Казеевым Г.В., Варламовым Е.В., Старченковой А.В. [291, 292] установлена та же закономерность. Авторы отмечают, что при патологии половых органов биологически активная точка трансформируется в зону пониженного электрокожного сопротивления, имеющую диаметр от 5 мм и выше. При этом ими разработана и внедрена в

производство конструкция высокоточного и простого в применении ветеринарно-диагностического прибора (ВДП), для установления функционального состояния половых органов сельскохозяйственных животных в норме и при патологии. Кроме того, при его использовании удастся контролировать процесс восстановления функции органа, ориентируясь по уменьшению диаметра перехода из состояния сплошной зоны (10-40 см<sup>2</sup>) электрокожного сопротивления в ТА размером менее 5 мм. Ю.А. Горбуновым и др. [124, 125], с использованием данного прибора и последующим убоем контрольных животных установлено, что размер точек акупунктуры до 10 мм у коров и 5 мм у свиноматок следует относить к естественным изменениям в организме. Размер свыше указанных величин отражает либо смену доминантного состояния организма (роды, охота), либо патологические изменения в органах. Доказано, что путём определения активности некоторых специфических БАТ можно диагностировать функциональное состояние яичников и матки. Применение данного метода экспресс-диагностики позволяет своевременно выявить изменение функции репродуктивных органов и в последующем вести контроль за их состоянием.

Однако до настоящего времени отсутствует методика оценки физиологического состояния репродуктивных органов у высокопродуктивных коров-доноров по измерению электрического потенциала БАТ организма.

В своих исследованиях поиск точек и оценку их функционального состояния производили ветеринарно-диагностическим прибором (ВДП), согласно инструкции по применению который позволяет:

- выполнить топографический поиск точек акупунктуры;
- определить площадь точки в процессе трансформации в активную зону при функциональном напряжении органа;
- контролировать эффективность терапевтического воздействия по динамике изменения площади зоны точки;
- проводить отбор точек, отражающих функцию конкретных органов организма животных.

Прибор состоит из электронного блока управления (1), аккумулятора с подзарядным устройством и переносными: электродом-щупом (2) и пассивным стационарным (фиксирующимся на корне хвоста животного) электродом (3) (рис. 18).



Рисунок 18 – Ветеринарно-диагностический прибор

Поиск ТА обеспечивается путём регистрации разности потенциалов между искомой точкой и окружающей её поверхностью тела. Выполняется путём перемещения щупа в участке предполагаемого расположения точки (согласно атласа по акупунктуре: Ю.А. Горбунов и др.) [124, 125]. При попадании одного из электродов в место ее нахождения загорается индикаторная лампочка и отклоняется стрелка прибора. Перемещение электрода в разных направлениях позволяет определить степень трансформации ТА в зону пониженного электрокожного сопротивления. По результатам измерения можно судить о степени функционального напряжения изучаемого органа, который она представляет, а также результативности опосредованного акупунктурного воздействия на него. При постепенном снижении стимулирующего эффекта на конкретный орган площадь зоны точки будет уменьшаться. По показателю пониженного сопротивления и феномену трансформации ТА в зону и производился подбор ТА в рецепты.

Используя ветеринарно-диагностический прибор, было установлено, что размер точек акупунктуры при определённых физиологических состояниях организма животных изменяется. Так, во время отдыха размер БАТ колебался от 3 до 5 мм. Физическая нагрузка, например, при перегоне животных из животноводческого помещения на пастбище расположенном на расстоянии 1,5 км, способствовала увеличению отдельных из них до 7-10 мм. Это указывает на то, что ТА способны изменять свой размер не только при заболеваниях, но и при клинически здоровом состоянии организма, в связи с физической нагрузкой.

С целью изучения степени активности БАТ, связанных с половой сферой животных, было сформировано и обследовано 5 групп коров-доноров (4 опытных и 1 контрольная) по 32 головы в каждой. У животных опытных групп изучали их следующее физиологическое состояние: за 20 дней до отела (2 группа), в день отела (3 группа), 20 дней после отела (4 группа), перед извлечением эмбрионов (5 группа); у контрольных в 60 дней после отела. Поиск БАТ проводили ветеринарно-диагностическим прибором. Выполняли его путем перемещения щупа переносного электрода ВДП в участке предполагаемого расположения БАТ. Стационарный электрод, при помощи специального металлического зажима, фиксировали у животного на корне хвоста. При попадании щупа активного электрода в зону точки загорается индикаторная лампочка и отклоняется стрелка прибора. Перемещение электрода в разных направлениях позволяет определить площадь зоны точки.

Результаты исследований, направленных на выявление БАТ, связанных с физиологическим состоянием половых органов коров, представлены в таблице 25.

Установлено, что за 20 дней до отела у коров потенциальных доноров эмбрионов 2-й опытной группы активизируется часть БАТ. По мере приближения ко времени предстоящих родов активизация точек в среднем зарегистрирована в 22-х пунктах на теле животного, что составляет 38 % от числа исследованных. При этом максимальная их активность определяется размером 49 мм, а минимальная – 24 мм (в среднем 33 мм).

У животных, потенциальных доноров эмбрионов 3-й опытной группы, в день отела наблюдается наибольшее количество активных точек – 57, размер которых колеблется в пределах от 53 до 196 мм (в среднем 78 мм), что указывает на значительную физиологическую нагрузку на половые органы самки.

Таблица 25 – Количество БАТ, отражающих состояние половых органов, и уровень их активности, при различном физиологическом состоянии коров

Группы	Физиологическое состояние коров	Всего коров	Число исследований ТА у каждого жив-го	Обнаружено активных точек	Размер БАТ, мм	
				п/%	колебания	в среднем
1	Контрольная (60 дн. после отела)	32	57	16±4,23 / 28	4-16	9±1,02
2	Опытная (20 дней до отела)	32	57	22±4,70 / 38	24-49	33±10,02**
3	Опытная (в день отела)	32	57	57±5,34* / 100	153-196	119±17,57***
4	Опытная (20 дн. после отела)	32	57	19±4,53 / 33	16-53	44±11,39**
5	Опытная (перед извлечением эмбрионов)	32	57	54±5,75* / 95	84-122	97±13,54***

В послеродовой период (4 группа) число БАТ у животных снижается до 19 мм, при установленных колебаниях в размерах от 16 до 53 мм и средней величины размера – 44 мм.

Различное их количество отражает индивидуальные особенности инволюционных процессов в половых органах самок. Чем быстрее заканчивается их инволюция, тем большее количество точек акупунктуры (ТА) снижают свою активность.

Значительное увеличение в пределах от 84 до 122 мм в диаметре у коров-доноров (в среднем 97 мм) обусловлено существенной функциональной нагрузкой на яичники в результате образования множественных желтых тел и фолликулов (от 5 до 17). Это нашло существенное влияние на БАТ, отражающих функцию яичников и матки. При этом обнаружены 54 активные точки (95% от исследованных), средним диаметром распростра-

нения в зону от 84 до 122 мм. Это подтверждается множественным ростом желтых тел на месте разорвавшихся фолликулов.

Наиболее низкая активность распространения ТА в зону пониженного электрокожного сопротивления наблюдается у животных 4-й контрольной группы в период через 2 месяца после отела.

Таким образом выявлено, что существуют статистически достоверные различия между функциональной активностью половых органов и размером ТА, которые они отражают. Чем выше функциональная нагрузка на них, тем ниже становится электрокожное сопротивление и увеличивается размер БАТ. В случаях наступления родов, а также индукции полиовуляции и других изменений в половых органах коров-доноров, БАТ трансформируются в зону пониженного электрокожного сопротивления, имеющую диаметр свыше 10 мм. Таким образом, размер свыше указанной величины отражает смену доминантного состояния организма коров с продуктивностью не ниже 8 тыс. кг молока за лактацию и потенциально относящихся к группе доноров эмбрионов.

Из выше изложенного следует, что по измерению электрокожных параметров отдельных БАТ прибором ВДП, можно судить о локализации функциональной нагрузки на половые органы, или при изменении их функционального состояния (роды, полиовуляция, охота и др.). При этом показатель трансформации БАТ в зону пониженного электрокожного сопротивления (диаметр от 10 мм и выше) считается определяющим при постановке диагноза о существенном увеличении функциональной нагрузки на половые органы.

В результате исследований установлено, что параметры распространения точек в зону наибольшей активности имеют общую тенденцию на увеличение при разной форме функциональных изменений в репродуктивных органах по сравнению с животными контрольной группы, где половые органы минимально активны (9 мм).

Анализ результатов исследований различных авторов в области трансплантации эмбрионов, опубликованных в литерату-

ре, свидетельствует о разной степени вариабельности показателей биологической полноценности полученных эмбрионов. В ряде случаев приживляемость их может достигать 70%, от числа пересаженных реципиенту, но может не превышать и 25%. При этом зародыши, получаемые от здоровых высокопродуктивных коров, не имеющих функциональных расстройств половых органов, характеризуются разной степенью приживляемости. Имеются случаи, когда они после извлечения были оценены по морфологическим признакам (5-ти балльная шкала) как хорошие и отличные, однако, после пересадки реципиентам приживляемость их оставалась низкой [293, 101]. В этой связи отмечается значение опыта специалиста осуществляющего отбор доноров, а также проводящего морфологическую оценку качества эмбрионов, получаемых от них.

Даже незначительные ошибки в оценке функционального состояния яичников оказывают негативное влияние на результаты индукции охоты и полиовуляции, а также на оплодотворяемость яйцеклеток и качество эмбрионов у высокопродуктивных коров-доноров. Даже при достижении 100 % положительной реакции полиовуляции, качество половины полученных эмбрионов может оказаться неудовлетворительным. В целом лишь 39% извлекаемых эмбрионов у высокопродуктивных коров-доноров, являются нормально развитыми, 23% имеют существенные морфологические отклонения, 38% – дегенеративные нарушения.

В начальных исследованиях важно было установить степень влияния акупунктурного воздействия на коров с гипофункциональным состоянием яичников. Данное нарушение репродуктивной функции отмечается у большинства высокопродуктивных коров в первые месяцы после отела.

Для стимуляции охоты на 19 коров опытной группы, с наличием у них гипофункции яичников, перед инъекцией агофоллина, воздействовали иглоукалыванием на точку, расположенную на дорсомедиальной линии тела в углублении между остистым отростком последнего поясничного позвонка и первым крестцовым. Иглоукалывание проводили на глубину 30 мм вер-

тикально. Для этого использовали тонкие одноразовые медицинские инъекционные иглы. Место введения иглы дезинфицировали, если шерстный покров был загрязнён – на этом месте шерсть выстригали. Иглу диаметром 0,4-0,5 мм, длиной 4,5 см вводили толчковым движением. Продолжительность её экспозиции составляла 20 минут. После введения выполняли 2 непродолжительные манипуляции с иглами которые включали: вначале вращательные (2-3 вращения против часовой стрелки), затем колебательные – постукивания по головке иглы лёгким щелчком. Извлечение производили путём лёгкого вращения в обе стороны, придерживая пальцами окружающую ткань. Обработка осуществлялась трёхкратно, с интервалом между иглоукалываниями – 24 часа. На 4-й день после первой обработки инъецировали 3 мл агофоллина. Коровам контрольной группы акупунктурная обработка не проводилась. Животным инъецировали лишь агофоллин в дозе 3 мл внутримышечно (табл. 26).

Таблица 26 – Результаты акупунктурно-гормональной стимуляции охоты у коров с гипофункцией яичников

Показатели	Ед. изм.	Группы	
		1 контрольная (агофоллин)	2 опытная (АП + агофоллин)
Обработано коров	п	19	19
Период от отела до стимуляции охоты у коров	дн.	41	41
из них проявило охоту через 30 дней после инъекции препарата	п / %	13 / 68	17 / 89
из них в период от стимуляции до проявления первой охоты	дн.	19,7 ± 0,96	14,5 ± 0,89**
Период от отёла до проявления первой охоты	дн.	60,7 ± 1,78	55,5 ± 1,63*

Установлено, что в опытной группе, после сочетанного воздействия на организм иглоукалыванием и инъецированием гормона, проявили клинические признаки охоты 89% животных. За 30-ти дневный срок в группе контрольных животных охоту проявили 68% коров – потенциальных доноров эмбрионов.

Период от окончания обработки до проявления 1 охоты между группами также различался. Наиболее продолжительным он был в 1 группе, в то время как во 2-й на 5,2 дня короче (19,7

против 14,5;  $P < 0,01$ ). Указанная тенденция отразилась и на показателе, характеризующем продолжительность периода от отела до проявления первой охоты, который считается одним из наиболее важных при характеристике функционального состояния коров для перевода в донорское стадо. Установлено достоверное снижение данного показателя у коров опытной группы на 5,2 дня ( $P < 0,05$ ), соответственно 55,5 против 60,7 дня. Следовательно, лучшие результаты стимуляции половой охоты получены при сочетанном воздействии акупунктурного иглоукалывания, в первые 3 дня, и последующего (на 4-й день) инъектирования агофоллина при гипофункции яичников у коров потенциальных доноров эмбрионов.

Агофоллин (Estradioli dipropionas: 1 мг в 1 мл) относится к группе эстрогенов. Эстрогены имеют различное физиологическое действие, в первую очередь на половой аппарат самки: стимулируют развитие фолликулов в яичниках, повышают приток крови к половым органам, способствуют пролиферации эндометрия и образованию слизи маточных желез, тонизируют миометрий, вызывают внешние признаки течки. Агофоллин стимулирует через гипоталамус образование и освобождение фолликулостимулирующего гормона передней доли гипофиза. Показания: функциональные нарушения в яичниках и, в первую очередь, овариальная ацикличность. Дозировка на 1 голову: 0,5-5 мл (в зависимости от живой массы животного).

Известно, что основным индуцирующим механизмом биологического воздействия на БАТ является высвобождение биологически активных веществ и последующее воздействие их через экстрорецепторы кожи на интерорецепторы сосудов и нервов. Поэтому подбор точек акупунктуры в рецепты, для стимулирующего воздействия на половые органы коров-доноров с гипофункцией яичников, является элементом нейрогуморальной регуляции их функции. Применение дополнительной акупунктурной обработки позволяет активизировать рост и развитие в гонадах фолликулов, и их своевременную овуляцию, посредством активизации поступления в периферическую кровь животного необходимого количества гормонов гипофиза (ФСГ и ЛГ).

При воздействии раздражителем на БАТ развивается очаговое полнокровие сосудов микроциркулярного русла, усиливается тургор тканей и восстанавливаются трофические процессы в яичнике. В целом происходит интенсивное восстановление функциональной деятельности гонад, поскольку соматосенсорные импульсы блокируют висцеральные, после чего изменяется общий тонус и возбудимость нервных центров. И только после такой блокады впоследствии нейрон способен давать эфферентную импульсацию, характерную для условий нормального функционирования яичников.

Полученные экспериментальные данные показывают, что способ сочетанной стимуляции охоты у коров с гипофункцией яичников оказывает влияние на сокращение срока проявления животными клинических признаков 1-ой охоты по сравнению с контрольной группой. Если учесть, что обработку всех коров потенциальных доноров эмбрионов опытной и контрольной групп начали на 41 день после отёла, то следует, что данный метод стимуляции может быть использован для дополнительной активизации функции яичников у коров-доноров.

Указанное различие можно объяснить дополнительным рефлекторным стимулирующим воздействием акупунктурного иглоукалывания на гипоталамо-гипофизарную систему, в частности переднюю долю гипофиза, что активизирует рост и развитие фолликулов, посредством активного поступления в периферическую кровь коровы-донора необходимого количества гормона гипофиза (ФСГ).

В дальнейших исследованиях, с использованием животных этих же групп ставилась задача установить реакцию полиовуляции у коров-доноров опытной и контрольной групп, после нормализации функции яичников. Результаты исследований представлены в табл. 27.

Установлено, что дополнительное проведение акупунктурной обработки коров доноров (перед применением стандартного ФСГ-супер), способствовало увеличению числа овуляций, в расчёте на 1 положительного (на реакцию полиовуляции) донора, на 2,4 (9,5 против 7,1;  $P < 0,05$ ).

Таблица 27 – Индукция полиовуляции у коров-доноров после нормализации функции яичников

Показатели	Ед. изм.	Группы	
		1 контрольная, традиционная обработка (ФСГ-супер)	2 опытная, АП + ФСГ-супер
Обработано коров	п	15	15
Реагировало полиовуляцией доноров	п/%	13/87	13/87
Ректально установлено на 1 гол.: жёлтых тел	п	7,1±0,79	9,5±0,91*
ановуляторное состояние яичников	п	0,8 ± 0,013	0,3 ± 0,013**
Выход эмбрионов всего на 1 гол. в т.ч. пригодных для трансплантации	п/±п /%	4,5±0,68 3,7 ± 0,53/82	6,6±0,74* 5,3 ± 0,61*/80

Одновременно отмечено снижение числа случаев ановуляторного состояния яичников у животных опытной группы, по сравнению с контрольной – на 0,5 (P<0,01).

При обработке коров-доноров 2 опытной группы достигнут более высокий стимулирующий эффект не только на рост и развитие фолликулов, но также на выход эмбрионов (+2,1), в том числе и пригодных к пересадке на 1,6 (соответственно 5,3 против 3,7).

Метод акупунктурно-гормональной индукции полиовуляции коров опытной группы включает следующие параметры: лазерное воздействие на БАТ частотой импульсов лазерного излучения: на 1 этапе – 512 Гц и на 2 этапе 4096 Гц + иглоукальвание; курсом 6 дней по 3 дня для каждого из этапов; экспозиция для лазерной обработки – 1,5 минуты, а для акупунктурного иглоукальвания 15 минут.

Задачей исследований также было изучение состояния половых органов у доноров в период охоты, с целью определения оптимального времени для искусственного осеменения после применения акупунктурно-гормональной стимуляции полиовуляции.

Одним из объективных показателей характеризующих функциональное состояние репродуктивных органов у коров-доноров, является изменение физико-биологических показателей точковой слизи. Коэффициент рефракции цервикальной слизи во время охоты определяли с помощью рефрактометра марки ИРФ-

22 по методике Горбунова Ю.А. и др. [123]. При изучении глубины проникновения сперматозоидов в цервикальную течковую слизь использовали стеклянные капилляры (E.T.-Pipetten 202010 (Германия) промышленного изготовления, длиной 75 мм и внутренним сечением 0,3 мм. После размораживания пайеты со спермой её конец соединяли с концом капилляра, совмещая содержимое обеих полостей образованного таким образом нового устройства. Заполнение их течковой слизью осуществлялось отдельно для каждого животного.

Её получали у коров в охоте при помощи «отсекателя», представляющего собой трубчатую силиконовую насадку, закрепленную на конце стандартной полистероловой пипетки. На её другую сторону присоединяли шприц. Устройство удобно для быстрого отбора необходимого количества течковой слизи из шейки матки, основанного на ректальном контроле места введения насадки.

С использованием микроскопа OLYMPUS SZ61, устанавливали расстояние, на которое спермии продвинулись за 20 минут (по самому дальнему сперматозоиду), с момента соединения концов капилляра и размороженной спермы находящейся в пайете.

При этом установлено, что сочетанное воздействие на организм животных лазеропунктурой и иглоукальванием в вышеуказанном режиме оказало определенное влияние на изменение физико-биологических показателей течковой слизи у коров в период проявления половой охоты (перед осеменением) (табл. 28).

Таблица 28 – Влияние акупунктурного воздействия на БАТ организма коров-доноров в связи с физико-биологическими показателями течковой слизи

Показатели	Ед. измер.	Группы	
		1 контрольная n = 13	2 опытная n = 13
Коэффициент рефракции течковой слизи перед осеменением	пД	1,3485±0,00118	1,3356±0,00061**
Показатель проникновения спермиев в течковой слизи	мм	41,9±3,68	67,1±3,86***

Данные таблицы указывают, что у животных 2 опытной группы, после их предварительной акупунктурной обработки наблюдалось достоверное снижение коэффициента рефракции

(nД) слизи, взятой перед осеменением у коров-доноров. Различие составило соответственно 0,0129 (1,3485 против 1,3356;  $P < 0,001$ ).

Также и по показателю глубины проникновения спермиев в течковой слизи высоко достоверные различия установлены в опытной группе, где показатель был выше на 25 мм (67,1 против 41,9 мм;  $P < 0,001$ ).

Таким образом, после обработки коров-доноров 2 опытной группы лазером, с частотой импульсов излучения 512 Гц на первом этапе и 4096 Гц + иглоукальвание – на втором, был достигнут оптимальный для оплодотворяющей способности спермиев коэффициент рефракции течковой слизи взятой перед осеменением, а также показатель проникновения в ней. Выявленные объективные параметры свойств течковой слизи, при осеменении коров-доноров в индуцированную охоту, могут служить объективным показателем установления оптимального времени для искусственного осеменения, которое было более характерно для разработанного режима акупунктурного воздействия на БАТ: частотой импульсов лазерного излучения: на 1 этапе – 512 Гц и на 2 этапе 4096 Гц + иглоукальвание; курсом 6 дней по 3 дня для каждого из этапов; экспозиция для лазерной обработки – 1,5 минуты, а для акупунктурного иглоукальвания 15 минут.

Данные о степени влияния акупунктурного воздействия на качество эмбриопродукции приведены в таблице 29.

При определении связи между акупунктурным воздействием на БАТ коров-доноров и выходом эмбрионов было установлено, что в опытной группе их количество было на 28 больше, чем в контрольной группе (86 против 58).

Из них отличного и хорошего качества в 1 группе было 37 (63,8%), в то время как во второй 55 (63,9%).

По количеству извлеченных эмбрионов удовлетворительно качества различия были в пользу контрольной группы и составили 3 эмбриона (11 против 14).

При этом не было выявлено достоверных различий между 1 контрольной и 2 опытной группами, по показателю извлечения

зародышей непригодных для пересадки реципиентам (17,2 против 19,8%).

Таблица 29 – Показатель качества эмбриопродукции в связи с дополнительной акупунктурной обработкой коров-доноров, после нормализации функции яичников

Показатели качества эмбрионов	Ед. изм.	Группы			
		1 контрольная, n=13 (ФСГ-супер)		2 опытная, n=13 (АП + ФСГ-супер)	
		Количество эмбрионов, n	%	Количество эмбрионов, n	%
Отличного	n	16	27,6	25	29,0
Хорошего	n	21	36,2	30	34,9
Удовлетворительного	n	11	19,0	14	16,3
Непригодные	n	10	17,2	17	19,8
Всего	n	58	100	86	100
Из них пригодных для трансплантации (на 1 донора)	n	3,7±0,53	-	5,3±0,61*	-

Установлено, что акупунктурное воздействие, на БАТ проведенное непосредственно перед инъекционным курсом индукции полиовуляции ФСГ-супер, способствует получению дополнительно 1,6 эмбриона (5,3 против 3,7;  $P < 0,05$ ) пригодных для трансплантации, по сравнению с традиционным методом. При этом качественные показатели, характеризующие пригодность эмбрионов к трансплантации, оставались без изменений, на что указывают данные по их процентному соотношению.

Одной из задач исследований было изучение влияния акупунктурно-гормонального (А+Г) воздействия на способность эмбрионов к криоконсервации.

Для этого, после извлечения все зародыши пригодные для трансплантации на стадиях морулы и бластоцисты (отличного и хорошего качества) были отобраны для замораживания. Количество эмбрионов полученных с использованием традиционного метода трансплантации составило – 37 и акупунктурного метода – 55, делили на аналогичные группы, и использовали для криоконсервации. Таким образом, сформировано две группы эмбрионов: опытная (n=55) и контрольная (n=37), однородные по качественному составу и морфологической оценке.

Опытный эмбриоматериал обеих групп был заморожен методом витрификации без программного замораживателя. В процессе опыта оттаяно и пересажено реципиентам по 19 эмбрионов из каждой группы. Животные реципиенты находились в равных условиях кормления и содержания (табл. 30).

Таблица 30 – Результаты криоконсервации эмбрионов полученных различными методами вызывания полиовуляции и их приживляемость при трансплантации

Показатели	Группы эмбрионов	
	1 – контрольная без А+Г обработки	2 – опытная с А+Г обработкой
Заморожено эмбрионов, п	37	55
Оттаяно эмбрионов, п	19	19
Сохранность, п - %	16 – 84,2	15 – 78,9
Сделано пересадок, п	16	15
Стельных реципиентов, гол. / %	7- 43,7	6- 40,0
Получено телят, гол.	7	6

В процессе проведения исследований установлено, что после оттаивания количество пригодных для трансплантации эмбрионов было выше у животных контрольной группы на 5,3 п.п. (84,2 против 78,9). После пересадки реципиентам замороженно-оттаянных эмбрионов показатель их приживляемости составил в опытной и контрольной группах, в зависимости от использованного метода индукции полиовуляции, соответственно 78,9 и 84,2%. При проведении отелов у всех коров-реципиентов родился хорошо развитый, жизнеспособный молодняк, как в опытной (6 голов или 40,0%), так и в контрольной (7 голов или 43,7%) группах.

Если учитывать тот факт, что результативность криоконсервации в обеих группах существенно не различалась, можно сделать заключение о достаточно высокой биологической полноценности эмбрионов, полученных с использованием сочетанного акупунктурно-гормонального метода стимуляции полиовуляции.

Следовательно, эмбриопродукция полученная дополнительным использованием немедикаментозного метода акупунктурного воздействия на организм коров-доноров при индукции полиовуляции, может быть использована для криоконсервации и

длительного хранения в условиях работы центров по трансплантации эмбрионов.

На основании проведённых исследований впервые изучена эффективность применения комплексной объективной оценки репродуктивной функции у животных, которая предусматривает измерение физико-биологических показателей течковой слизи у коров-доноров в период охоты. Установлено что, акупунктурное воздействие на БАТ организма коров-доноров, отражающих функцию половых органов, проведенное перед курсом гормональной стимуляции полиовуляции, способствует дополнительному выходу 21 эмбриона (69 против 48) пригодных для пересадки животным реципиентам с целью получения ценных генотипов. При этом все этапы акупунктурного воздействия осуществляют последовательно: первый этап проводят с 5 по 7, а второй с 8 по 10 дни после наступления охоты, то есть непосредственно перед курсом гормональной обработки коров-доноров, который осуществляется с 10 дня полового цикла.

Данный метод акупунктурного воздействия предусматривает предварительную оценку функции половых органов у доноров при помощи прибора ВДП.

В дальнейших исследованиях важно было определить влияние падения уровня лактации у коров, до 4,6-6,2 тыс. кг молока на показатели полиовуляции, свойства течковой слизи и качество эмбрионов. Для этого было сформировано две группы животных аналогов по возрасту, живой массе и физиологическому состоянию половых органов. В 1-ю (опытную) группу были включены коровы, имеющие высокий генетический потенциал по молочной продуктивности, однако произошли существенные снижения её уровня до 5,4 тыс. кг молока за предыдущую лактацию. Во 2-ю группу (контрольную) – имеющих оптимальный ее уровень (свыше 8 тыс. кг), по 19 голов в каждой.

Данные по результатам исследований представлены в таблице 31. Установлено, что положительно прореагировали полиовуляцией на инъекцию ФСГ-супер 84,2% коров 1-й группы и 73,7% – второй.

Таблица 31 – Показатели полиовуляции, свойств течковой слизи и качества эмбрионов в связи с уровнем продуктивности коров-доноров после нормализации функции яичников

Показатели	Ед. изм.	1 опытная: уровень лактации (5,4 тыс. кг)	2 контрольная: уровень лактации (8,7 тыс. кг)
Количество обработанных животных	гол.	19	19
Положительно прореагировало на ФСГ-супер	гол./ %	16/84,2	14/73,7
Получено всего эмбрионов и яйцеклеток / из них на 1 положительного донора	n	146 / 9,12±0,71	124 / 8,86±0,84
в том числе на донора: пригодных для пересадки	n/%	5,37±0,54/ 56,1	4,40±0,52/ 49,2
дегенерированных	n/%	2,70±0,43/ 31,6	2,71±0,46/ 30,6
яйцеклеток	n/%	1,00±0,25/ 12,3	1,79±0,37/ 20,2
Количество эмбрионов, пригодных к трансплантации, на 1 обработанного донора	n	4,53±0,47*	3,21±0,39

Процентное отношение эмбрионов и яйцеклеток на одного положительного донора составило у коров с падением уровня лактации – 9,12 против 8,86 у полноценно лактирующих. Установлено, что из 19 голов 1-й группы положительно отреагировали на гормональную обработку ФСГ-супер 16 голов (84,2%), в то время как во 2-й группе 14 голов 73,7%. Общее количество полученных эмбрионов и яйцеклеток составило 146 в 1-й группе (пониженный уровень лактации), в том числе на одного положительного донора 9,12, во 2-й группе эти показатели составили 124 и 8,86 соответственно.

На одного донора было получено пригодных эмбрионов 5,37, что составило 56,1% в 1-й группе, в то время как во 2-й – 4,40 эмбриона, т.е. 49,2%.

Таким образом, установлено достоверное различие по выходу пригодных для трансплантации эмбрионов. Показатель был выше в группе коров с пониженным уровнем продуктивности, по сравнению с животными с оптимальным уровнем лактации на 1,3 эмбриона (4,53 против 3,21 ( $P<0,05$ )).

Не установлены достоверные различия по показателю выхода эмбрионов в расчёте на 1 положительного донора.

Здесь различия по числу пригодных эмбрионов между группами (соответственно 56,1 против 49,2%) некоторые различия установлены в пользу коров с падением уровня молочной продуктивности. Однако по количеству извлечённых неоплодотворённых яйцеклеток, наоборот, показатель был меньше в 1 группе, чем во 2 (12,3% против 20,2).

Нами изучено влияние уровня молочной продуктивности коров-доноров на реакцию полиовуляции, свойства течковой слизи во время охоты и выход эмбрионов пригодных для трансплантации. Для этого было сформировано 2 группы, опытная и контрольная, со следующим уровнем молочной продуктивности: 2-я (опытная) от 8,7 тыс. кг; 1-я (контрольная) 9,8 тыс. кг молока за лактацию. Результаты приведены в таблице 32.

Таблица 32 – Реакция полиовуляции, свойства течковой слизи и выход эмбрионов в связи с уровнем молочной продуктивности коров-доноров

Показатели	Ед. изм.	Группы	
		1 контрольная	2 опытная
Количество животных, обработанных ФСГ-супер	гол.	16	22
Положительно прореагировало на полиовуляцию	гол./ %	12/75,0	18/82,8
Показатель рефракции течковой слизи перед осеменением	пД	1,3391± 0,00220	1,3374± 0,00213*
Показатель глубины проникновения сперматозоидов в течковую слизь	мм	53,43± 4,76	65,72± 5,21**
Получено эмбрионов и яйцеклеток, всего:	n	85	165
в т. ч. пригодных к пересадке	n	42	87
Получено яйцеклеток и эмбрионов на 1 положительного донора	n	7,08±0,74	9,17±0,67*
В том числе: эмбрионов, пригодных к пересадке	n/%	3,50±0,39 /49	4,83±0,51*/ 53
дегенерированных	n/%	2,73±0,45/ 39	2,59± 0,40/ 28
яйцеклеток	n/%	0,85±0,29/ 12	1,75±0,33*/ 19
Среднее количество эмбрионов, пригодных к трансплантации, на 1 обработанного донора	n	2,62±0,43	3,95±0,41*

Установлено, что при увеличении молочной продуктивности наблюдается тенденция к снижению числа овуляций в расчёте на 1 положительно прореагировавшего на обработку донора. Так, при удое 8,7 тыс. кг молока за лактацию положительно реагировало полиовуляцией 82,8% доноров, а при 9,8 тыс. кг – 75,0%. При этом обнаружены достоверные различия между животными обеих групп по показателям рефракции и глубины проникновения сперматозоидов в точковой слизи перед осеменением коров-доноров.

Если во 2 группе показатель рефракции перед осеменением составлял 1,3374, то в 1-й, у высокопродуктивных коров, он был выше на 0,0017 и достигал средней величины 1,3391 ( $P < 0,05$ ). Обратная тенденция установлена и по показателю глубины проникновения спермиев в точковой слизи, где различие составило 12,29 мм (соответственно 53,43 против 65,72 мм;  $P < 0,01$ ).

В расчёте на 1 положительного по извлечению донора с повышением удоев достоверно снижается число яйцеклеток и эмбрионов. Если при удое 8,7 тыс. кг молока данный показатель составлял 9,17 эмбрионов, то при 9,8, лишь 7,08 ( $P < 0,05$ ). Одновременно выявлено, что при более высоком показателе извлечения пригодных к трансплантации эмбрионов у животных второй группы (53%) показатель пригодных к трансплантации эмбрионов составлял 4,83 в расчёте на 1 голову у коров более продуктивных (1 группа) он не превышал 49%, и составил лишь 3,50 зародыша в расчёте на одного донора, различие статистически достоверное и составляет 1,33 ( $P < 0,05$ ). Также следует отметить достоверно более высокий показатель во 2-й группе по количеству неоплодотворённых яйцеклеток ( $n=1,7$ ), в то время как в 1-й контрольной группе этот показатель составил 0,85%.

Таким образом, молочная продуктивность доноров 1-й контрольной группы, находящаяся на уровне 9,8 тыс. кг молока за лактацию, влияет на снижение уровня реакции полиовуляции на 7,8% по сравнению с 1 опытной группой (75,0% против 82,8%). Достоверно изменяются при этом и физико-биологические показатели точковой слизи во время осеменения, характеризующие готовность репродуктивных органов коров-доноров к зачатию.

Вместе с тем, установлено аналогичное снижение числа неплодотворённых яйцеклеток у животных 1 группы на 7% по сравнению со 2-й группой (соответственно 12 против 19;  $P < 0,05$ ). Среднее количество эмбрионов пригодных к пересадке в расчёте на обработанного донора также оказалось достоверно ниже по группе животных с максимальным уровнем продуктивности. Показатели соответственно составили: 2,62 эмбриона в контрольной группе против 3,95 в опытной ( $P < 0,05$ ).

Следовательно, молочная продуктивность коров-доноров эмбрионов на уровне 9,8 тыс. кг молока за лактацию, даже при сбалансированном кормлении, способствует снижению на 1,33 единицы количества полноценных эмбрионов (3,50 против 4,83;  $P < 0,05$ ).

Таким образом, подтверждено наличие и установлен уровень статистически достоверных различий между степенью функциональной активности половых органов и размерами ТА. Чем выше функциональная нагрузка на них, тем ниже становится электрокожное сопротивление и увеличивается размер БАТ, измеряемый прибором ВДП. Показатель трансформации БАТ в зону пониженного сопротивления, имеющую диаметр от 10 мм и выше считается определяющим при постановке диагноза об изменении их функциональной нагрузки.

Лучшие результаты стимуляции половой охоты при гипофункции яичников у коров потенциальных доноров эмбрионов можно получить при сочетанном воздействии акупунктурного иглоукальвания, проведенного в первые 3 дня и последующего (на 4-й день) инъектирования агофоллина в дозе 3 мл. При этом проявляют охоту за 30 дней от начала обработки на 21% животных больше. Период от стимуляции до проявления первой охоты сокращается на 5,2 дня.

Индукция полиовуляции у коров-доноров акупунктурно-гормональным методом по специальной схеме, способствует активизации роста и овуляции дополнительного количества фолликулов, что позволило увеличить число овуляций в расчете на 1 положительного донора на 2,4 (9,5 против 7,1;  $P < 0,01$ ) при

одновременном снижении случаев ановуляторного состояния фолликулов на 0,5 ( $P < 0,01$ ).

Положительное воздействие на организм коров-доноров магнито-инфракрасно-лазерным излучением и иглоукальванием, также доказано посредством измерения физико-биологических свойств течковой слизи. При этом достигнуты оптимальные для оплодотворяющей способности спермиев показатели: коэффициента рефракции течковой слизи ( $n_D=1,3356$ ), а также глубины проникновения в неё (67,1 мм).

Выявленные параметры свойств течковой слизи, могут служить объективным показателем, характеризующим уровень изменения функции половых органов непосредственно перед искусственным осеменением доноров, которое считается фактором благоприятствующим увеличению выхода пригодных для трансплантации эмбрионов.

Акупунктурное воздействие на БАТ способствует получению дополнительно на 1 донора 1,6 ( $P < 0,05$ ) эмбриона пригодного для трансплантации.

Эмбриопродукция, полученная с использованием акупунктурного воздействия на организм доноров при полиовуляции пригодна для криоконсервации с применением процесса витрификации.

Установлено достоверное различие по выходу пригодной для трансплантации эмбриопродукции в расчете на одно обработанное животное первой группы, в связи с падением уровня лактации до 4,6-6,2 тыс. кг молока на 1,3 эмбриона ( $P < 0,05$ ). При увеличении молочной продуктивности наблюдается тенденция к снижению числа овуляций на 1 положительно прореагировавшего на обработку донора (соответственно 75,0 против 82,8%). В связи с этим показатель физико-биологических свойств течковой слизи перед осеменением был достоверно выше у высокопродуктивных коров (9,1-11,5 тыс. кг молока за лактацию) по показателю рефракции (1,3391 против 1,3374;  $P < 0,05$ ), однако существенно ниже по показателю глубины проникновения спермиев в течковую слизь капилляра (соответственно 53,4 против 65,7 мм;  $P < 0,01$ ). В результате среднее количество эмбрионов при-

годных к пересадке в расчете на обработанного донора оказалось ниже по группе животных с максимальным уровнем продуктивности и составил 2,62 против 3,95 ( $P < 0,05$ ).

## **8. Способ акупунктурно-гормонального воздействия на организм коров-доноров**

Совершенствование схем индукции полиовуляции фолликулов у коров-доноров требует разработки новых методов решения этой проблемы, позволяющих получать стабильно высокие результаты по выходу качественной эмбриопродукции.

Для изучения влияния различных режимов лазеропунктурного воздействия (ЛВ) и иглоукалывания (ИУ) на 5 БАТ организма животных было сформировано 4 группы коров-доноров по 16 голов в каждой (3 опытных и 1 контрольная). Обработка проводилась согласно схеме, приведенной в таблице 33.

Таблица 33 – Схемы гормонального и акупунктурно-гормонального воздействия на организм коров-доноров при индукции полиовуляции

Группа	n	Режимы гормонального и акупунктурно-гормонального воздействия		
		ФСГ-супер (1000 ИЕ); Интенсивность лазерного воздействия, Гц + иглоукалывание	Кратность, дн.	Метод введения; экспозиция, мин.
1 контрольная	16	ФСГ-супер без акупунктурной обработки	4 дня по 2 инъекции	внутримышечно
2 опытная	16	1 этап: ЛВ - 4096	3	ЛВ-1,5
		2 этап: ЛВ - 512+ИУ	3	ЛВ-1,5 + ИУ-15
		3 этап: ФСГ-супер	4 дня по 2 инъекции	внутримышечно
3 опытная	16	1 этап: ЛВ - 512	3	ЛВ-1,5
		2 этап: ЛВ - 4096+ИУ	3	ЛВ-1,5 + ИУ-15
		3 этап: ФСГ-супер	4 дня по 2 инъекции	внутримышечно
4 опытная	16	1 этап: ЛВ - 4096	3	ЛВ-1,5
		2 этап: ЛВ - 4096+ИУ	3	ЛВ-1,5 + ИУ- 15
		3 этап: ФСГ-супер	4 дня по 2 инъекции	внутримышечно

В 1 контрольной группе предварительное воздействие раздражителями (лазерное излучение, иглоукалывание и др.) на БАТ

коров – доноров не проводилось. Во 2 группе использовали комплексное воздействие лазерным излучением и иглоукальванием на 5 БАТ, отражающих функцию половых органов (рис. 19,20).

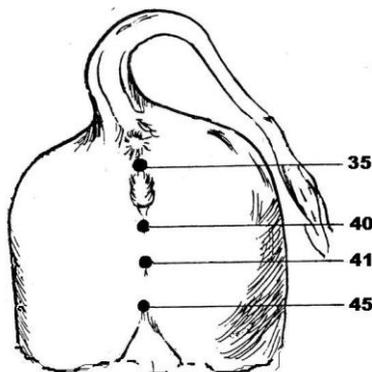


Рисунок 19 - Миотопическое расположение БАТ, вид сзади

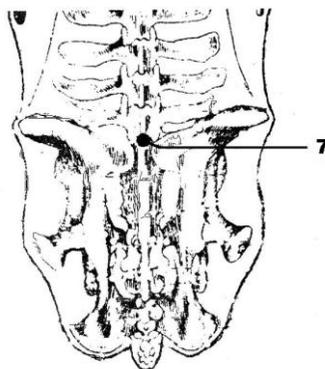


Рисунок 20 – Остеотопическое расположение БАТ, вид сверху

В опытных группах использовали дополнительное комплексное воздействие лазерным излучением на БАТ отражающих функцию яичников и матки № 35, 40, 41 и 45 которые расположены:

№ 35 – на медиальной линии тела между анусом и вульвой (середина промежности);

№ 40 – на медиальной линии тела на расстоянии 2-х поперечников пальцев под вульвой;

№ 41 – на медиальной линии тела на расстоянии 6-ти поперечников пальцев под вульвой;

№ 45 – на медиальной линии тела, на вершукше углового контура молочного зеркала.

Иглоукальвание проводили в БАТ № 7, которая отражает функцию яичников и располагается на дорсомедиальной линии тела в углублении между остистым отростком последнего поясничного позвонка и первым крестцовым позвонком. Воздейст-

вие на неё вызывает ответную реакцию организма в пределах одного сегментарного или нескольких вегетативных метамеров. Физиологическая связь этой точки с яичниками осуществляется через нервные волокна каудально-брыжеечного симпатического ганглия, формирующего нервные сплетения вокруг яичниковой и краниальной маточной артерии.

Для проведения процедуры иглоукальвания использовались тонкие одноразовые медицинские инъекционные иглы. Иглу вводили на глубину 20-30 мм вертикально (рис. 21).



Рисунок 21 – Иглоукальвание в БАТ № 7

Продолжительность процедуры иглоукальвания составляла 15 минут. Через 5 и 10 минут проводилось одномоментное легкое вращательное или вертикальное колебательное движение введенной иглы. Извлечение их выполняли путем одновременного легкого вращения при фиксации пальцами прилегающей ткани.

Воздействие магнита-инфракрасным лазером на 4 биологически активные точки осуществляется аппаратом “МИЛТА-МВ” (Россия) (рис. 22).

Магнита-инфракрасно-лазерный терапевтический аппарат МИЛТА-МВ состоит из портативного переносного электронного

устройства в пластмассовом корпусе с двумя штатными излучателями (терминалами).



Рисунок 22 – Магнита-инфракрасно-лазерный терапевтический аппарат МИЛТА-МВ

В аппарате корпус с излучателями и зарядными устройствами размещен в специальном футляре с наплечным и поясным ремнями. Воздействие на животное осуществляется одновременно четырьмя физическими факторами: низкоинтенсивным лазерным излучением, пульсирующим инфракрасным, пульсирующим красным и постоянным магнитным полем (рис.23).



Рисунок 23 – Магнита-инфракрасно-лазерное воздействие на БАТ № 35

На первом этапе ежедневно в течение 3 дней осуществляли воздействие лучем лазера на точки № 35 и № 40, указанные на рисунке 22, с экспозицией 1,5 минуты и интенсивностью по группам: 2-я опытная – 4096; 3-я – 512 и 4-я – 4096 Гц. На втором этапе проводили иглоукалывание в вышеуказанном режиме на точку № 7 (рис. 23), а также на две точки № 41 и № 45 лазером экспозицией по 1,5 минуты. Интенсивность воздействия по группам: 2-я – 512; 3-я – 4096 и 4-я – 4096 Гц.

Все этапы акупунктурной обработки осуществляли последовательно: первый этап – в период с 5 по 7, а второй – с 8 по 10 дни после установления клинических признаков охоты, непосредственно перед курсом гормональной индукции полиовуляции у коров-доноров.

Коров-доноров осеменяли ректо-цервикальным способом трижды с интервалом 10-12 часов дозой замороженно-оттаянной спермы с активностью не ниже 4 баллов. Контроль реакции яичниковое, нехирургическое извлечение зародышей, оценку их качества и пересадку реципиентам проводили согласно методическим рекомендациям [120].

При проведении исследований учитывали следующие показатели: реакция полиовуляции по количеству желтых тел в яичниках в расчете на донора, выход эмбрионов, пригодных для трансплантации, а также дегенерированных зародышей, яйцеклеток и количество ановуляторных фолликулов.

Гормональную стимуляцию полиовуляции у доноров вызывали гипофизарным гормоном ФСГ-супер (Россия) в дозе 50 ЕД по Арморовскому стандарту (1000 ИЕ). Просольвин в дозе 3 мл вводили на 13 день цикла, что обеспечивало осуществление синхронного процесса овуляции всех имеющихся в обоих яичниках фолликулов.

Данная обработка способствует сокращению периода их полного выхода сначала в воронку яйцевода коров, а затем и в краниальный участок рога матки.

Одной из основных задач исследований было изучение степени влияния различных режимов акупунктурного воздействия

на БАТ организма коров-доноров в связи с выходом полноценных эмбрионов и их приживляемостью у реципиентов (табл. 34).

Таблица 34 – Выход эмбрионов в зависимости от режима акупунктурного воздействия

Группы	Количество прореагировавших доноров, гол / %	Получено эмбрионов и яйцеклеток на 1 реагировавшего полиовуляцией донора					
		всего, п	из них пригодных к трансплантации, п/%	в т.ч. эмбрионов и яйцеклеток / %			
				всего, п	из них пригодных для трансплантации, п/%	дегенерированных, п/%	яйцеклеток, п/%
1 контрольная n = 16	13/81	78	53/68	6,00± 0,39	4,08±0,69 / 68	0,80±0,57 / 13	1,12±0,45/ 19
2 опытная n = 16	15/94	130	78/60	8,67± 0,31***	5,20±0,72 / 60	2,04±0,43 / 24	1,43±0,47/ 16
3 опытная n = 16	13/81	121	77/64	9,31± 0,28***	5,92±0,79* / 64	2,15±0,46 / 23	1,24±0,40/ 13
4 опытная n = 16	15/94	113	69/61	7,53± 0,31**	4,60±0,68 / 61	1,60±0,60 / 21	1,33±0,44/ 18

Данные таблицы указывают, что в 1 контрольной группе получено 6,00 эмбрионов и яйцеклеток в расчете на одного реагировавшего полиовуляцией донора, в то время как во 2, 3 и 4 опытных группах соответственно на 2,67 ( $P<0,001$ ), 3,31 ( $P<0,001$ ) и 1,53 ( $P<0,01$ ) больше. Из них количество с оценкой “пригодные для трансплантации” составило: в 1 контрольной группе 68%, а во 2, 3 и 4-й опытных группах соответственно 60, 64 и 61%.

Число дегенерированных эмбрионов наоборот, в контрольной группе было меньше чем во 2 и 3 опытных группах на 14 и 11 п.п., в 4-й больше на 3 п.п..

Следовательно, из изучаемых режимов наиболее соответствует готовности организма коров-доноров к зачатию применение варианта воздействия на БАТ характерный для 3 опытной группы, который обеспечивает дополнительный выход 1,84 пригодных для трансплантации эмбриона в расчете на одного донора ( $P<0,05$ ).

Результаты изучения показателей рефракции и глубины проникновения спермиев в точковой слизи, взятой у коров-доноров перед осеменением, в связи с методом стимуляции полиовуляции представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Влияние акупунктурного воздействия на изменение физико-биологических показателей точковой слизи

Показатели	Группы			
	1 контрольная n = 16	2 опытная n = 16	3 опытная n = 16	4 опытная n = 16
Коэффициент рефракции (nД) слизи перед осеменением	1,3466 ±0,00118	1,3392 ±0,00119*	1,3368 ±0,00061**	1,3445 ±0,00138
Показатель проникновения спермиев в слизи, мм	42,2±4,53	51,4±2,37	68,7±2,69***	38,4±3,94

Данные таблицы указывают, что во 2 и 3 опытных группах после обработки коров-доноров наблюдались достоверные изменения по показателю коэффициента рефракции (nД) слизи, взятой перед осеменением у коров-доноров.

Снижение nД составило по группам 0,0074 и 0,0098 (1,3466 против 1,3392 и 1,3368) соответственно (P<0,05 и P<0,01).

Также установлено, что по показателю проникновения цервикальной точковой слизи для спермиев высоко достоверные различия установлены лишь в третьей опытной группе, где показатель был выше на 27 мм (68,7 против 42,2 мм; P<0,001).

У животных четвертой опытной группы, при использовании максимального воздействия на БАТ, уровень изменения физико-биологических показателей цервикальной точковой слизи оставались близкими к контрольной группе.

Таким образом, применение оптимального режима акупунктурно-гормональной индукции полиовуляции коров-доноров (3 опытная группа), способствует дополнительному выходу 1,84 пригодных для трансплантации эмбрионов в расчете на одного донора (P<0,05).

Установлены достоверные изменения по показателю коэффициента рефракции (nД) точковой слизи, взятой перед осе-

нением у коров-доноров 2 и 3 опытных групп. Снижение пД составило по группам 0,0074 и 0,0098 (1,3466 против 1,3392 и 1,3368) соответственно ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ).

Также выявлено, что по показателю глубины проникновения цервикальной течковой слизи для спермиев высоко достоверные различия выявлены лишь в третьей опытной группе, где показатель был выше на 27 мм (68,7 против 42,2 мм;  $P < 0,001$ ).

Полученные результаты исследований позволили установить оптимальный режим гормонально-акупунктурного воздействия на организм коров-доноров, включающий применение следующих параметров: лазерное воздействие на БАТ частотой импульсов лазерного излучения: на 1 этапе – 512 Гц; на 2 этапе 4096 Гц + иглоукалывание; курсом 6 дней по 3 дня для каждого из этапов; экспозиция для лазерной обработки – 1,5 минуты, а для акупунктурного иглоукалывания 15 минут; на 3 этапе режима воздействия гормональная индукция полиовуляции ФСГ-супер, согласно традиционной схемы обработки.

### **8.1. Степень акупунктурного воздействия в связи с показателями крови и сохранностью эмбрионов**

Изучение гормонального состава крови доноров позволяет проследить динамику его изменений, происходящих в период обработки животных акупунктурным воздействием.

В связи с этим перед нами стояла задача изучить, как повлияли разработанные режимы акупунктурно-гормональной обработки на организм коров-доноров. Кровь у опытных животных брали из яремной вены, утром перед кормлением на 5, 10 и 15 дни полового цикла.

Уровни прогестерона и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в результате акупунктурно-гормональной обработки представлены в таблице 36.

При этом было установлено, что концентрация ФСГ в крови коров-доноров значительно изменяется в зависимости от периода проведения акупунктурной обработки.

Таблица 36 – Гормональный состав плазмы крови коров-доноров

Дни полового цикла	Группы животных			
	1 – контрольная n=16	2 – опытная, n=16	3 – опытная, n=16	4 – опытная, n=16
ФСГ, нг/мл				
5-й день	9,71±0,521	9,24±0,639	9,86±0,463	9,74±0,386
10-й день	12,94±0,435	13,27±0,598	13,82±0,356	13,20±0,394
15-й день	13,85±0,389	14,32±0,460	14,91±0,265*	14,08±0,434
ПРОГЕСТЕРОН, нг/мл				
5-й день	2,48±0,189	2,44±0,321	2,46±0,221	2,38±0,294
10-й день	4,58±0,232	4,64±0,473	4,73±0,243	4,46±0,295
15-й день	0,86±0,174	0,90±0,264	0,82±0,223	0,85±0,140

Так, перед началом акупунктурной обработки (5-день полового цикла) содержание фолликулостимулирующего гормона в плазме крови коров-доноров всех групп было одинаковым и находилось в пределах от 9,24 (2 группа) до 9,71-9,86 нг/мл в 1, 3 и 4 группах.

Статистически достоверный рост концентрации ФСГ установлен по группам на 15 день полового цикла, т.е. через 10 дней после начала обработки (непосредственно перед осеменением). Максимальное её значение отмечено при использовании режима обработки согласно схемы 3 опытной группы – на уровне 14,91 нг/мл ( $P<0,05$ ), а также второй опытной группы 14,32 против 13,85 нг/мл в контрольной. Следовательно, наибольшее активизирующее воздействие на рост и развитие фолликулов, в яичниках коров-доноров оказала комплексная акупунктурно-гормональная стимуляция по сравнению с традиционным вариантом применения ФСГ-супер.

Одновременно проводили исследования по содержанию гормона прогестерона у 1 контрольной, 2, 3, 4 опытных групп. При этом установлено что на 5-й день полового цикла, перед курсом гормональной и гормонально-акупунктурной обработки, показатели концентрации гормона имели одинаковый уровень и находились в пределах 2,38-2,48 нг/мл. На 10-й день указанные показатели увеличились в 2-ва раза одновременно во всех группах. Тенденция к снижению установлена при анализе концен-

трации гормонов в плазме крови коров-доноров на 15 день полового цикла.

Таким образом, можно сделать заключение, что сочетанное акупунктурно-гормональное воздействие в режимах использованных во 2 и 3 опытных группах, оказывает наибольшее влияние на организм доноров в виде повышения концентрации в периферической крови фолликулостимулирующего гормона.

Одним из объективных показателей характеризующих приспособление организма к различным воздействиям, а также течение обменных процессов в организме высокопродуктивных животных является характер морфологических и биохимических изменений показателей крови коров-доноров в результате сочетанного применения гормонально-акупунктурного воздействия на их организм.

Результаты исследований морфологических показателей крови подопытных коров-доноров приведены в таблице 37.

Таблица 37 – Морфологические показатели крови коров-доноров

Показатели	Группы			
	1 – контрольная n=16	2 – опытная, n=16	3 – опытная, n=16	4 – опытная, n=16
До обработки (5 день полового цикла)				
Эритроциты, $10^{12}/л$	6,45±0,083	6,88±0,090	6,41±0,061	6,17±0,085
Лейкоциты, $10^9/л$	8,75±0,390	8,64±0,345	8,72±0,322	8,93±0,420
Гемоглобин, г/л	103,4±0,56	101,1±1,08	105,1±0,89	104,3±0,92
После обработки (10 день полового цикла)				
Эритроциты, $10^{12}/л$	6,47±0,104	7,01±0,112	7,09±0,094	6,92±0,131
Лейкоциты, $10^9/л$	8,84±0,364	9,57±0,290	9,74±0,401	9,43±0,367
Гемоглобин, г/л	102,1±0,42	104,3±1,23	106,4±0,74	105,9±0,89

Исследованиями Казеева Г.В. и др. [291, 292] установлено, что слабый раздражитель на БАТ организма животных вызывает реакцию тренировки, действие раздражителя средней силы – реакцию активизации, а сильный раздражитель – стресс. По их мнению, приспособление к различным подобным воздействиям сказывается в первую очередь на изменение морфологического состояния крови. В наших исследованиях содержание форменных элементов крови подопытных коров-доноров находилось в пределах физиологической нормы.

Не установлено существенного изменения содержания эритроцитов и гемоглобина в крови коров-доноров после дополнительного акупунктурного воздействия на БАТ.

Среднее количество эритроцитов в крови в различных группах до обработки колебалось в пределах  $6,17-6,88 \times 10^{12}/л$ . Можно отметить некоторое увеличение содержания эритроцитов в крови в связи с акупунктурным воздействием в пределах  $6,92-7,09 \times 10^{12}/л$ .

Выявлена тенденция к увеличению числа лейкоцитов у коров-доноров после акупунктурно-гормонального воздействия на БАТ. Так, если до обработки среднее количество лейкоцитов во всех группах колебалось в пределах  $8,64-8,93 \times 10^9/л$ , то после обработки наблюдалось увеличение их содержания с 8,64 до  $9,57 \times 10^9/л$  во второй опытной группе и с 8,72 до  $9,74 \times 10^9/л$  в третьей опытной группе.

Акупунктурное воздействие не вызвало существенных изменений в содержании гемоглобина в крови. Среднее количество гемоглобина в крови в различных группах было в пределах 101,1-106,4 г/л.

Таким образом, выявленный некоторый рост концентрации в крови эритроцитов и лейкоцитов можно объяснить стимулирующим эффектом применения режимов акупунктурного воздействия на БАТ организма коров-доноров по схеме обработки 2 и 3 опытных групп.

Результаты исследований биохимических показателей крови у коров-доноров представлены в таблицах 38 и 39.

Из данных таблицы 38 видно, что до обработки содержание всех биохимических элементов крови находилось на одном уровне и было в пределах физиологической нормы.

Уровни: общего белка находилось в пределах 79,4-82,4 г/л; каротина 6,87-7,10 мкмоль/л; глюкозы 2,55-2,60 ммоль/л; кальция 2,47-2,60 ммоль/л; неорганического фосфора 2,14-2,31 ммоль/л; магния 0,83-0,86 ммоль/л; железа в пределах 16,98-17,53 мкмоль/л.

Резервная щелочность колебалась в пределах от 46,55 до 47,03 об.  $CO_2$ .

Таблица 38 – Биохимические показатели крови коров-доноров до обработки (5 день полового цикла)

Показатели	Группы животных			
	1 – контрольная, n=16	2 – опытная, n=16	3 – опытная, n=16	4 – опытная, n=16
Общий белок, г/л	80,3±2,85	81,2±5,39	79,4±4,68	82,4±5,61
Каротин, мкмоль/л	6,95±0,102	7,10±0,094	7,01±0,110	6,87±0,113
Глюкоза ммоль/л	2,55±0,125	2,60±0,119	2,58±0,121	2,55±0,134
Кальций общий, ммоль/л	2,60±0,046	2,59±0,093	2,59±0,076	2,47±0,055
Фосфор неорг., ммоль/л	2,14±0,075	2,14±0,097	2,19±0,094	2,31±0,125
Магний, ммоль/л	0,84±0,001	0,83±0,001	0,86±0,001	0,86±0,001
Резервная щелочность, об. CO <sub>2</sub>	46,55±0,902	46,79±0,76	47,03±0,820	46,55±0,754
Железо, мкмоль/л	17,23±0,561	16,98±0,39	17,35±0,44	17,53±0,550

Как видно из данных таблицы 39, после акупунктурной обработки (10-й день полового цикла), показатели крови практически не изменились и не имели достоверных различий.

Таблица 39 – Биохимические показатели крови коров-доноров после обработки (10 день полового цикла)

Показатели	Группы животных			
	1 – контрольная, n=16	2 – опытная, n=16	3 – опытная, n=16	4 – опытная, n=16
Общий белок, г/л	76,3±3,97	79,6±4,82	78,5±5,12	80,4±5,33
Каротин, мкмоль/л	6,93±0,231	6,93±0,172	6,96±0,150	6,81±0,194
Глюкоза ммоль/л	2,57±0,102	2,61±0,134	2,60±0,143	2,47±0,098
Кальций общий, ммоль/л	2,64±0,143	2,61±0,126	2,67±0,101	2,57±0,136
Фосфор неорганический, ммоль/л	2,16±0,109	2,19±0,093	2,17±0,107	2,24±0,101
Магний, ммоль/л	0,86±0,001	0,84±0,001	0,89±0,001	0,86±0,001
Резервная щелочность, об. CO <sub>2</sub>	46,48±2,391	46,75±1,948	46,91±2,909	46,45±1,748
Железо, мкмоль/л	17,04±1,247	17,01±1,499	17,11±0,975	17,14±1,790

Уровни: общего белка находились в пределах 76,3-80,4 г/л; каротина 6,81-6,96 мкмоль/л; глюкозы 2,47-2,61 ммоль/л; кальция 2,57-2,67 ммоль/л; неорганического фосфора 2,16-2,24 ммоль/л; магния 0,84-0,89 ммоль/л; железа в пределах 17,01-17,14 мкмоль/л. Резервная щелочность колебалась в пределах от 46,45 до 46,91 об. CO<sub>2</sub>.

Для установления степени влияния сочетанного гормонально-акупунктурного метода индукции полиовуляции на выход эмбриопродукции, было сформировано две группы животных по

16 голов в каждой (контрольной и 3-ей опытной группы). Коров опытной группы предварительно обрабатывали магнитоинфракрасно-лазерным воздействием при помощи прибора “Милта-МВ” и иглоукалывания – посредством введения акупунктурных игл в область БАТ по ранее представленной в табл. 33 схеме.

Животные контрольной группы акупунктурной обработке не подвергались.

Одной из задач было установить реакцию полиовуляции у коров доноров опытной и контрольной групп. Результаты исследований представлены в таблице 40.

Установлено, что предварительное акупунктурное воздействие на коров перед проведением традиционной гормональной обработки способствовало увеличению числа овуляций в расчёте на донора на 1,5 (10,1 против 8,6).

Таблица 40 – Реакция полиовуляцией и выход эмбрионов у коров-доноров в связи с комплексной акупунктурно-гормональной обработкой

Показатели	Ед. изм.	Группы	
		контрольная, традиционная обработка (ФСГ-супер)	опытная (3-я), акупунктурная обработка + ФСГ-супер
Обработано коров	n	16	16
Количество положительных по извлечению доноров	n/%	13/81	13/81
Количество овуляций на донора	n/%	8,6±0,81 / 78	10,1±0,93 / 83
Количество ановуляторных фолликулов	n/%	0,8±0,014 / 9,3	0,2±0,012** / 2,2
Общий выход эмбриопродукции на донора:	n/±	6,0±0,39 / - 3,3	9,31±0,28/+3,3***
в т. ч. пригодных к трансплантации	n/%	4,08±0,51 / 68	5,92±0,69 / 64*

Одновременно выявлено снижение случаев ановуляторного состояния фолликулов на 0,6 (0,2 против 0,8;  $P < 0,01$ ), возрастание общего выхода эмбриопродукции на 3,3 (9,3 против 6,0;  $P < 0,001$ ) в том числе пригодных к трансплантации зародышей на 1,84 ( $P < 0,05$ ) у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

Качественная оценка биологической полноценности и мор-

фологического состава эмбрионов, в связи с различными методами индукции полиовуляции, представлены в таблице 41.

Таблица 41 – Морфологическая оценка качества и стадии развития эмбрионов в связи с различными методами индукции полиовуляции

Показатели качества эмбрионов	Группы							
	контрольная, n=13				Опытная (3-я), n=13			
	Всего, n/%	из них в стадии, n/%			Всего, n/%	из них в стадии, n/%		
морула		бластоциста ранняя	бластоциста поздняя	морула		бластоциста ранняя	бластоциста поздняя	
Отличные	15/28,4	7/46,7	6/40,0	2/13,3	21/27,9	9/42,9	7/33,3	5/23,8
Хорошие	28/52,7	4/14,3	18/64,3	6/21,4	42/54,5	10/23,8	23/54,8	9/21,4
Удовлетв.	10/18,9	3/30,0	4/40,0	3/30,0	14/17,6	3/21,4	7/50,0	4/28,6
Всего	53/100	14/26,4	28/52,8	11/20,8	77/100	22/28,6	37/48,1	18/23,3

Из данных таблицы видно, что при изучении связи между применяемыми методами индукции полиовуляции – с одной стороны и результатами морфологической оценки качественного состава извлеченных эмбрионов – с другой установлено, что имеющееся различие несущественно.

Так эмбрионов отличного качества установлено 28,4% в контроле, против 27,9% – в опытной группе; хорошего соответственно – 52,7% против 54,5%; удовлетворительного качества – 18,9% против 17,6%.

Одинаковое количество эмбриопродукции, полученной после извлечения на 7-й день, на стадии развития “морула” – соответственно 26 и 28%, а также ранняя и поздняя “бластоциста” – 74 и 72%, указывает на отсутствие какого-либо влияния акупунктурной стимуляции на рост и развитие зародышей.

Однако существенные различия выявлены по их количественному составу. Если в контрольной группе извлечено 53 пригодных для трансплантации эмбриона, то в опытной группе их количество было на 24 эмбриона больше. Полученные данные

указывают на увеличение выхода эмбрионов за счет активизации гипоталамо-гипофизарной системы, оказывающей основное влияние на рост и развитие фолликулов, а также на их авуляторную способность.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что использование гормонально-акупунктурного метода индукции полиовуляции позволяет повысить выход пригодных для трансплантации эмбрионов, не влияя на показатели их биологической полноценности.

В дальнейших исследованиях важно было установить приживляемость полученных различными методами полиовуляции эмбрионов. Влияние комплексной акупунктурно-гормональной стимуляции полиовуляции на приживляемость свежеполученных эмбрионов приведено в таблице 42.

Таблица 42 – Приживляемость свежеполученных эмбрионов в связи с приемами индукции полиовуляции

Группы	Количество доноров, гол.	Результаты пересадки свежеполученных эмбрионов реципиентам		
		Количество пересадок, п	Приживляемость, гол. / %	Получено телят, гол.
контрольная	13	21	10 / 47	10
опытная (3-я)	13	21	11 / 52	11

При установлении связи между акупунктурно-гормональным воздействием на организм коров-доноров и приживляемостью свежеполученных эмбрионов, пересаженных реципиентам на основе режима обработки, применяемого в 3 опытной группе, достоверных различий по сравнению с контрольной группой не выявлено, и составило +5 п.п. (52 против 47%). Одновременно доказана вероятность дополнительного получения 1 теленка-трансплантанта.

Для сравнительного изучения способности зародышей, полученных методом акупунктурно-гормональной индукции полиовуляции, к криоконсервации использовали усовершенствованный способ криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации. Насыщение зародышей криопротектором, охлаждение их в парах жидкого азота и погружение в жидкий азот при темпера-

туре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Для этого эмбрионы сначала помещают на 5 минут в первую защитную среду, затем – на 70-80 секунд во вторую защитную среду, а затем пайету с эмбрионами переносят в пары жидкого азота на 60 секунд.

Приготовление защитных сред:

1. защитная среда (10% раствор глицерина): отмеряют 1 мл химически чистого глицерина и доводят объем раствора до 10 мл фосфатно-солевым буфером Хенкса, приготовленным ранее с добавлением бычьего сывороточного альбумина (5 г/л), гентамицина (12 мкг/мл) и ампициллина (100 ед/мл).

2. защитная среда: отмеряют 3 мл химически чистого глицерина, 1,5 мл химически чистого диметилсульфоксида, 0,5 мл раствора поливидона, смешивают компоненты и доводят раствор до 10 мл фосфатно-солевым буфером Хенкса, приготовленным так, как указано для первой защитной среды.

После хранения оттаяно по 34 эмбриона в каждой из групп (контрольной и опытной). Из них оказались пригодными для пересадки после оттаивания 26 и 27 зародышей, соответственно. Эмбрионы были пересажены телкам-реципиентам ( $n=26$  и  $27$ ). Животные находились в равных условиях кормления и содержания.

Результаты пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов полученных различными методами индукции полиовуляции представлены в таблице 43.

Таблица 43 – Результаты пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов, полученных различными методами индукции полиовуляции

Показатели	Ед. изм.	Группы эмбрионов	
		1 контрольная	2 опытная
Разморожено эмбрионов, всего	n	34	34
из них пригодных для пересадки	n/%	27 / 79,4	26 / 76,5
Проведено эмбриопересадок	n	27	26
Получено телят-трансплантантов	n/%	13 / 48,1	12 / 46,2

После разморозки, пригодными для пересадки реципиентам эмбрионами оказалось соответственно 79,4% и 76,5%. По результатам ректального обследования через 3 месяца стельность установлена у 48,1 и 46,2% животных. Следовательно, применяя

комплексный метод акупунктурно-гормональной обработки доноров можно получать оптимальное количество эмбрионов для криоконсервации, при сохранении их высокой оплодотворяющей способности.

Таким образом, наибольшее активизирующее воздействие на рост и развитие фолликулов в яичниках коров-доноров оказывает комплексная акупунктурно-гормональная стимуляция по сравнению с традиционным вариантом применения ФСГ-супер. Разработанный метод способствует статистически достоверному росту концентрации ФСГ в плазме крови коров-доноров до 14,91 нг/мл ( $P < 0,05$ ) при использовании режима обработки согласно схеме 3 опытной группы, а также второй группы до 14,32 нг/мл против 13,85 нг/мл – в контрольной.

Выявлена тенденция к увеличению числа лейкоцитов у коров-доноров после акупунктурного воздействия на БАТ. Так, если до обработки среднее количество лейкоцитов во всех группах колебалось в пределах  $8,64-8,93 \times 10^9/\text{л}$ , то после обработки наблюдалось достоверное ( $P < 0,05$ ) увеличение их содержания с 8,64 до  $9,57 \times 10^9/\text{л}$  во второй опытной группе и с 8,72 до  $9,74 \times 10^9/\text{л}$  в третьей опытной группе. Указанный рост концентрации лейкоцитов можно объяснить стимулирующим эффектом применения режимов акупунктурного воздействия на БАТ организма коров-доноров по схеме обработки 2 и 3 опытных групп. Одновременно активизируется ряд обменных процессов, связанных с ростом множественных фолликулов, что отражается на изменении обменных процессов в целом всего организма, в том числе повышение уровня лейкоцитов в крови.

Акупунктурное воздействие не вызвало существенных изменений в содержании гемоглобина в крови. Среднее количество гемоглобина в крови в различных группах было в пределах 101,1-106,4 г/л.

Содержание биохимических элементов крови у животных практически не отличалось и не имело достоверных различий.

Предварительное акупунктурное воздействие на коров перед проведением традиционной гормональной обработки способствовало увеличению числа овуляций в расчете на донора на

1,5 (10,1 против 8,6). Одновременно выявлено снижение случаев ановуляторного состояния фолликулов на 0,6 (0,2 против 0,8;  $P < 0,05$ ), возрастание общего выхода эмбриопродукции на 3,3 (9,3 против 6,0;  $P < 0,001$ ), в том числе пригодных для трансплантации зародышей на 1,8 (5,9 против 4,1;  $P < 0,05$ ) у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

Одинаковое количество эмбриопродукции, полученной после извлечения на 7-й день у доноров, на стадии развития “морула” – соответственно 26 и 28%, а также ранняя и поздняя “бластоциста” – 74 и 72%, указывает на отсутствие какого-либо влияния акупунктурной стимуляции на интенсивность роста и развития зародышей. Однако установлены достоверные различия по выходу общего числа эмбрионов у животных опытной группы. Если в контрольной группе извлечено 53 пригодных для трансплантации эмбриона, то во 2-й группе их количество было на 24 эмбриона больше. Это объясняется активизацией гипоталамо-гипофизарной системы, оказывающей основное влияние на рост и развитие фолликулов, а также на их ановуляторную способность.

Не установлено достоверных различий в приживляемости свежеполученных эмбрионов, пересаженных реципиентам на основе разработанного режима обработки (52% в опытной и 47% в контрольной группах). Применение метода способствует дополнительному получению 1-теленка-трансплантанта в расчете на 20 эмбриопересадок.

После разморозки пригодных для пересадки эмбрионов установлено, соответственно 79,4 и 76,5% в контрольной и опытной группах. По результатам произведенных пересадок стельность установлена у 48,1 и 46,2% животных соответственно. Данные, полученные по результатам пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов, полученных различными методами индукции полиовуляции подтверждают возможность получать оптимальное количество зародышей для криоконсервации, при сохранении их высокой приживляемости.

## **9. Способ криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием высококонцентрированных защитных сред**

Криоконсервация дает возможность создавать криобанк ценных генотипов и благодаря этому ускоренно размножать животных с высоким потенциалом молочной продуктивности.

В последние ряд лет ученые практически всех стран мира с развитым животноводством направляют свои усилия на разработку и практическое применение способа витрификации, изобретенного еще в 1987 году (Rall W.F.) на эмбрионах мышей. При этом значительно упрощается не только процесс замораживания, но также полностью исключается опасность физических и химических повреждений, вызванных межклеточной и внутриклеточной кристаллизацией. Однако в настоящее время он имеет ряд недостатков: во-первых, существуют отдельные технологические сложности, заключающиеся в необходимости подбора оптимального состава компонентов для создания специальных сред, а также корректировки режима охлаждения; во-вторых, применение высококонцентрированных растворов (40% и более) в значительной мере усложняет нормальную жизнедеятельность эмбрионов. Нарушения технологии приготовления таких растворов или применение неправильно выбранных режимов криоконсервации, как правило, приводит к их повреждению и непригодности для пересадки реципиентам.

В связи с вышеуказанным, задачей исследований было разработать способ замораживания эмбрионов крупного рогатого скота с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации.

В качестве доноров использовали высокопродуктивных коров черно-пестрой породы принадлежащих РУСП «Племзавод «Россь», в возрасте от 4 до 8 лет, живой массой 550-650 кг с удоем от 8,0 до 11,5 тыс. кг молока за лактацию, жирностью 3,7-4,2%. Зародыши получали после индукции полиовуляции у коров общепринятым методом на 7-й день. Они находились в стадии развития поздней морулы, ранней и поздней бластоцисты.

В связи с этим, для того, чтобы дать наиболее объективную оценку сравниваемым способам криоконсервации – новому с использованием процесса витрификации и общепринятому – посредством замораживания эмбрионов с помощью программного замораживателя, важно было в сравнительном аспекте дать морфологическую оценку эмбрионов и определить их пригодность к пересадке после оттаивания (табл. 44).

При сравнении результатов морфологической оценки эмбрионов при замораживании двумя способами было установлено, что сохранность эмбрионов в контрольной группе составила 81,8%, что на 4,5% больше, чем в опытной (77,3%).

Таблица 44 – Жизнеспособность эмбрионов при замораживании различными способами

Стадия развития эмбрионов	Базовый вариант					Опытный вариант				
	Количество	качество эмбрионов, п				Количество	качество эмбрионов, п			
		до замораживания		после оттаивания			до замораживания		после оттаивания	
		отличное	хорошее	пригодные	непригодные		отличное	хорошее	пригодные	непригодные
Морула поздняя	8	5	3	7	1	9	5	4	6	3
Бластоциста ранняя	7	3	4	5	2	6	1	5	6	0
Бластоциста поздняя	7	4	3	6	1	7	5	2	5	2
Всего, n – %	22-100	12-54,5	10-45,5	18±0,8-81,8	4-18,2	22-100	11-50	11-50	17±0,8-77,3	5-22,7

Разница между группами статистически недостоверна, поэтому данный способ предложен нами для практического использования в условиях работы по трансплантации эмбрионов «Племзавода «Россь»».

Разработанный нами способ замораживания эмбрионов крупного рогатого скота с использованием процесса витрификации предусматривает, насыщение зародышей специальным составом криопротектора, охлаждение их в парах жидкого азота и погружение в жидкий азот на хранение при температуре -196°С.

Способ осуществляется следующим образом. Готовят первую защитную среду (10% раствор глицерина). Для этого отме-

ряют 1 мл химически чистого глицерина и доводят раствор до 10 мл фосфатно-солевым буфером Дюльбекко, приготовленным заранее с добавлением бычьего сывороточного альбумина (4 г/л), гентамицина (12 мкг/мл) и ампициллина (100 ед/мл).

Готовят вторую защитную среду. Для этого отмеряют 3 мл химически чистого глицерина, 1,5 мл химически чистого диметилсульфоксида, 0,5 мл раствора поливидона, смешивают компоненты и доводят раствор до 10 мл фосфатно-солевым буфером Дюльбекко, приготовленным так, как указано выше. Затем эмбрионы помещают в заранее приготовленную первую защитную среду на 3 минуты, далее – во вторую защитную среду на 50-60 секунд. Переносят эмбрионы в пайету, которую помещают в пары жидкого азота на 60 секунд и далее погружают в жидкий азот при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  на долговременное хранение.

Поскольку эмбрионы, после эквilibрации помещают в витрификационную среду, в составе которой содержится высококонцентрированный криопротектор, затем сразу погружают в жидкий азот, отпадает необходимость в приобретении дорогостоящего оборудования, что удешевляет стоимость деконсервированных эмбрионов. Период замораживания сокращается до с 80 до 6 минут. Следовательно, способ криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием высококонцентрированных защитных сред позволит увеличить производительность труда зооветспециалистов.

После извлечения зародыши отличного и хорошего качества на стадии морулы и бластоцисты были отобраны для замораживания. Было сформировано две группы эмбрионов – опытная ( $n=34$ ) и контрольная ( $n=38$ ), однородные по качественному и возрастному составу. Опытный биоматериал был заморожен в витрификационной среде содержащей глицерин, диметилсульфоксид, поливидон и фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением бычьего сывороточного альбумина гентамицина, ампициллина, без программного замораживателя [95]. После хранения они были оттаяны и пересажены реципиентам. Контрольные эмбрионы были подвергнуты криоконсервации посредством общеизвестной технологии, которая предусматривает следую-

щие этапы: выбор криопротектора и приготовление криозащитного раствора; качественную оценку зародышей, насыщение их криопротектором; постепенное охлаждение эмбрионов с помощью программных замораживателей; перенос эмбрионов в жидкий азот и их хранение, оттаивание при определенной температуре; выведение криопротектора из эмбриона; морфологическая оценка зародышей по их пригодности к трансплантации; заправка эмбриона в пайету; пересадка зародышей реципиентам.

Для криоконсервации использовали свежеполученные эмбрионы отличного и хорошего качества. Основным условием при этом являлось сокращение до минимума времени манипуляций с эмбрионами от момента извлечения до замораживания.

Манипуляции по подготовке зародышей к криоконсервации (оценку их жизнеспособности, насыщение эмбрионов криопротектором, заправку в пайеты) проводили в условиях пункта трансплантации РУСП «Племзавод «Россь». Посудой для проводки эмбрионов служили стерильные часовые стекла с лунками и чашки Петри. Криопротектором для замораживания зародышей крупного рогатого скота контрольной группы являлся 1,4 М (10%-ный) раствор глицерина (ГОСТ 6259-75).

Рабочие растворы криопротектора готовили на основе фосфатно-буферной среды (ФБС), содержащей 4% сыворотки крови телят - фетальной сыворотки (ФС), 100 ед/мл ампициллина и 12 мкг/мл гентамицина. В таблице 45 показано приготовление криопротектора глицерина 1,4 М концентрации и одноступенчатое насыщение эмбрионов криопротектором.

Таблица 45 – Приготовление раствора глицерина и одноступенчатое насыщение эмбрионов криопротектором

Номер раствора	Компоненты для приготовления	Концентрация раствора, М	Время экспозиции, мин
1	1 мл глицерина + 9 мл среды	1,4	10

Эмбрионы с помощью микрошприца помещали в пайеты, при заправке которых соблюдали следующую последовательность: в начале набирали последний раствор криопротектора в количестве 2/5 объема, пузырек воздуха, эмбрион в растворе криопротектора (1/5 объема), пузырек воздуха, раствор криопротек-

тора (2/5 объема). Заправку производили таким образом, чтобы верхний столбик раствора криопротектора смочил пыж пайеты. В одну пайету заправляли не более одного эмбриона (рис. 24).

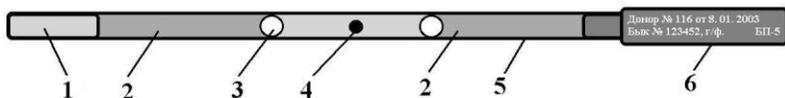


Рисунок 24 – Схема заправки пайеты с эмбрионом

- 1 – пыж; 2 – защитный раствор; 3 – пузырек воздуха;  
4 – эмбрион; 5 – пайета; 6 – маркировочная пробка

Нижний конец пайеты закрывали пластиковой пробкой, на которой указывали дату извлечения зародыша, номер донора и номер пайеты.

Режим замораживания приведен в таблице 46.

Таблица 46 – Режим замораживания эмбрионов в 1,4 М растворе глицерина

Этапы работ при криоконсервировании	Технологические показатели
Криопротектор	1,4 М глицерин
Время эквilibрации в криопротекторе, мин.	10
Заправка эмбрионов в пайеты	Рис. 6
Начальная температура охлаждения	+20°C
Скорость охлаждения эмбрионов до сидинга	1°C/мин
Сидинг	-5°C
Время выдержки после сидинга, мин.	0,2
Скорость охлаждения эмбрионов после сидинга	0,3°C/мин
Конечная температура	-36°C
Стабилизация температуры	Погружение в жидкий азот

Для замораживания эмбрионов от коров контрольной группы использовали программный замораживатель.

Пайеты с эмбрионами переносили и фиксировали в штативе для пайет камеры замораживания (рис. 25), после чего включали программу. Снижение температуры происходило автоматически, до заданного программой уровня. Продолжительность цикла криоконсервации составляла 80 минут. Затем пайету с эмбрионом переносили в жидкий азот для хранения.

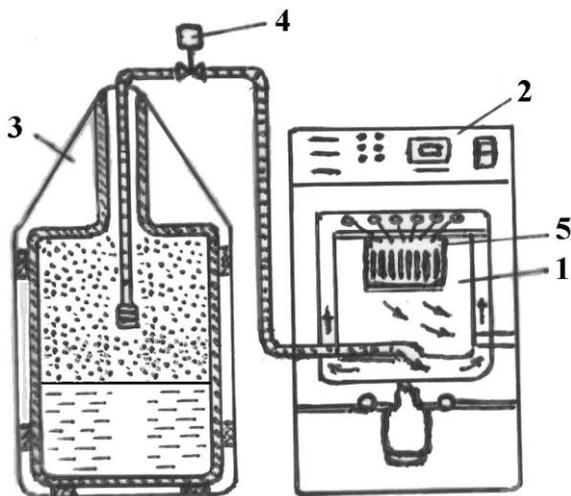


Рисунок 25 – Схема программного замораживателя

- 1 – камера замораживания; 2 – блок автоматики с датчиком температуры; 3 – сосуд Дьюара; 4 – электронно-клапанное устройство; 5 – штатив для пайет

Хранение замороженных эмбрионов осуществляли непосредственно в жидком азоте сосуда Дьюара, при этом использовали стандартные канистры для хранения спермы. Для транспортировки эмбрионов в замороженном состоянии применяли сосуды Дьюара емкостью 5 литров. Для размораживания эмбрионов извлекали пайету из сосуда Дьюара, выдерживали на воздухе 10 секунд при комнатной температуре и погружали на 10 секунд в водяную баню (оттаиватель) при температуре 25°C.

Отогретые пайеты освобождали от маркерной пробки, верхний конец, закрытый пыжом, отрезали и содержимое помещали в малую чашку Петри.

Под микроскопом при 12-16-кратном увеличении проводили предварительную морфологическую оценку эмбрионов. Затем отмывали от криопротектора посредством перемещения, с использованием стерильных микропипеток, из одной чашки с раствором в другую (табл. 47).

Таблица 47 – Удаление криопротектора

№ раствора	1,4 М раствор глицерина	
	Концентрация	Время экспозиции, мин
1	1,05	5
2	0,7	5
3	0,35	5
4	среда	5
5	среда	5

После морфологической оценки зародыши заправляли в пайеты и производили пересадку реципиентам. Эмбрионы, насыщенные стандартной защитной средой (1,4 М раствором глицерина) в течение 10 минут, заправленные в пайеты и замороженные с использованием программного замораживателя «DB1» (Англия) с последующим переносом в жидкий азот, после хранения были оттаяны, заправлены в катетер и пересажены телкам реципиентам контрольной группы (n=38). Животные находились в равных условиях кормления и содержания. Результаты опыта приведены в таблице 48.

Таблица 48 – Результаты сравнения способов криоконсервации эмбрионов

Показатели	Группы	
	1 контрольная	2 опытная
Получено полноценных эмбрионов после разморозки, n	38	34
Сделано эмбриопересадок	38	34
Количество стельных реципиентов, гол.- %	18 - 47,4	15 - 44,1
Продолжительность криоконсервации от начала насыщения до помещения в жидкий азот, мин.	80±6,48***	6±0,41
Необходимость наличия замораживающего устройства	Есть	Нет

Из данных анализа таблицы видно, что количество стельных реципиентов в обеих группах различалось незначительно и составило 47,4% в контрольной и 44,1% в опытной группах. При этом в сравнении с аналогом, способ ускоренного замораживания с использованием процесса витрификации позволяет сократить продолжительность криоконсервации с 80 минут до 6, то есть в 13 раз (P<0,001).

С учетом стоимости программного замораживателя, составляющей около 10 тыс. у.е. (21,5 млн. руб.) произведен расчет экономической эффективности использования способа указанных способов (табл.48)

Таким образом, результаты проведенных исследований дают основание утверждать, что применение способа криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации позволяет снизить стоимость эмбрионов за счет отсутствия необходимости применения дорогостоящего импортного программного замораживателя.

При этом замораживание зародышей, полученных от выдающихся по продуктивности коров, с использованием разработанного способа является перспективным для создания криобанка ценных генотипов, импортозамещающим.

Таблица 49 – Экономическая эффективность применения способов криоконсервации эмбрионов

Группы (способы криоконсервации)	Стоимость 1 замороженного эмбриона (тыс. руб.)	Различие в стоимости; тыс. руб.	Использовано реципиентов, гол.; %		Затрачено средств в расчете на 10 условных пересадок; тыс. руб., в т. ч.	
			всего	из них стали стельными	на замороженно-оттаянные эмбрионы	на количество стельных реципиентов
1.Контрольная: (n=38) (замораживание с использованием «DB1»)	151,0	+21,5	38	18 (47%)	1510	709,7
2. Опытная (n=34) (замораживание с использованием высококонцентр. защитных сред)	129,5	- 21,5	34	15 (44%)	1295	569,8

По сравнению с общепринятой технологией в 13 раз сокращается длительность замораживания, что обеспечивает существенное повышение производительности труда специалистов. Стоимость каждого из полученных замороженно-оттаянных эмбрионов снижается на 21,5 тысяч рублей по сравнению с использованием программного замораживателя «DB1» Англия (в

пересчете на каждые 1000 замороженных эмбрионов). Всего затраты на 100 условных пересадок эмбрионов с использованием базового (1 группа «DB1») и опытного (2 группа; с использованием витрификационной среды) способов криоконсервации составили соответственно 9097,0 против 5698,0, то есть всего на 1399,0 тыс. рублей (акт внедрения прилагается; расчет экономической эффективности в ценах на 08.11.2005 г).

## 10. Экономическая эффективность внедренных разработок в практику животноводства

Эффективность применения приемов усовершенствованной технологии криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации отображена в таблице 50.

Таблица 50 – Экономическая эффективность применения приемов повышения полноценности и приживляемости эмбрионов

Использованные приемы:	Единицы измерения	Экономическая эффективность
1. Дополнительная оценка качества замороженно-оттаянной спермы по состоянию акросом спермиев	тыс. руб. на 10 эмбриопересадок	9063
2. Нормализация репродуктивной функции у коров-доноров в послеродовой период	тыс. руб. на 10 выздоровевших голов	117,4
3. Способ криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред	тыс. руб. на 10 эмбриопересадок	215
4. Повышение приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов у реципиентов	тыс. руб. на 10 эмбриопересадок	10358
Общая экономия средств	тыс. руб. на 10 эмбриопересадок	19753,4

Результаты проведенных исследований дают основание утверждать, что применение приемов повышения полноценности и приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов с использованием процесса витрификации позволяет снизить их стоимость за счет: дополнительной оценки качества замороженно-оттаянной спермы по состоянию акросом спермиев на 1,4 теленка. При стоимости 1 теленка-трансплантанта достигшего возраста 18 мес. – 3000 у.е. (6474 тыс. руб.) 1,4 теленка – составляет 9063 тыс. руб., в расчете на каждые 10 пересадок, нормализации репродуктивной функции у 49% доноров в послеродовой период при использовании препарата ихтиоглюкобикарбонат (ИХБ) – на 117,4 тыс. руб. в расчете на 10 выздоровевших коров, применения КОП-17а для повышения приживляемости замороженно-

оттаянных эмбрионов у реципиентов позволяет получить дополнительно в расчете на каждые 10 пересадок 1,6 теленка. При стоимости 1 полученного трансплантата достигшего возраста 18 мес. – 3000 у.е. (6474 тыс. руб.) цена 1,6 теленка – составляет 10358 тыс. руб. Применение разработанного способа криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации позволяет снизить их стоимость на 215 тыс. руб. в расчете на 10 пересадок по сравнению с использованием прогаммного замораживателя «ЭМБИ-К».

Исходя из вышеуказанного, данная технология предложена нами для практического использования в условиях работы пунктов и центров по трансплантации эмбрионов. При этом в сравнении с аналогом, способ ускоренного замораживания с использованием процесса витрификации позволяет сократить продолжительность криоконсервации с 80 минут до 6, то есть в 13 раз.

Таким образом, общий экономический эффект применения приемов повышения полноценности и приживляемости заморожено-оттаянных эмбрионов с использованием процесса витрификации в расчете на 10 эмбриопересадок составляет 19753,4 тыс. руб. (9063 тыс. руб. + 117,4 тыс. руб. + 10358 тыс. руб. + 215 тыс. руб.).

## **Выводы**

1. При изучении факторов влияющих на уровень полиовуляции и выход эмбрионов пригодных для криоконсервации было установлено, что возраст коров-доноров как в 1-й (4...6 лет), так и во второй (7...10 лет) опытных группах существенно не влиял на реакцию полиовуляции и качество извлечённых у них эмбрионов. Коров 1-й группы прореагировало полиовуляцией на инъекции ФСГ-Супер на 13,4% меньше, чем во 2-й, где этот показатель составил 73,3%. Также недостоверными оказались и показатели числа овуляций в расчете на 1 положительного по извлечению донора (11,0 против 10,5 соответственно) и выход эмбрионов пригодных к криоконсервации (3,2 против 3,7).

При изучении связи по вышеуказанным показателям между коровами-донорами с наличием лактации (2-я контрольная группа), либо ее отсутствием (1-я опытная группа) было установлено, что из 19 голов 1-й группы положительно прореагировали на обработку гормональными препаратами 16 голов (84,2%), в то время как во 2-й – 14 голов (73,7). В 1-й группе не лактирующих коров количество полученных зародышей и яйцеклеток составило на 1 положительного донора 9,12, во 2-й группе этот показатель составил 8,86 соответственно. На одного донора было получено пригодных к криоконсервации эмбрионов соответственно 5,37 и 4,40. Достоверный результат между группами получен лишь по показателю извлечённых пригодных эмбрионов в расчёте на 1 обработанного донора. Он был выше в 1-й группе по сравнению со 2-й на 1,32 эмбриона (4,53 против 3,21;  $P < 0,05$ ).

Установлено, что при росте молочной продуктивности наблюдается тенденция к снижению числа овуляций в расчёте на 1 положительно прореагировавшего на обработку донора. Так, при удое 8,0...8,5 тыс. кг молока за лактацию (1-я опытная группа), положительно реагировало полиовуляцией 89,5% доноров, в то время как при 9,1...11,5 тыс. кг (3-я опытная группа) – 75,0%. В расчёте на 1 положительного по извлечению донора с повышением удоев (3-я группа) достоверно снижается число яйцеклеток и эмбрионов. Если при удое 8,6...9,0 тыс. кг молока за лактацию (2-я опытная группа), данный показатель составлял 9,17 эмбрионов, то в 3-й он был лишь 7,08 ( $P < 0,05$ ). Следовательно, молочная продуктивность доноров 3-й контрольной группы оказывает существенное влияние на снижение уровня реакции полиовуляции на 14,5-7,8% (75,0% против 89,5 и 82,8% соответственно) по сравнению с 1 и 2 опытными группами. Одновременно установлено достоверное снижение количества неоплодотворённых яйцеклеток у животных 3 группы на 7% по сравнению со 2-й группой (соответственно 12 против 19;  $P < 0,05$ ). Среднее количество эмбрионов пригодных к криоконсервации в расчёте на обработанного донора также оказалось достоверно ниже у доноров с максимальным уровнем продук-

тивности (3 группа). Показатели соответственно составили: 2,62 эмбриона в 3-й группе против 4,37 и 3,95, соответственно, в 1-й и 2-й ( $P < 0,05$  в обоих случаях).

Повышение молочной продуктивности коров – доноров эмбрионов до уровня от 9,1 до 11,5 тыс. кг молока за лактацию даже при сбалансированном полноценном кормлении оказывает отрицательное влияние на воспроизводительную функцию животных, которое выражается в снижении количества пригодных эмбрионов, в расчете на 1 обработанного донора при одновременном сокращении числа яйцеклеток.

2. При определении влияния дополнительной оценки замороженно-оттаянной спермы по состоянию акросом спермиев на получение полноценных эмбрионов от коров-доноров установлено 4 вида наиболее часто встречающихся патологических изменений в акросомном аппарате спермиев. При этом выявлено, что импортированная сперма быков-производителей оказалась лучше, чем быков отечественной селекции по таким показателям, как подвижность спермиев после оттаивания (соответственно 5,4 против 4,9 баллов), по выживаемости спермиев (8,4 против 8,2 часа), но хуже по сохранности их акросом (84,8 против 96,0). При анализе результатов осеменения коров-доноров спермой быков-производителей отечественной и зарубежной селекции наиболее значительные различия в оплодотворяемости отмечены в связи с таким показателем как сохранность акросом спермиев. Наибольшее количество пригодных к пересадке эмбрионов (85; 55 и 47%) наблюдалось при введении в половые пути доноров спермы с уровнем сохранности акросом соответственно 95, 97 и 93%, от быков входящих в группы 6, 7 и 2 (быки РУСП «Племзавод «Россь», РУСП «Племзавод «Красная Звезда» и голландские быки черно-пестрой породы). Наименьшее количество их установлено при сохранности акросом в пределах 74, 85 и 83% – соответственно у животных 5 (английская ч/п), 3 (датская ч/п) и 1 (канадская голштинская) групп.

Результаты извлечения эмбрионов пригодных к криоконсервации и полученных с использованием спермы быков отечественной и зарубежной селекции, оказались в пользу животных

1-й группы (контрольная – отечественная селекция), на 38% (70 против 32%;  $P < 0,01$ ). При этом в расчете на 1 донора, использованного по извлечению зародышей, различия были достоверными и составили 1,08 (2,94 против 1,86 соответственно;  $P < 0,01$ ). При пересадке эмбрионов, полученных с использованием спермы быков отечественной селекции, стельность установлена у 55% реципиентов, что оказалось выше их приживляемости во 2-й (опытная – зарубежная селекция) группе на 14%. Вместе с тем было установлено, что остальные учитываемые показатели, такие как средняя продуктивность женских предков быков, активность и выживаемость спермиев определяющего влияния на качество эмбрионов не оказали. Следовательно, использование спермы быков-производителей отечественной селекции, при условии дополнительной оценки по показателю сохранности акросом спермиев, обеспечивает повышение приживляемости заморожено-оттаянных эмбрионов, что в расчете на 10 пересадок дает возможность получить дополнительно 1,4 теленка. При стоимости 1 теленка-трансплантанта достигшего возраста 18 мес. возраста – 3000 у.е. (6474 тыс. руб.); 1,4 теленка ровняется 9063 тыс. руб.

3. Установлена эффективность лечебной и профилактической обработки коров-доноров ветпрепаратами фармазин (1 контрольная группа) и ИХБ отдельно (2 опытная группа), а также ИХБ в комплексе с такими препаратами, как метрикур и тилозинокар (3 и 4 опытные группы). Процент выздоровевших и проявивших охоту животных был выше у коров 2-й опытной группы, где применялся ИХБ, по сравнению с 1-й контрольной (49 против 45%). В 3 и 4 группах количество выздоровевших животных было еще большим, и составило в 3-й группе 53 и в 4-й 60%. Однако количество плодотворных осеменений, учтенных за период 90 дней после отела, значительно различалось и составляло между животными 1-й и 2-й групп 18% (соответственно 66 против 84%). В 3-й и 4-й группах этот показатель составил 87 и 78% соответственно. Затраты на 1 выздоровевшую после лечения голову составили в среднем по 1-й и 2-й группам соответственно 15,0 и 3,3 тыс. руб., а по 3-й и 4-й группам 90,2 и 21,7

тыс. руб. На основании проведенных исследований производству предложен метод лечения и профилактики эндометритов у коров потенциальных доноров эмбрионов, обеспечивающий выздоровление после одного курса обработки препаратом ИХБ (и комплексном его введении) 49...60% животных, при оплодотворяемости за период до 90 дней после отела 78...87%. По результатам исследований разработана схема нормализации репродуктивной функции у коров потенциальных доноров эмбрионов предназначенная для практического применения в условиях работы пунктов и центров трансплантации эмбрионов. Экономический эффект при сравнении применения 3%-ного фармазина (1-я контрольная группа) со 2-й, 3-й и 4-й опытными группами составляет соответственно (тыс. руб.): по 2-й группе (ИХБ): + 11,7 тыс. руб. (15,0 против 3,3); по 3-й группе (ИХБ и метрикур): - 78,5 (15,0 против 93,5); по 4-й группе (ИХБ и тилозинокар): - 10,0 тыс. руб. (15,0 против 25,0). Следовательно, наименее затратной схемой обработки коров оказалась та, в которой использовали препарат ИХБ – 3,3 тыс. руб. (за один курс введения), при достаточно высокой эффективности по выздоровлению животных потенциальных доноров (49% за одну обработку).

Изучено влияние инъекций препарата капронат оксипрогестерона реципиентам на приживляемость эмбрионов. После его введения за 48 часов до пересадки и повторно на 15-й день цикла было установлено, что показатель стельности у животных в опытной и контрольной группах составил 55 и 39% соответственно. При этом приживляемость пересаженных эмбрионов повышается на 16% за счет своевременной стабилизации баланса половых гормонов в организме реципиента в наиболее ответственный для этого период. Эффективно проводить двукратную обработку животных-реципиентов: в первый раз за 48 часов до пересадки и повторно через 10 дней (15-й день цикла), внутримышечно, в дозе 12 мл 12,5%-ного масляного раствора. Его применение телкам-реципиентам позволяет получать дополнительно в расчете на каждые 10 пересадок – 1,6 теленка. При стоимости 1 полученного трансплантанта достигшего возраста

18 мес. – 3000 у.е. (6474 тыс. руб.); 1,6 теленка ровняется 10358 тыс. руб.

4. Применение разработанного способа криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации исключает необходимость приобретения дорогостоящего оборудования и способствует достоверному сокращению времени замораживания с 80 до 6 минут, тесть в 13 раз, при достаточно высокой приживляемости эмбрионов – 44,1%, при этом в контрольной группе этот показатель составил 47,4%. При отсутствии необходимости использования программного замораживателя снижается стоимость каждых 10 пересадок эмбрионов 215 тыс. руб.

### **Заключение**

Многочисленные и, отчасти, противоречивые литературные данные отечественных и зарубежных ученых указывают, что еще окончательно не выяснено влияние возраста животных на качество извлеченных и биологическую полноценность заморожено-оттаянных эмбрионов у коров-доноров. В связи с этим исключительно важным условием эффективности технологии трансплантации эмбрионов является максимально длительное сохранение высокой оплодотворяющей способности коров-доноров, которая, в свою очередь, зависит от течения целого ряда процессов: гаметогенеза, оплодотворения, пренатального и постнатального их развития. В условиях развития животноводства актуальными задачами являются разработка методов многократного использования коров-доноров и включение в постоянное донорское стадо выбракованных по хозяйственным причинам животных.

По данным большинства современных ученых и работников производства отмечается, что негативным фактором интенсивного ведения отрасли скотоводства остается высокий уровень выбраковки (25...30%) поголовья маточного стада, в том числе и коров с высоким генетическим потенциалом. Важной

задачей при этом является восстановление репродуктивной функции высокопродуктивных коров с патологией половых органов для дальнейшего использования их в качестве доноров при трансплантации эмбрионов. Авторы указывают, что нарушение воспроизводительной функции у коров (гипофункция яичников, субклинический эндометрит, а также их возраст) не являются основанием исключения таких животных из числа доноров. По мнению вышеуказанных авторов, высокопродуктивные коровы с гипофункцией яичников или субклиническими эндометритами, после их выздоровления могут быть использованы в качестве доноров эмбрионов, обеспечивать полиовуляторную реакцию у 91% животных, 5,6 эмбрионов пригодных к пересадке, с приживляемостью 50%, что позволяет дополнительно получать 2 головы высокоценного приплода. Из числа выбракованных по возрасту не лактирующих коров процентное соотношение полноценных эмбрионов к общему их числу составило 56...58%. Среднее количество полноценных эмбрионов на одного обработанного донора 4,4...4,8. Результаты проведенных исследований доказывают возможность создания донорского стада из выбракованных не лактирующих, а также выздоровевших после курса лечения эндометрита коров.

С другой стороны существует мнение, что использование коров, имеющих патологию репродуктивной системы или выбракованных по возрасту, нецелесообразно из-за низкой супер-овуляторной реакции и низкого качества эмбрионов. Однако, в большинстве своем, эти исследования проведены без учета высокой продуктивности коров-доноров. Поэтому изучение особенностей проявления у них воспроизводительной функции в зависимости от продуктивности, а также устранения других факторов, снижающих результативность получения и трансплантации эмбрионов, позволяет повысить уровень селекции и генетического потенциала животных, используемых для создания криобанка ценных генотипов.

Исходя из вышеуказанного, в проведенных нами исследованиях была изучена степень влияния возраста, коров на реакцию полиовуляции и выход полноценных эмбрионов. При этом

выявлено, что возраст животных, как в первой группе (от 4 до 6 лет), так и во второй (от 7 до 10 лет) существенно не влиял на указанные показатели. При этом 73,3% коров 1-й группы прореагировали на инъекции ФСГ-Супер, во 2-й группе более старших по возрасту животных – 86,7%. По совокупности ряда отдельных показателей, в том числе таких как: получено всего полноценных эмбрионов и на одного положительного донора; по количеству полноценных и дегенерированных, а также неоплодотворённых яйцеклеток, различия были также статистически недостоверны. Незначительное влияние возраст оказал и на число овуляций на одного положительного по извлечению донора (11,00 в первой группе против 10,46 – во второй), а также на средний выход эмбрионов пригодных к криоконсервации (3,20 против 3,73 соответственно). Зависимости по уровню реакции полиовуляции и выходу пригодных эмбрионов установлено не было у коров-доноров как первой, так и второй опытных групп.

Несмотря на проведение отдельных экспериментальных данных на небольшом поголовье коров различной продуктивности, в том числе и на потенциальных коровах-донорах эмбрионов, значительный интерес представляет изучение степени влияния или его отсутствия на уровень полиовуляции и выход полноценных эмбрионов в зависимости от физиологического состояния животных, то есть от того лактируют они или нет. Выявлена определенная зависимость наличия вышеуказанного физиологического состояния у животных при использовании в качестве доноров.

В наших исследованиях, при изучении связи между наличием либо отсутствием лактации у животных, а также уровнем полиовуляции и выходом полноценных эмбрионов у коров-доноров установлено различие по выходу их в расчете на 1 положительное вымывание. Здесь по числу полноценных эмбрионов между группами 1 (опытная, выбракованные не лактирующие коровы) и 2 (контрольная, лактирующие) недостоверные различия установлены соответственно 56,1 против 49,2% в пользу нелактующих коров. Однако по количеству извлеченных неоплодотворенных яйцеклеток, наоборот, показатель был

меньше в 1 группе, чем во 2 (12,3% против 20,2). В целом достоверный результат между группами получен лишь по показателю извлеченных эмбрионов пригодных для криоконсервации в расчете на 1 обработанного донора. Он был выше в 1 группе по сравнению со второй на 1,3 эмбриона и составил 4,53 против 3,21 ( $P<0,05$ ).

Молочная продуктивность у коров-доноров 3-й контрольной группы, находящаяся на уровне 9,1...11,5 тыс. кг молока за лактацию, оказывает существенное влияние на снижение уровня реакции полиовуляции на 14,5...7,8% (75,0% против 89,5 и 82,8% соответственно) по сравнению с 1 и 2 опытными группами. Вместе с тем, установлено аналогичное снижение числа неоплодотворённых яйцеклеток у животных 3 группы на 7% по сравнению со 2-й группой (соответственно 12 против 19;  $P<0,05$ ). Среднее число полученных эмбрионов пригодных для криоконсервации в расчёте на 1 обработанного донора также оказалось достоверно ниже по группе доноров с максимальным уровнем продуктивности (3 группа). Показатели соответственно составили: 2,62 эмбриона в третьей группе против 4,37 и 3,95 соответственно в первой и второй ( $P<0,05$  в обоих случаях).

По результатам исследований по влиянию молочной продуктивности на уровень полиовуляции и качество эмбрионов в целом проявилось единодушие. Однако отдельные авторы проводили исследования на коровах продуктивностью ниже 10 тыс. кг за лактацию, что по нашему мнению недостаточно. Согласно требованиям установленным к животным-донорам в Республике Беларусь этот показатель не должен быть ниже, чем 10 тыс. кг. за законченную лактацию.

Данные наших исследований подтверждают результаты отдельных зарубежных и отечественных ученых установивших аналогичную закономерность, что у коров имеющих высокую молочную продуктивность сохранение беременности связано с взаимодействием эндокринных систем матери и эмбриона. При увеличении молочной продуктивности коров на уровне 6 тыс. кг молока проявление гипофункции яичников составляет 5,4%, при 10 тыс. кг учащается до 11,3%. Одновременно снижается опло-

дотворяемость после первого осеменения соответственно на 5 и 21.

Данных по изучению связи между качеством спермы быков-производителей, используемой для получения эмбрионов с одной стороны, а также биологической полноценностью и приживляемостью эмбрионов в организме реципиента – с другой в доступной литературе мы не нашли. Это объясняется тем, что применяемая в настоящее время визуальная оценка качества спермы под микроскопом по подвижности спермиев слишком приближительна и субъективна. Другой используемый в республике метод оценки - на выживаемость спермиев также не позволяет дать достаточно объективной и точной характеристики биологической полноценности спермы. Между тем многочисленными исследованиями за рубежом убедительно доказано, что в отличие от плазматической мембраны, акросома спермиев представляет собой гликопротеидное образование, которое содержит много воды и поэтому является лабильной структурой, которая в первую очередь подвергается криогенному воздействию. Это зачастую приводит к ошибкам в прогнозировании оплодотворяющей способности спермы, поскольку показатели их подвижности и выживаемости практически не меняются.

За рубежом одним из важнейших тестов определения биологической полноценности спермиев, является оценка состояния акросом. Из других, вышеуказанных используется лишь оценка качества спермы на выживаемость спермиев в течении 5 часов (экспресс методика).

Установлено, что наибольшее количество пригодных к пересадке эмбрионов наблюдалось при введении в половые пути доноров спермы с уровнем сохранности акросом спермиев 95...97%, что установлено у быков, рожденных в РУСП «Племзавод «Россь» и РУСП «Племзавод «Красная Звезда». При этом намечается заметная тенденция к ухудшению качества извлеченных у коров зародышей по мере снижения показателя сохранности акросом спермиев быков зарубежной селекции на уровне 74...85%. В результате извлечено пригодных к криоконсервации эмбрионов на 20...59% ( $P < 0,01$ ) меньше. Вместе с тем

было установлено, что остальные учитываемые показатели, такие как средняя продуктивность женских предков быков, активность и выживаемость спермиев определяющего влияния на качество эмбрионов не оказали. Использование спермы быков-производителей отечественной селекции обеспечивает повышение приживляемости заморожено-оттаянных эмбрионов на 14%, что в расчете на 100 пересадок дает возможность получить дополнительно 14 телят.

Результаты наших исследований по основным, принципиальным позициям оценки качества спермы, в том числе по состоянию акросом спермиев быков-производителей, согласуются с данными полученными целым рядом других авторов, также предложившими оценивать качество спермиев быков по строению акросомы, хорошо различимой под микроскопом. При использовании спермы с содержанием 76, 64 и 46% спермиев с сохранившимися акросомами оплодотворяемость ооцитов составила 53,0; 48,6; 37,8% соответственно. По результатам исследований ряда других авторов спермии, утратившие акросому, не способны оплодотворить ооциты. При этом выявлена высокая корреляция между результатами осеменения и состоянием акросом спермиев. Авторы признают, что данная методика также требует усовершенствования, прежде всего в сторону точности оценки состояния акросом, которую можно повысить использованием микроскопа с более высокой разрешающей способностью.

В своих исследованиях мы первыми установили, что повышение молочной продуктивности коров дойного стада в среднем до 12043 кг молока при жирности 3,19 (опытная группа), по сравнению с 9349 кг, жирностью 3,95%, оказывает влияние на сохранность акросом спермиев. При этом показатель снижается на 11,2%. Данный показатель по группам составил соответственно 84,8 против 96,0% в пользу быков-производителей отечественной селекции. При этом достоверные различия установлены по количеству пригодных к криоконсервации эмбрионов в пользу животных указанной группы на 37,6% ( $P < 0,01$ ). В расчете на одного использованного по извлечению зародышей донора

различия были более существенными и составили 1,08 (2,94 против 1,86 соответственно,  $P < 0,01$ ).

Зоотехническая и ветеринарная практика отечественного и зарубежного скотоводства показывает, что с увеличением продуктивности у коров чаще наблюдаются задержания последов и другие функциональные нарушения. Такие животные несвоевременно проявляют признаки половой охоты и многократно безрезультатно осеменяются, что наносит значительный экономический ущерб сельскохозяйственным предприятиям. Требуется изучения вопрос о качестве и степени приживляемости зародышей полученных от коров после завершения продуктивного периода. До конца не выявлена эффективность использования высокопродуктивных коров-доноров выздоровевших после лечения от эндометрита. Большинство авторов, однако, отмечают, что количество и качество эмбрионов во многом зависит от состояния слизистой оболочки матки. При оставшихся очаговых воспалительных процессах их число в расчете на 1 донора сокращается на 50...70% от общего количества извлеченных зародышей.

В результате проведенных нами исследований разработан и предложен производству метод лечения и профилактики, обеспечивающий выздоровление после одного курса обработки препаратом ихтиоглюкобикарбонат (ИХБ) 49...60% животных потенциальных доноров эмбрионов. Оплодотворяемость за период до 90 дней после отела составила 78...87%. Разработана и прошла производственную проверку схема искусственной регуляции воспроизводительной функции у коров – потенциальных доноров эмбрионов. Она может быть применена в практических условиях работы пунктов и центров трансплантации эмбрионов.

Гибель эмбрионов является одной из причин снижения плодовитости высокопродуктивных коров в условиях интенсификации молочного скотоводства. Многочисленные факторы внешней среды могут вызывать нарушения нейро-гуморальной регуляции организма и изменять состояние трофических процессов в половых органах самок, что приводит к прерыванию внутриутробного развития, эмбриональным потерям и гибели

плодов. Несмотря на многообразие неблагоприятных факторов механизм их воздействия на эмбриогенез высокопродуктивных коров, как установлено исследованиями последних лет, заключается в изменении гормонального баланса и состава маточной среды, которая становится неблагоприятной для развития эмбриона.

Из приведённых литературных данных также видно, что в процессе эмбрионального развития всех животных имеются периоды, получившие название критических, когда адаптационные и защитные возможности организма значительно снижены. Как следует из представленных результатов исследований, именно эти периоды связаны с наибольшими эмбриональными потерями у крупного рогатого скота. Однако, существующие в настоящее время многочисленные методы предупреждения эмбриональной смертности направлены на последний, плодный период внутриутробного развития и не учитывают критические периоды раннего эмбриогенеза.

Исследования ученых в этой области имеют весьма различающиеся результаты. Одни, в своих исследованиях указывают на эффективность двукратной обработки тёлочек при искусственном осеменении прогестагеном, который первый раз инъецируется за 48 часов до введения спермы в половые пути и повторно – на 15-й день цикла.

Положительный эффект ученые объясняют тем, что инъекции препарата совпадают с критическими периодами развития зародышей на ранних стадиях беременности. Так, при пересадке 7-дневных эмбрионов, указывается данный возраст в пределах между 10 и 30 днями. В это время зародыш после выхода из прозрачной оболочки попадает поначалу в непривычные условия маточной среды, которые иногда не совсем соответствуют стадии его развития. Динамика уровня прогестерона у реципиентов с погибшими зародышами может быть такой же, как при нормальном половом цикле (4,86 нг/мл на 12-й день цикла и 0,63 нг/мл на 18 – й день). Второй такой период отмечен между 16 и 17-м днём. У реципиентов с прижившимися эмбрионами наблюдалось снижение уровня прогестерона с 4,86 нг/мл (на 12-й день)

до 1,88 нг/мл (на 18-й день), т. е. это указывает на лизис (рассасывание) жёлтого тела.

По данным ряда ученых целесообразным является создание базовой концентрации прогестерона в первые два дня после охоты, а затем повторное введение его в период активного жёлтого тела, т. е. на 6...7 день. Трёх-пятикратное введение различных доз прогестерона коровам снижает эмбриональную смертность на 10...15%. Десятикратная инъекция, начиная с 10 дня после осеменения, повышает оплодотворяемость тёлочек на 10...13%. Однократное применение прогестерона пролонгированного действия (капронат оксипрогестерона), сокращает эмбриональную смертность с 45,4 до 13,3%. По результатам исследований, эффективность применения инъекции гестагенных препаратов обеспечивает существенный подъем среднего уровня прогестерона в крови уже на 3-й день после его инъекции.

Однако, по результатам опытов других исследователей, применение прогестерона отрицательно сказывается на развитии и секреторной активности жёлтого тела и на его сохранении у коров. Они не установили статистически достоверного влияния инъекций прогестерона на выживаемость эмбрионов у коров и тёлочек, несмотря на то, что обработка стимулировала заметное увеличение размера и образование дополнительного количества жёлтых тел, а также рост в периферической крови данного гормона.

По результатам проведенных нами исследований, можно утверждать, что для повышения приживляемости эмбрионов целесообразно проводить двукратную обработку реципиентов: за 48 часов до пересадки и повторно через 10 дней (15-й день цикла), внутримышечно, в дозе 12 мл 12,5%-ного масляного раствора. Применение КОП-17 $\alpha$  телкам-реципиентам позволяет получить повышение приживляемости пересаженных эмбрионов на 16%, а в итоге увеличивает общую результативность технологии трансплантации.

Анализ достижений науки в области трансплантации эмбрионов позволяет сделать вывод о растущем интересе ученых и производителей к применению процесса витрификации в

общей технологии криоконсервации зародышей. Это в уже в недалекой перспективе приведет к появлению подобных более совершенных методов, используемых в практике животноводства. Данное направление науки позволит использовать преимущество процесса витрификации как общедоступный, относительно дешевый прием криоконсервации не только эмбрионов, но и значительно менее поддающихся заморозке яйцеклеток млекопитающих. Хотя и отмечают необходимость дальнейшей доработки и совершенствования методов криоконсервации в направлении их надёжности и результативности, а также использования более дешевых криопротекторных сред. Особый интерес вызывает применение таких приемов и методов, которые позволят значительно сократить продолжительность криоконсервации и при этом исключить до минимума вероятность физических и термических повреждений структурных элементов зародыша, вызванных межклеточной и внутриклеточной кристаллизацией. При этом в дальнейшем необходимо выяснить, какие основные факторы оказывают влияние на рост, развитие и, в целом, на приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов у реципиентов. Каждый из авторов разработали и предлагают свои технологические особенности криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием процесса витрификации.

По результатам наших исследований разработан способ замораживания эмбрионов крупного рогатого скота с использованием процесса витрификации, который предусматривает насыщение зародышей криопротектором, охлаждение их в парах жидкого азота и погружение в жидкий азот при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Эмбрионы сначала помещают на 3 минуты в первую защитную среду, затем – на 50...60 секунд во вторую защитную среду, а затем пайетту с эмбрионами переносят в пары жидкого азота на 60 секунд. При использовании такого метода отпадает необходимость в приобретении дорогостоящего оборудования, что удешевляет стоимость деконсервированного эмбриона. Срок замораживания сокращается в 13 раз и составляет около 6 минут.

Способ осуществляется следующим образом. Готовят первую защитную среду (10% раствор глицерина). Для этого отме-

ряют 1 мл химически чистого глицерина и доводят раствор до 10 мл фосфатно-солевым буфером Дюльбекко, приготовленным ранее с добавлением бычьего сывороточного альбумина (4 г/л), гентамицина (12 мкг/мл) и ампициллина (100 ед/мл).

Готовят вторую защитную среду. Для этого отмеряют 3 мл химически чистого глицерина, 1,5 мл химически чистого диметилсульфоксида, 0,5 мл раствора поливидона, смешивают компоненты и доводят раствор до 10 мл фосфатно-солевым буфером Дюльбекко, приготовленным так, как указано выше. Затем эмбрионы помещают в заранее приготовленную первую защитную среду на 3 минуты, далее – во вторую защитную среду на 50-60 секунд. Переносят эмбрионы в пайетту, которую помещают в пары жидкого азота на 60 секунд и далее погружают в жидкий азот при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Наиболее подходящие для глубокого замораживания эмбрионов криопротекторы ДМСО, в концентрации 1,5 моль и глицерин – 1,0...1,4 моль. Добавляют их в среду с эмбрионами в степени 0,2...0,3 моль. Оптимальная концентрация криопротекторов различна для эмбрионов разных видов животных.

На первом этапе исследований по криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота применялось медленное охлаждение со скоростью 0,1...0,3  $^{\circ}\text{C}$  в мин в период охлаждения от  $-60$  до  $-120^{\circ}\text{C}$ , затем переносили в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Оттаивают со скоростью от 2 до 10  $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . В качестве криопротектора используют ДМСО в 1,5-молярной концентрации. Выживаемость эмбрионов в разных опытах колеблется от 40 до 80%. Стельность после пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов составляет от 20 до 40%.

Предохраняющее действие криопротекторов обусловлено следующими факторами:

- уменьшением концентрации солей;
- уменьшением периода сжатия клеток при данной температуре;
- изменением пропорции замерзающего раствора при заданной температуре;
- снижением температуры эвтектической точки раствора.

Кроме «физической» составляющей эффективности криопротекторов, большое значение имеют химические свойства защитных сред по отношению к воде. Считается, что вода при наличии криопротекторов осмотически неактивна, однако все же является растворителем, изменяя тем самым концентрацию раствора. В то же время следует помнить, что криопротекторы оказывают многовекторное влияние на динамику возникновения, форму и размер кристаллов льда, а также на продолжительность периода рекристаллизации и т.п.

Для замораживания эмбрионов методами, которые требуют отступлений от оптимального режима дегидратации, такими как традиционное замораживание, либо посредством процесса витрификации, необходимо применение криопротектора в значительно более высоких концентрациях, в то же время изменяются и требования к самим защитным средам. Особое значение имеют такие параметры как: скорость образования стекловидной массы, стабильность при низких температурах, скорость девитрификации либо рекристаллизации.

В наших исследованиях, чтобы предотвратить действие осмотического шока и кристаллизации на эмбрион был разработан и использован витрификационный состав криопротектора, состоящий из двух защитных сред, куда поочередно помещают эмбрионы, и который должен был препятствовать кристаллизации и быстрому движению воды сквозь мембраны внутрь клеток и их разрушению. Полученные данные дают основания считать, что использование разработанного способа криоконсервации эмбрионов полученных от коров-доноров, может быть достаточно результативным. Приживляемость заморожено-оттаянных зародышей после пересадки реципиентам составила 44,1% и была на 3,3% ниже, по сравнению с традиционным использованием замораживающего устройства DB1 (Англия). Количество жизнеспособных эмбрионов после размораживания также было выше в контрольной группе и составило 81,8% против 77,3. Близкие результаты получены другими учеными, в опытах которых применение витрификационной среды позволило получить достаточно высокую приживляемость эмбрионов у реципиентов.

Предложенные нами усовершенствованные приемы повышения полноценности и приживляемости заморожено-оттаянных эмбрионов, представляют собой усовершенствованную технологию криоконсервации их с использованием высококонцентрированных защитных сред.

Усовершенствованные нами элементы технологии криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации внедрены в практику работы РУСП «Племзавод «Россь» Волковысского района Гродненской области. Она отвечает современным требованиям ускоренного размножения животных желательного генотипа и обеспечивает высокий уровень генетического потенциала полученных быков-трансплантантов, предназначенных для племпредприятий республики, а также высокую плодовитость и рост продуктивности дойного стада.

Таким образом, в результате проведенных комплексных исследований выяснилось, что есть возможность повысить эффективность трансплантации в скотоводстве путем применения следующих разработанных приемов повышения полноценности и приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов:

- комплексная оценка качества спермы на активность, выживаемость и состояние акросом спермиев;
- нормализация репродуктивной функции у доноров с использованием препарата ихтиоглюкобикарбонат;
- повышение приживляемости пересаженных реципиентам эмбрионов посредством применения экзогенного гормона капроната оксипрогестерона-17 $\alpha$ ;
- способ криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации;

Технологические элементы включены в методические рекомендации «Усовершенствованная технология криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред» (Утверждены НТС Минсельхозпрода протокол №8 от 10 ноября 2011 г).

Научно обоснована и практически доказана эффективность использования усовершенствованной технологии криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота, которая позволяет получить до 77% замороженно-оттаянных эмбрионов пригодных к пересадке, при 44% их приживляемости после пересадки реципиентам и обеспечивает интенсивное использование генетического потенциала высокоценных матерей.

1. Экономический эффект от использования приемов усовершенствованной технологии составил 113889 тыс. руб. в ценах 4.11.2012 г. и складывается из:

– увеличения выхода телят при использовании активного мотрона доноров на 13,5%, по сравнению с использованием стандартных выгульных площадок. При стоимости одного дополнительно полученного телёнка равной 540 тыс. руб. общий экономический эффект составил 38 880 тыс. руб. ( $72 \times 540$ );

– повышения оплодотворяющей способности коров дойного стада на 11,3%, в том числе от первого осеменения на 11,4%. Это способствовало сокращению сервис-периода на 30 дней, повышению молочной продуктивности на 329 кг, в расчёте на 1 голову. Экономический эффект на 1 голову составил по сравнению с контрольной группой + 241 тыс. руб. (1149 против 908 тыс. руб.). В расчёте на 305 голов дойного стада – 73505 тыс. руб. ( $305 \times 241$ );

– своевременной выбраковкой от 3 до 7% доз спермы по показателю нарушения целостности акросом спермиев. В приведённых расчётах эффективность пересадок эмбрионов складывается из дополнительного получения 0,3 телёнка на каждые 10 пересадок, что способствует снижению затрат средств на проведение данного мероприятия на 355 тыс. руб.;

– снижения затрат на получение телят-трансплантантов на 127 тысяч рублей и дополнительного получения одного теленка, стоимостью 1022 тыс. руб.

## Рекомендации по практическому использованию научных разработок

В целях повышения молочной продуктивности, профилактики послеродовых заболеваний и увеличения выхода эмбрионов и телят-трансплантантов рекомендуется:

– Применять ежедневный принудительный активный моцион для сухостойных коров включающий: препровождение их по прямому скотопрогону на общее расстояние 2 км до пастбища и обратно + пастба в течение светового дня. В зимний период использовать конструкцию кольцевого скотопрогона для активного передвижения животных в течение 30-40 минут. Способствует увеличению выхода телят на 13,5%;

– Проводить оценку спермы по состоянию акросом спермиев. Применять при сохранности от 95 до 97% обеспечивает дополнительное получение 38% полноценных эмбрионов, способствует повышению их приживляемости при пересадке реципиентам на 14%.

– Применение схемы лечения и профилактики послеродовых эндометритов на основе применения препарата ихтиоглюкобикарбонат, обеспечивает выздоровление после 1 курса обработки препаратом от 49 до 60% животных и их оплодотворяемость за период до 90 дней после отела от 78 до 87% .

– Инъекции препарата КОП-17а реципиентам в наиболее ответственные (критические) периоды репродуктивной функции влияют на приживляемость эмбрионов. После его введения в дозе 12 мл, 12,5%-го раствора за 48 часов до пересадки и повторно на 15-й день цикла она повышается на 16%.

– Предложенный способ криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред и процесса витрификации обеспечивает получение их приживляемости на уровне 44,1%. Позволяет сократить продолжительность замораживания в 13 раз.

2. Использование научно обоснованной усовершенствованной технологии криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота позволяет: дополнительно получить 38% полноценных

эмбрионов, обеспечить выздоровление после 1 курса обработки от 49 до 60% коров-доноров, увеличить выход телят-трансплантантов на 1,4...1,6 голов в расчете на каждые 10 пересадок, сократить продолжительность замораживания в 13 раз при снижении стоимости эмбрионов. Общий экономический эффект в расчете на 10 эмбриопересадок составляет 19753,4 тыс. руб. (акросомная оценка спермы – 9063 тыс. руб. + препарат ИХБ – 117,4 тыс. руб. + препарат КОП-17а – 10356 тыс. руб. + разработанный способ криоконсервации – 215 тыс. руб.), в ценах 04.11.2010.

## Список использованных источников

1. Республиканская программа по племенному делу в животноводстве на 2011 - 2015 годы (постановление Совета Министров РБ № 1917 от 31.12.2010 г) - Мн. 2011- С. 5-14.
2. Пестис, В.К. Технология создания высокопродуктивного дойного стада коров: учеб.-практ. пособие / В.К. Пестис, Горбунов Ю.А., Добрук Е.А. [и др.] - Гродно: ГГАУ, 2007 – 232 с.
3. Медведев, Г.Ф., Турчанов С.О. Дополнительный критерий, повышающий эффект отбора быков-производителей по плодовитости / Г.Ф. Медведев, С.О. Турчанов // Международный аграрный журнал. - 1999. - №1. – С.43-47.
4. Валюшкин, К.Д. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных: учебник / К.Д. Валюшкин, Г.Ф. Медведев. – Минск: Ураджай, 2001. – 869 с.
5. Горбунов, Ю.А. Методы оценки качества спермы быков-производителей / Ю.А. Горбунов, Н.Г.Минина, В.В.Жаркин [и др.] // Наука-производству: Материалы IV междунар. научно-практ. конф.: / УО “ГГАУ” Гродно, 2001. – С.183-184.
6. Горбунов, Ю.А. Результаты применения метода витрификации при криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота / Ю.А. Горбунов [и др.] // «Наука сельскохозяйственному производству и образованию»: Материалы междунар. научно-практ. конф. посвящ. 30-летию со дня основания Смоленского сельскохозяйственного института. – Смоленск, 2004. – С.88-91.
7. Коронец, И.П. Эффективность гормональных методов повышения многоплодия крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.02.01 / И.П. Коронец, В.В.Жаркин [и др.]; БелНИИЖ. - Жодино, 1991. - 24 с.
8. Sagge, K. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and to interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum / K. Sagge [et al.] // Biology of Reproduction. - 1998. – Vol. 59. – P. 777-783.
9. Иноземцев, В.П. Лазеры – в ветеринарную практику / В.П. Иноземцев, И.И. Балковой // Ветеринария. - 2007. - №4. - С. 3-6.

10. Зенкин, А.В. Практика применения безмедикаментозной терапии / А.В. Зенкин, Д.Н. Волойшников // Молочное и мясное скотоводство. – 2011. - № 4. – С. 34-36.
11. Rubin, M. Manuel d'Acupuncture Veterinaire / M. Rubin, Gravalho E.G. – Paris: Maloine S.A. Editeur. – 2006. – 85 p.
12. Михайлов, Н.В. Механизм лечебно-стимулирующего действия луча лазера на организм животных и повышение их продуктивности / Н.В. Михайлов – Казань, 1995. – 199 с.
13. Антонюк, В.С. Биотехнологические способы повышения эффективности оплодотворения сельскохозяйственных животных / В.С. Антонюк – Мн.: Ураджай, 1998.- С.98-104.
14. Казаровец, Н.В. Состояние и перспективы развития биотехнологии в Беларуси / Н.В. Казаровец //Доклад Департамента образования, науки и кадров Минсельхозпрода РБ. Мн., 2003. – С.3-19.
15. Якубовский, М.В. Концепция о приоритетах и путях повышения эффективности разработок аграрной науки в Республике Беларусь / М.В. Якубовский // Доклад Академии аграрных наук Республики Беларусь. Мн., 2008. – С.11-12.
16. Сергеев, Н.И. Перспективы применения биотехнологии в животноводстве / Н.И. Сергеев // Междунар. с.-х. журн., 1997. - №5. – С.87-91.
17. Будевич, И.И. Состояние, практика использования и перспективы трансплантации эмбрионов в селекции крупного рогатого скота Республики Беларусь / И.И. Будевич // Конкурентоспособное производство продукции животноводства в Республике Беларусь: Сб. тр. междунар. науч.-произв. конф. (23-24 апреля, г. Жодино). – 1998. – С.90-91.
18. Белоус, А.М., Кривоносирование репродуктивных клеток/ А.М. Белоус, В.И Грищенко, Ю.С. Парашук – Киев: «Наукова думка», 2006. – 208 с.
19. Будевич, А.И. Кривоносирование эмбрионов крупного рогатого скота / А.И. Будевич // Генетика и селекция на рубеже XXI века / Сб. работ конф. молод. ученых (под ред. академика Н.А. Картеля). – Мн.: ИПЭ, - 1999. – С.92-97.

20. Бабак, И.М. Влияние активного моциона на функциональное состояние организма животных реципиентов /И.М. Бабак // Технология производства продуктов животноводства. Киев, 2001.- С. 11-12.

21. Эрнст, Л.К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных/ Л.К.Эрнст, Н.И.Сергеев – М.: Агропромиздат, 1999, - С.190-193.

22. Lehn-Jensen, H. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing / H. Lehn-Jensen, W.F. Rall // Theriogenology, 19, 2003. – P.263-277.

23. Leibo, S.P. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function cooling rate/ S.P.Leibo, J.J.McGrath, E.G. Gravalho // Cryobiology, 15, 2007. – P.257-271.

24. Горбунов, Ю.А., Будевич, И.И. Способ трансплантации эмбрионов. Положительное решение Гос. комитета РФ о выдаче патента № 503232 от 28. 07. 1993 г.

25. Lovelock, J.E. The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing / J.E. Lovelock // Biochim. Biophys. Acta, 11, 2003. – P.28-36.

26. Горбунов, Ю.А. Результаты применения метода витрификации при криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота / Ю.А.Горбунов, Н.Г.Минина, М.В.Шелудяков, А.А.Козел // «Наука сельскохозяйственному производству и образованию»: Материалы междунар. научно-практ. конф. посвящ. 30-летию со дня основания Смоленского сельскохозяйственного института. – Смоленск, 2004. – С.88-91.

27. Wray, K.R. The influence of semen quality, as determined by percent intact acrosoms on fertilization rates in superovulated cows / K.R Wray, M.F. Spire // Theriogenology, 2004, 21, №1. – 236 p.

28. MacFarlane, D.R. Devitrification in glass-forming aqueous solutions / D.R. MacFarlane // Cryobiology, 23, 2006. – P.230-244.

29. Taylor, M.J. Physico-chemical principles of low temperature biology / M.J. Taylor // W: The Effects of Low Temperatures on Biological Systems. B.W.W. Grout, London, 2007. – P.3-37.

30. Рекомендации по трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве // Методические рекомендации – Жодино, 1997. – С.3-10.
31. Ali, J., Shelton J.N. Vitrification of preimplantation stages of mouse oocytes / J.Ali, J.N. Shelton // *J. Reprod. Fertil.*, 98, 2003. – P.459-465.
32. Crowe, J.H. Stabilization of biological membranes at low water activities/ J.H.Crowe, L.M.Crowe, R.A.Mouradian // *Cryobiology*, 20, 1993. – P.346-356.
33. Papis, K. Composition of vitrification media on survival of rabbit embryos / K.Papis, T.Kojima, N.Oguri // *Cryobiology*, 30, 1993. – P.54-59.
34. Papis, K. Study of vitrification of rabbit embryos – an effect of sucrose addition / K. Papis, T.Kojima, N.Oguri // *Cryobiology*, 28, 2001. – P.99-102.
35. Bielański, A. Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich / A. Bielański, M.Tischner // *Universitas*, Kraków, 2003. – S.141-147.
36. Leibo, S.P. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function cooling rate / S.P.Leibo, J.J.McGrath, E.G. Gravalho // *Cryobiology*, 15, 2007. – P.257-271.
37. Renard, J.P. Sucrose dilution: a technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw / J.P.Renard, Y.Heyman, P.Lemonie, J.Plat // *Theriogenology*, 19, 2003. – 145 p.
38. Nakagata, N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification / N. Nakagata // *J. Reprod. Fertil.*, 87, 1999. – P.479-483.
39. Papis, K. Effect of the composition of vitrification media on survival of rabbit embryos / K.Papis, S.Fujikawa, T.Kojima, N.Oguri // *Cryobiology*, 30, 2003. – P.98-105.
40. Papis, K. Study of vitrification of rabbit embryos – an effect of sucrose addition / K. Papis., T.Kojima, N.Oguri // *Cryobiology*, 28, 2001. – P.99-102.

41. Rall, W.F. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification / W.F. Rall, G.M. Fahy // *Nature*, 313, 2005. – P.573-575.

42. Rall, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification / W.F.Rall // *Cryobiology*, 24, 2007. – P.387-402.

43. Szell, A. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour / A.Szell, N.J. Shelton // *J. Reprod. Fertil.*, 76, 2006. – P. 401-408.

44. Scheffen, B. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification / B. Scheffen, P.Van der Zwalmen, A.Massip // *Cryo-Lett.*, 7, 2006. – P.260-269.

45. Whittingham, D.G. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C / D.G.Whittingham, M.Wood, J. Farrant, H.Lee, J.A. Halsey // *J. Reprod. Fertil.*, 56, 2009. – P.11-21.

46. Whilmut, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryo protective agent and stage of dewelopment on survival of mouse embryos during freezing and thawing / I. Whilmut // *Life sci.*, 11, 2012. – P.1071-1079.

47. Meryman, H.T. Freezing injury from «Solution effects» and its prevention by natural and artificial cryoprotection / H.T.Meryman, R.J.Williams, M.Douglas // *Cryobiology*, 14, 2007. – P.287-302.

48. Oda, K. Osmotic shock of fertilized mouse ova / K.Oda, W. E.Gibbons, S.P. Leibo // *J. Reprod. Fertil.*, 95, 2002. – P.737-747.

49. Schneider, U. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos / U.Schneider, P.Mazur // *Theriogenology*, 21, 2004. – P.68-79.

50. Zwierzchowski, L. *Biotechnologia zwerząt* / L.Zwierzchowski, // Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 2007. – S.254-259.

51. Бронская, А.В. Действие возраста гамет на оплодотворяемость яиц, пренатальную выживаемость и рождаемость / А.В. Бронская // Докл. ВАСХНИЛ. – 2004. - №12. – С.31-32.

52. Горбунов, Л.В. Заморожування ооцитів та ембріонів савців / Л.В.Горбунов, М.Д. Безуглій // Утримання годівля тварин, техніка, технології селекція та відтворення, економіка,

маркетинг енергоресурсозбереження. / УААН. Науково – технічний бюлетень. – Харків, 2001. - №106. – С.68-84.

53. Niemann, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs / H.Niemann // *Theriogenology*, 35, 2001. – P.109-124.

54. Mazur, P. Kinetics of water loss from cells at sub-zero temperatures and the likelihood of intracellular freezing / P.Mazur // *J. Gen. Physiol.*, 47, 2003. – P.347-369.

55. Шаран, М.М. Використання композиційних кріопротекторів при вітріфікації ембріонів // Використання трансплантації ембріонів в селекції і відтворенні сільськогосподарських тварин: Матеріали Міжнародної науково – виробничої конференції, Асканія – Нова, 1997 / М.М. Шаран // УААН Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова “Асканія-Нова”. – Київ Асканія – Нова, 1997. – С.89-91.

56. Коркин, В.А. Приспособления и устройства для низкотемпературной консервации эмбрионов животных / В. А. Коркин, А. Д. Бугров // *Трансплантация эмбрионов с/х животных*. – Москва, 1988. – С.84-86.

57. Willadsen, S.M. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing / S.M. Willadsen, K. Elliot, J. Whelan // *The Freezing of mammalian embryos.*, 2007. - P.175-189.

58. Белоус, А.М. Молекулярные механизмы криповреждения биомембран / А.М.Белоус, В.А.Бондаренко, Т.П.Бондаренко // *Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Биофизика*. - 1997. – Т.9. – С.80-114.

59. Rall, W.F. Innocuous biological freezing during warming / W.F.Rall, D.S.Reid, J.Farrant // *Nature*, 286, 2000. - P.511-514.

60. Bielański, A. *Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich*/ A.Bielański, M.Tischner // *Universitas, Kraków*, 1993. – S.141-147.

61. Wood, M.J. Preservation of mouse embryos by twostep freezing / M.J.Wood, J.Farrant // *Cryobiology*, 17, 2000. – P.178-180.

62. Осташко, Ф.И. Анализ режимов замораживания эмбрионов млекопитающих / Ф.И.Осташко, Н. Д. Безучный, Е. Г. Волкова // Трансплантация эмбрионов у крупного рогатого скота. Тез. докл. симпоз. Тарту, 22-23 окт. / ЭстНИИЖ Тарту, 1996. – С.46-48.
63. Пасіцький, М.Д. Порівняння надшвидкого методу заморожування ембріонів із загальноприйнятим / М.Д. Пасіцький // Використання трансплантації ембріонів в селекції і відтворенні сільськогосподарських тварин: Матеріали Міжнародної науково – виробничої конференції, Асканія – Нова, 1997– С.66-69.
64. Arav, A. Vitrification of oocytes and embryos / A. Arav // W: Embryonic Development and Manipulation in Animal Production, Portland Press, London, 2002. – P.255-264.
65. Rall, W.F. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification / W.F.Rall, G.M. Fahy // Nature, 313, 1995. – P.573-575.
66. Шаловило, С.Г. Кріоконсервація ембріонів корів – донорів методом вітріфікації / С.Г. Шаловило // Матеріали доповідей науково – виробничої конференції, Київ., 1995. – С.314 – 315.
67. Шаран, М.М. Кріопротекторі при вітріфікації ембріонів // Матеріали Міжнародної науково – виробничої конференції, / М.М. Шаран // УААН Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова “Асканія-Нова”. – Київ Асканія – Нова, 2002. – С.57-62.
68. Zwierzchowski, L. Biotechnologia / L.Zwierzchowski, K. Jaszczak, J. Modlinski // Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1997. – S.491-493.
69. Rall, W.F. Cryopreservation of mouse embryos at - 196°C by vitrification / W.F.Rall // Nature, 313, 2001. – P.341-345.
70. Lopez-Gatius, F. Pregnancies and live offspring following transfer of one-step vitrified bovine embryos / F.Lopez-Gatius, J.Comon-Urgel // Zuchthyg, 24, 1999. – P.255-258.
71. Hamano, S. Full term development of in vitro-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. / S.Hamano, A.Koikeda, M.Kuwayama, T.Nagai //Theriogenology, 38, 2002. – P.185-190.

72. Bielański, A. Survival in vitro of zona pellucida free mouse embryos after cooling by conventional two-step or vitrification methods / A. Bielański // *Cryo-Lett.*, 8, 2007. – P.294-301.

73. Gajda, B. Transfer of vitrified sheep morulae / B.Gajda, Z.Smorąg, J.Wierzbowski, J.Jura, B.Wieczorek // *Zuchthyg.*, 24, 1999. – P.94-100.

74. Szell, A. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour / A. Szell, N.J Shelton // *J. Reprod. Fertil.*, 76, 1996. – P. 401-408.

75. Valdez, C.A. Confirmation by cryo-electron microscopy of the absence of crystalization using a vitrification solution / C.A.Valdez, O. Abas Mazni, H. Kanagava, S.Fujikawa // *Cryo-Lett.*, 11, 2000. – P.351-358.

76. Scheffen, B. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification / B.Scheffen, P.Van der Zwalmen, A.Massip // *Cryo-Lett*, 7, 2006. – P.260-269.

77. Горбунов, Л.В. Визначення мінімальної концентрації кріопротектора за якої відбувається вітрифікація заморожено – відталого середовища, як результат використання надшвидкого охолодження та відігрівання / Л.В.Горбунов // Збірник науково – практичної конференції. - Львів, 1997. – С.276-278.

78. Горбунов, Л.В. Разработка технологических устройств, що забезпечують надшвидке заморожування і разморожування ооцитів та ембріонів савців / Л.В Горбунов., М.Д Безуглій., І.А. Морозова // Утримання годівля тварин, техніка, технології селекція та відтворення, економіка, маркетинг енергоресурсозбереження. / УААН. Науково – технічний бюлетень. – Харків, 2001. - №105. – С.78-93.

79. Безуглій, М.Д. Трансплантація деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби без виведення кріопротектору / М.Д. Безуглій, О.В. Медведовський // Селекційно – біотехнологічні методи використання генетичного потенціалу сільськогосподарських тварин: Тез. докл. конф. (16-17 лютого 1994 р.). – Київ, 1994. – 13 с.

80. Будевич, А.И. Биотехнологические приемы и методы интенсификации воспроизводства стада в животноводстве /

А.И.Будевич // Монография. – Мн.: УП “Технопринт”, 2004. - 96 с.

81. Нови, Л. Применение быстрого способа криоконсервирования эмбрионов в практической нехирургической трансплантации / Л. Нови, А. Ятичек, М.Зак // Прага: «Ветер. мед.», 1995. Вып. 30. - С.577-584.

82. Bielanski, A. Effect of bovine rhinotracheitis virus (IBRN) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) on survival of prehatched bovine embryos /A. Bielanski, E.L.Singh, W.C.Have // Theriog. – 2007. vol. 27, I. – 214 p.

83. Szell, A. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour / A. Szell, N. Shelton // Journal Reprod. Fertil. - 2006. - Vol. 76 - P. 401-408.

84. McBride, C.E. Evaluation of rabbit sperm acrosomal integrity and fertilizing ability by use of vital stains/ C.E. McBride, R.A. Fayrer-Hosken, P.N. Srivastava, B.G. Brackett // Mol. Reprod. And Dev. – 2000. – 26, №1. – P.30-39.

85. Максимов, Ю.Л. Новый метод оценки семени быков-производителей / Ю.Л. Максимов// - В кн.: Наука – сельскому хозяйству. Хабаровск, 1992, 11.

86. Betteridge, K.J. The anatomy and physiology of preattachment bovine embryos // K.J. Betteridge / Theriog. – 1998. – vol. 29. – P.513-516.

87. Bondzio, A. Zur Problematik der Qualitätsbeurteilung von Spermien mittels biochemischer Parameter // A. Bondzio, B.Schulke, S.Risse / Monatsh. Veterinarmed. – 1992. – 47, № 6 – P.301-306.

88. Антонюк, В.С. Характер действия капронат оксипрогестерона на динамику гематологических показателей у реципиентов // В.С. Антонюк, Ю.А. Горбунов, Л.Л. Леткевич / Научные основы развития животноводства в Республике Беларусь / Межведомствен. сборник, Минск. – вып. 24, 2003. – С.26-31.

89. Казеев, Г.В. Обоснование выбора оптимального времени искусственного осеменения коров / Г.В. Казеев // Роль и значение метода искусственного осеменения с.-х. животных в прогрессе животноводства XX и XXI веков: материалы

Междунар. науч.-практ. конф./ ВИЖ – Дубровицы, 2004. - С. 173-176.

90. Казеев, Г.В. Наставление по применению комплекса гормональных препаратов для синхронизации половой охоты у телок/ Г.В. Казеев/ М.: Россельхозиздат, 1999. – 14 с.

91. Boyd, H. Oestrous cycles in Ayrshire cows before and after insemination / H. Boyd // Journal Vet. Res. –2003. – Vol. 92. – P. 427-428.

92. Clark, W. Synthesis and accumulation of progesterone in plasma or milk / W. Clark, J. Rutter // Dewelor. Biol. – 2002. - №29. – P. 68-70.

93. Шейкин, В.Н. Воспроизводство на молочном комплексе «Щапово» /В.Н.Шейкин // Науч. тр. ВАСХНИЛ: Технология промышленного производства молока.- 1998.- С. 105-109.

94. Quinn, P.J. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing / Quinn, P.J., White J.C., Cleland K.W. J. // Reprod. Fertil., 2009, v. 18. – P.209-220.

95. Seager, P.L. Effect of thawing rate and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws // P.L.Seager, W.C.Becker, J.K. Nillers /J. Anim. Sci., 2003, v. 42. – P.932-936.

96. Thatcher, W. W. Maternal recognition of pregnancy in cattle // W. W. Thatcher, F. F. Bartol, J.J.Knikerbocker, J.S. Curl / J. Paury Sci. –2004. – vol. 67. – P.2793-2811.

97. Watson, P.F. The effect cold shock on sperm cell membrane // P.F. Watson / Effect of low temperatures on biological membranes. – 2001. – P.189-218.

98. Землянкин, В.В. Морфобиохимические показатели крови у коров с фолликулярными кистами яичников / В.В. Землянкин, А.М. Семиволос // Проблемы акушерско-гинекологической патологии и воспроизводства с.-х. животных: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию А.П. Студенцова / Казан. гос. акад. вет. медицины. – Казань, 2003. - Ч. 1. – С. 148-151.

99. Жук, Н.Ф. Биотехнологические аспекты получения двоен в молочном скотоводстве на основе метода трансплантации эмбрионов. Автореф. дис. ... канд. сельскохозяйств. наук: 06.02.01 / Н.Ф.Жук // Бел НИИЖ. – Жодино. 1993. – 3 с.
100. Beam, S.W. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat / S.W. Beam, W.R. Butler // *Biology of Reproduction*. - 2007. – Vol. 56. – P. 133-142.
101. Pope, W. F. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss / W. F. Pope // *Biol. Reprod.* – 2008. – Vol. 39. – P.999-1003.
102. Sherman, J.K. Effect of repeated freeze thaw cycles on survival of bull spermatozoa / J.K. Sherman // *J. Dairy Sci.*, 1999, v. 42. – P.94-99.
103. Pope, W. F. Physiology of preattachment bovine embryos / W. F. Pope // *Biol. Reprod.* – 2009. – Vol. 40. – P.324 -328.
104. Bielanski, A. Effect of bovine rhinotracheitis virus (IBRN) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) on survival of prehatched bovine embryos / A. Bielanski, E.L. Singh, W.C. Have // *Theriog.* – 2007. vol. 27, I. – 214 p.
105. Будевич, И.И. Использование гестагенов в технологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота / И.И.Будевич, Ю.А. Горбунов, А.И.Будевич // *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: Тез.докл. 6-й межд. научн. – практ. конф., (г. Горки, 19-20 июня 2003 г.) - Горки, 2003. – С.38-40.*
106. Suzuki, T. Transfer of bovine frozen embryos by one step straw method / T. Suzuki // *Japan Journal Anim. Reprod.* – 2003. - Vol. 29, № 3. - P. 162-163.
107. Rall, W.F. Analysis of slow warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physico-chemical methods / W.F. Rall, D.D. Reid, C. Polge // *Theriogenology*, 21, 2004. – P.106-121.
108. Tanabe, T. Comparative fertility of normal and repeat – breeding cows as embryo recipients / T. Tanabe, H.Hawk, J.Hasler // *The - theriogenology*, 2005, 23, 4, P.687-696.
109. Антонюк, В.С. Рекомендации по трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве: Утв. НТС Мин-

сельхозпрода РБ (протокол № 17 от 24. 12.1995) // М-во сельского хоз-ва и продовольствия РБ, БелНИИЖ; сост. В.С.Антонюк, И.И.Будевич, Ю.А. Горбунов и [и др.] - Жодино, 1995. – 48 с.

110. Leibo, S.P. A onestep in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos / S.P. Leibo // *Cryo-Lett.* - № 4. - 2003. - P.387-400.

111. Гарбузов, А.А. Восстановление воспроизводительной функции у высокопродуктивных коров и использование их в качестве доноров эмбрионов: Автореферат дис. ... к-та биол. наук: 16.00.07. /А.А.Гарбузов // Витебск. – 2005. – 22 с.

112. Гавриченко, Н.И. Эндокринный статус и метаболический профиль крови у коров в процессе восстановления эстрального цикла / Н.И. Гавриченко // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. / НПЦ «НАН Беларуси по животноводству» – Жодино, 2006. - Т. 41. - С. 16-22.

113. Рябых, В.П. К вопросам о критических периодах в развитии трансплантированных эмбрионов крупного рогатого скота / В.П.Рябых, К.И Бахитов., А.Г. Логинов // Трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота: Тр./БелНИИживотноводства. – Жодино, 1989. – С.47-49.

114. Saacke, R.G., White J.M. Semen quality tests and their relationship to fertility / R.G. Saacke // – In: IV Techn. Conf. Art. Insem. Reprod. NAAB, Chicago, 2002, P.2-7.

115. Scheffen B. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification / B. Scheffen, P.Van der Zwalmen, A.Massip // *Cryo-Lett.*, 7, 2006. – P.260-269.

116. Наук, В.А. Структурные и биохимические криповреждения эмбрионов сельскохозяйственных животных / В.А.Наук // *Криобиология.*- 1995.- №2.- С.47-50.

117. Шаловило, С.Г. Кріоконсервація ембріонів корів – донорів методом вітріфікації / С.Г.Шаловило // *Матеріали доповідей науково – виробничої конференції.* - Київ, 1995. – С.314 – 315.

118. Gajda, B. Transfer of vitrified sheep morulae / B.Gajda, Z. Smoraq, Z.Wierzbowski // *Zuchthyg.* - 1999. - Vol. 24. - P.94-100.

119. Tanabe, T. Comparative fertility of normal and repeat – breeding cows as embryo recipients / T. Tanabe, H. Hawk, J. Hasler // *Theriogenology*, 2005, 23, №4, P.687.

120. Антонюк, В.И. Рекомендации по трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве / В.И. Антонюк, И.И. Будевич, Ю.А. Горбунов и др. // *Методические рекомендации – Жодино*, 1997. – С.3-10.

121. Лободин, К.А. Клинико-эндокринологическая характеристика послеродового периода у высокопродуктивных молочных коров / К.А. Лободин // *Проблемы акушерско-гинекологической патологии и воспроизводства с.-х. животных: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию А.П. Студенцова / Казан. гос. акад. вет. медицины. – Казань, 2003. – Ч. 1. – С. 205-210.*

122. Горбунов, Ю.А. Практические советы по организации работы групп и звеньев по воспроизводству, повышению оплодотворяемости коров и телок, увеличению выхода телят в хозяйствах Минской области / Ю.А. Горбунов (Утв. НТС Минского облсельхозпрода (протокол №9, 24 октября 1997 г); Бел НИИЖ. – Мн.: 1997. – 92 с.

123. Горбунов, Ю.А. Рефрактометрический способ определения оптимального срока осеменения коров / Ю.А. Горбунов // *Животноводство. - 1995. – № 9. – С. 56.*

124. Горбунов, Ю.А. Диагностика физиологического состояния организма коров методом акупунктуры / Ю.А. Горбунов // *Ветеринарные и зооинженерные проблемы животноводства: материалы 1-й Междунар. науч.-практ. конф. / УО «ВГАВМ» - Витебск, 1996. – С. 174–175.*

125. Горбунов, Ю.А. Диагностика физиологического состояния органов воспроизведения свиней методом акупунктуры / Ю.А. Горбунов // *НТИ и рынок. - 1998. - № 1. – С. 35-37.*

126. Donald, H.P., Evidens of gene controlled sterility in bull / H.P. Donald, J.L. Hancock // *J. Agric. Sci. comb.* 2003, 43, 178.

127. Berndtson, W.E. Evaluation of frozen semen / W.E. Berndtson, B.W. Pickett // *Current therapy in Theriogenology*, 2000. – P.347-354.

128. Черномаз, Л.А. Изучение морфологии половых клеток быка при хранении спермы (электронно-микроскопическое исследование) / Л.А. Черномаз // Автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук. Львов, 2003. - 41 с.

129. Шелудяков, М.В. Повышение оплодотворяемости телок-реципиентов посредством экзогенных гонадотропинов /М.В. Шелудяков // *Фундаментальные и прикладные проблемы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных в изменившихся условиях системы хозяйствования и экологии: Сб. науч. тр. / Ульяновская гос. с.-х. академия – Ульяновск, 2005. Т.2. – С.314-317.*

130. Leibo, S.P. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function cooling rate /S.P.Leibo, J.J.McGrath, E.G. Gravalho [et al.]// *Cryobiology*.- № 15. - 2007. - P.257-271.

131. Kolb, E. Biochemische gesichtspunkte dev entstehung and verhutung dev fruhembryonalen vevluste bei Haustieren / E. Kolb // *Tierzucht*. 2002. – vol. 36. – P.468-471.

132. Шелудяков, М.В. Метод криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота // «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы»: Сб. тр. / М.В.Шелудяков // УО «ГГАУ» - Гродно, 2003. – Т.1, - Ч.2 – С.165-167.

133. Шелудяков, М.В. Способы профилактики и лечения эндометритов у коров / М.В. Шелудяков, Н.Г.Минина, А.А.Козел и др.// «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы»: Сб. тр. / УО «ГГАУ» - Гродно, 2004. – Т.3, - Ч.3 – С.141-143.

134. Горбунов, Ю.А. Различные схемы стимуляции полиовуляции у коров-доноров после завершения продуктивного периода / Ю.А. Горбунов, Н.Г. Минина, Козел А.А. // «Сельское хозяйство проблемы и перспективы»: Сб. науч. тр. / УО «ГГАУ» - Гродно, 2004. – Т.3, - Ч.4. – С.209-210

135. Грызлов, В.П. Эмбриональная смертность у коров и меры ее предупреждения / В.П. Грызлов // Сб. работ СибНИИЖ. – Новосибирск, 2006. – С.23-27.

136. Шелудяков, М.В. Метод искусственной регуляции воспроизводительной функции у коров-доноров эмбрионов / М.В. Шелудяков // Материалы VI междунар. научн.-практ. конф. посвящ. 70-летию кафедры разведен. и генетики с.-х. жив. – Горки: УО «БГСХА», 2003. – С.338-341.

137. Нови, Л. Применение быстрого способа криоконсервирования эмбрионов в практической нехирургической трансплантации (Чехия) / Л.Нови, А. Ятичек, М. Зак // Прага: «Ветер. мед.», 2005. Вып. 30. - С.577-584.

138. Чалаев, А.М. Молочная продуктивность и сроки осеменений коров / А.М. Чалаев // Зоотехния. – 2003. - №6. – С.29-30.

139. Bash, S. Zuchtigienische Aspekte der Donoren auswahl / S. Bash, F. Muller // «Tierzucht», 2006, 40, 55, - S. 29.

140. Минина, Н.Г. Результаты работы по трансплантации эмбрионов в племзаводе «Россь» / Н.Г.Минина, А.А. Козел, М.В. Шелудяков, А.И. Будевич // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства: Сб. тр. II междунар. науч.–практ. конф. г. Витебск / УО «ВГАВМ», 2002. – С.178-179.

141. Черемисинов, Г.А. Определение оптимального времени для осеменения / Г.А. Черемисинов // Проблемы эндокринологии: Тез. докл. научн. конф., Воронеж, - 1995 г. / Акад. наук СССР Воронежск. с.-х. ин-т. – Воронеж, 1995. – С.34-38.

142. Будевич, А.И. Совершенствование технологии искусственного осеменения крупного рогатого скота, / А.И. Будевич, Г.Г. Мордань // Весці Акадэміі аграрных навук Рэспублікі Беларусь. Сер. сельгас. навук. – Мн., 2002. - №3. – С.77-79.

143. Светлов, П.Г. Значение повреждений эмбриона на ранних стадиях развития в патогенезе внутриутробных заболеваний / П.Г.Светлов // М.: Медгиз, 1999. – 180 с.

144. Sreenan, I.M. Early embryonic mortality in cow: its relationship with progesterone concentration / I.M.Sreenan, M.G. Diskin // J. Veter. Rec. – 1993. – Vol. 112.-P.517-521.

145. Лебедев, С.Г. Продуктивность и воспроизводительная способность коров // С.Г. Лебедев, В.К. Смунова / Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства: Сб. тр. II междунар. науч. – практ. конф. г. Витебск - УО «ВГАВМ», 2002. – С.153-155.

146. Медведев, Г.Ф. Факторы, обуславливающие сокращение сроков использования высокопродуктивных коров в качестве доноров эмбрионов / Г.Ф., Медведев, Д.С. Долина // Научные основы интенсивного развития животноводства: Тез. докл. науч. междунар. конф., Горки, 1-3 сентября 1995г / Белорус. с.-х. акад. – Горки. 1995. – С.54–55.

147. Медведев, Г.Ф., Мероприятия по повышению эффективности использования высокопродуктивных коров и коров – доноров эмбрионов: Сб. науч. тр. «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства» / Г.Ф. Медведев, Н.В.Казаровец, Н.И Гавриченко, и др. // Белорус. с.-х. акад. – Горки, 1996. – С.198-200.

148. Медведев, Г.Ф. Предельные сроки использования высокопродуктивных коров в качестве доноров эмбрионов // Селекционно-генетические и биотехнологические проблемы разведения крупного рогатого скота: Тез. докл. II Межгос. научн.– практ. конф., Брест. 23 -25 мая 1995 / Г.Ф. Медведев, Н.В.Казаровец, Н.И Гавриченко, и др. // Брестское Госплемживобъединение. – Брест, 1995. – С.69-71.

149. Республиканская программа по племенному делу в животноводстве на 2011 - 2015 годы (постановление Совета Министров РБ № 1917 от 31.12.2010 г)- Мн. 2011- С. 5-14.

150. Третевич, В. Влияние моциона на молочную продуктивность коров /В.Третевич, Р.Федорук // Молочное и мясное скотоводство, 1985; Т.5.- С. 11-12.

151. Евсейчик, А.И. Кольцевой прогон активного моциона животных /А.И.Евсейчик // Журнал «Сельское строительство», Москва, 2000.- № 11.- С. 32-34.

152. Добрук, В.М. Применение активного моциона коров на комплексах с промышленной технологией: метод. указания /

В.М.Добрук, Ю.А.Горбунов, Н.Г.Минина, В.М., П.З.Каштелян и др. – Гродно: ГГАУ, 2012 – 40 с.

153. Борискин, Н. Влияние сухостойного периода на воспроизводительную функцию коров / Н. Борискин, Ю. Юсупов, А. Гавриков // Молочное и мясное скотоводство, 2005.- №4.- С.12-13.

154. Лопатко, М. Пути улучшения работы по воспроизводству стада в молочном скотоводстве / М.Лопатко // Сб. науч. тр.: Биол. и технол. основы повышения продуктивности с.-х. животных.- Ростов на Дону.- 1999.- С. 9-12.

155. Горбаченко, Н. Активный моцион дает хорошие результаты / Н. Горбаченко, Л. Войтюк // Молоч. и мяс. скот-во, 1990.- №3 – С. 27-28.

156. Steinberger, S. Vollweide mit Winterkalbung aus Bayern. Osterreichische Fachtagung fur Biologische Landwirtschaft gemass Fortbildungsplan des Bundes "Low-Input" Vollweidehaltung von Milchkuhen in Osterreich / S. Steinberger, P. Rauch, H. Spiekers // Arch. Andrology. - 2008. - Vol. 6. - P. 105-107.

157. Голдырев, Т.С. Влияние активного моциона сухостойных коров на продуктивность / Т.С.Голдырев, Х.В.Загитов // Интенсивные методы повышения продуктивности животноводства в Сибири, 2007.- С.47-51.

158. Леткевич, О.И. Оценка эффективности разных видов моциона на молочном комплексе с беспрвязно-боксовым содержанием / О.И.Леткевич, С.И.Плященко, В.В. Жаркин //БелНИИ животноводства, Жодино, 1995.- 8с. (деп. во ВНИИТЭИСХ 26.03.1996).

159. Кузьмич, Р.Г. Актуальные проблемы воспроизводства стада на крупных молочно-товарных комплексах Республики Беларусь / Р.Г. Кузьмич, В.В.Пилейко, Ю.А. Рыбаков // Учёные записки УО“ВГАВМ”: научно – практический журнал.- 2006.- Т.42, вып.2, Ч. 1.- С.102-105.

160. Науменков, А.Н. Значение моциона для животных /А.Н.Науменков // Молочное и мясное скотоводство - 2002. - №1. - С.20-22.

161. Кудрявцева, Г.А. Влияние дозированного моциона на некоторые клинико – физиологические показатели у коров / Г.А.Кудрявцева // Биохимия, морфология, физиология с.-х. животных, 2000.- С.59-61.

162. Белобороденко, А.М. Влияние моциона на половую функцию и течение послеродового периода у коров – первотёлок /А.М. Белобороденко // Разведение, кормление и содержание в условиях промышленной технологии молочного скота, 2008. – С.51-55.

163. Юлдашев, Ф. О повышении усвояемости кормов /Ф. Юлдашев// Молочное и мясное скотоводство - 1998. - №1.- С. 32-33.

164. Попов, С. Влияние моциона на обмен веществ коров – первотёлок / С.Попов // Молочное и мясное скотоводство, 2000. - №2.- С. 30-31.

165. Бабак, И.М. Влияние активного моциона на функциональное состояние организма животных /И.М. Бабак // Технология производства продуктов животноводства. Киев, 2001.-С. 11-12.

166. Попов, С. Влияние моциона на воспроизводительные и продуктивные качества коров / С.Попов // Молочное и мясное скотоводство, 1999. - №8.- С. 17-18.

167. Pasierbski, Z. Wlyw aktywnego i pasywnego spaceruna winiti produkcyjne krow mlecznych / Z. Pasierbski // Preglad hodowlani. - 2008. - Vol. 45. - № 9. - P. - 14-15.

168. Saudals, W. The effect of retained placenta end metritis complex on reproductive performance in dairy cattle – case control study / W. Saudals // Canad. Veter. Journal. - 2009. - Vol. 20. - № 5. - P. 131 - 135.

169. Кундышев, П. П. Из опыта искусственного осеменения коров на молочном комплексе / П.П.Кундышев // Животноводство.- 2006.- №11.- С. 70-73.

170. Каламов, Р. Влияние различных способов содержания коров на качество молока и заболеваемость/ Р. Каламов // Вестник Российского государственного аграрного заочного университета, 2007.- №3.- С. 99-101.

171. Прозора, Э.С. Влияние моциона на биохимические показатели крови стельных сухостойных и новотельных коров при привязном способе их содержания / Прозора Э.С., Никольская Е.Н., Перун М.Н. [и др.] // Промышленная технология производства молока при поточно - цеховой системе, 2007. - С. 79-83

172. Kotter, C. Do conis need more exercise? / C. Kotter // Cryo-Lett. - № 7. - 2003. - P.167 - 170.

173. Голдырев, Т.С. Эффективность активного моциона сухостойных коров / Т.С. Голдырев // Промышленная технология производства продуктов животноводства в Сибири, 2007 - С.50-55.

174. Чохатариди, Г.Н. Репродуктивные качества стельных сухостойных коров / Г.Н.Чохатариди, Т.А.Чохатариди, Л.П. Икоева // Владиковказвказ, 2008.- С. 327-328.

175. Рибалка, М.М. Стимуляція відтворних функцій корів/ М.М.Рибалка // Вісник Полтавського державного сільськогосподарського інституту, 2001 - № 2. - С.89-90.

176. Коркин, В. А. Использование в качестве доноров эмбрионов коров, переболевших эндометритами и кистами / В. А.Коркин // Трансплантация эмбрионов с/х животных. – Алма-Ата, 1989. – 13 с.

177. Markette, G. Estimation of embrionic losses in bovine embryo transfer recipients from progesterone profiles and returus to estrus/ G. Markette // Theriogenology, 2005, 23, 1, P.45-62.

178. Rosellus, R. Ergebnisse nach Durchfuhrung von zentralen und dezentralen Embriotransfer beim Rind / R. Rosellus // «Rinderproduktion», 2004, n. 69, S.9-10.

179. Бабенков В.Ю. Биотехнологические методы интенсификации воспроизводства молочного и мясного скота. Автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23 / В.Ю. Бабенков // ВНИИЖ. Дубровицы, 2004. – 46 с.

180. Ishimori, H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures / H. Ishimori, Y.Takahashi, H. Kanagawa // Theriogenology, 37, 2002. – p. 481-487.

181. Гарбузов, А.А. Факторы, влияющие на воспроизводительную функцию коров /А.А. Гарбузов // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства / Сборник статей II международной научно-практической конференции, Витебск, 22 мая 2002 года. – Витебск: УО «ВГАВМ», 2002. – С.59-60.

182. Горбунов, Ю.А. Методы искусственной регуляции репродуктивной функции у коров при трансплантации эмбрионов и воспроизводстве стада / Ю.А. Горбунов // Монография. – Мн., РУП «Белорусск. науч. ин-т внедр. новых форм хозяйств. в АПК», 2003 – 78 с.

183. Смирнова, Л.Л. Влияние молочной продуктивности коров на уровень воспроизводства стада / Л.Л. Смирнова // Совершенствование методов воспроизводства и искусственного осеменения сельскохозяйственных животных. – М., 1993. – С.64-69.

184. Тяпугин, Е.А. Качество зародышей у коров-доноров разного возраста и состояние эндометрия / Е.А.Тяпугин, Т.В.Агалакова, Л.В.Пермякова // Зоотехния. – 1998. - №6. – С.26-28.

185. Almedia, A. Progesterone receptors in the endometrium of normal and repeat – breeder cows / A. Almedia, N.Ayalon, B.Bartoove // J. Anim. Sci. Reprod. – 2007. – vol. 14. – P.11-19.

186. Laing, J.A. Some factors in the etiology and diagnosis of bovine infertility / J.A. Laing // Veter. Rec. – 2005. - Vol. 57. – P.257-282.

187. Милованов, В.К. Причины эмбриональной гибели и новые возможности улучшения воспроизводства стада / В.К.Милованов, И.И.Соколовская // Животноводство. – 1988. - №7. – С.65-68.

188. Милованов, В.К. О природе криогенных повреждений живчиков барана / В.К. Милованов, А.Н.Варнаровский, В.А.Наук. // Вести с.-х. науки. - 1980. - №10. – С.86-93.

189. Милованов, В.К. Биологические особенности эмбрионального питания и практика воспроизводства крупного рогатого

го скота / В.К.Милованов // Животноводство. – 1985.- №6. – С.45-54.

190. Милованов, В.К. Эбриональная смертность и воспроизводство стада /В.К.Милованов // Животноводство. – 1986. - №6. – С.75-83.

191. Сергеев, Н.И. Влияние некоторых факторов на приживляемость эмбрионов / Н.И. Сергеев, С.Н.Хилькевич, В.М.Шириев // Молочное и мясное скотоводство. – 1991. - №1. – С.28-29.

192. Gustafsson, H. Clinical, morphological and endocrine studies in repeat breeder neifers and their embryos: Thesis / H. Gustafsson // - Uppsala, 2005 – 133 p.

193. Austin, C. Hormonal control of reproduction / C. Austin // Cambridge, - 2007. - №2. – P. 177 – 181.

194. Nicolas, F. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo – transfer and splitting / F.Nicolas // Anim. Prod. – 2003. – 36. – P.341-353.

195. Smorąg, Z. Vitrification of non-cultured and cultured rabbit embryos / Z. Smorąg // Anim. Reprod. Sci., 26, 2001. – P.151-158.

196. Прокофьев, М.И. Регуляция размножения сельскохозяйственных животных / М.И. Прокофьев // – Л: Наука, 1993. – С.50-54.

197. Сергеев, Н.И. Факторы, влияющие на эффективность нехирургической пересадки эмбрионов крупного рогатого скота / Н.И.Сергеев // Биотехнологические методы в селекции: Тр./Всесоюз. ин-т животноводства. Дубровицы. - 1999. – С.35-40.

198. Erb, R.E. Profile of reproductive hormones associated with fertile and non – fertile inseminations of dairy cattle / Erb R.E. // Theriog. – 2003. – vol. 5. – P.227-242.

199. Буянов, А.А. Теоретическое обоснование и клинические показания применения прогестерона бесплодным коровам / А.А. Буянов // Акушерство, гинекология, искусственное осеменение и болезни молодняка. – М., 1996. – С.24-38.

200. Laintinen, J., E., Tenhunen. Milk progesterone in finnish dairy cows: a field study on the control / J. Laintinen, E. Remes, M. Tenhunen // *British. Veter. J.* – 2005. – Vol. – 141, 3. – P.297 – 306.

201. Wilmut, J. The influence of variation in embryo stade and maternal in farm animals on embryo survival in farm animals / J. Wilmut, D.J.Salles, C.J. Ashword // *Theriog.* – 2005. – vol. 23., I. – P.107-119.

202. Горбунов, Ю.А. Использование экзогенного прогестерона (КОП) для предупреждения эмбриональной смертности у коров и телок / Ю.А. Горбунов // *Проблемы производства молока и говядины: Материалы междунар. конф., Жодино, 19-20 июня 1996 г. / Акад. аграр. наук Респ. Беларусь; БелНИИживотноводства.* – Жодино, 1996. – С.21-22.

203. Свитоюс, А.Г. Уровень суперовуляции и качество эмбрионов в зависимости от концентрации прогестерона и иммуноглобулина в крови коров перед гормональной обработкой / А.Г. Свитоюс // *Биотех. приемы в технологии трансплантации эмбрионов: Науч.-техн. бюл. ВАСХНИЛ, ВНИИЖ, Вып. 104.* – Дубровицы. – 1991. – 22 с.

204. Трофионова, А.Н. Критические периоды морфогенеза / А.Н. Трофионова // *Успехи современной биологии.* – 2003. – Т.51. – С.381-486.

205. Неверова, Л.Г. Критические периоды развития и процессы детерминации зачатков конечностей у зародышей мыши по данным опытов с рентгеновским облучением / Л.Г. Неверова // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.* – 2004. - №4. – С.63-64.

206. Решетникова, Н.М. Особенности процесса воспроизведения у коров в условиях промышленной технологии получения молока / Н.М. Решетникова // *Повышение продуктивности крупного рогатого скота молочных пород.* – М., 1991. – С.89-95.

207. Осташко, Ф.И. Анализ режимов замораживания эмбрионов млекопитающих / Ф.И.Осташко, Н. Д. Безучный, Е. Г. Волкова // *Трансплантация эмбрионов у крупного рогатого скота. Тез. докл. симпоз. Тарту, 22-23 окт. / ЭстНИИЖ Тарту, 1996.* – С.46-48.

208. Betteridge, K.J. The anatomy and physiology of preattachment bovine embryos / K.J. Betteridge // *Theriog.* – 2008. – vol. 29. – P.513-516.

209. Казаровец, Н.В. Состояние и перспективы развития биотехнологии в Беларуси. – В докладе Департамента образования, науки и кадров Минсельхозпрода РБ. Мн., 2003. – С.3-19.

210. Попов, Н.И. Влияние уровня протеина и некоторых азотистых соединений на бесплодие коров / Н.И. Петров // *Сельское хозяйство за рубежом.* – 2000. - №6. – С.47-50.

211. Шубин, А.А. Действие разных доз витамина А и ди-луидина на воспроизводительную функцию коров в условиях молочных комплексов / А.А.Шубин, Л.А. Шубина // *Докл. ВАСХНИЛ.* – 2003. - №8. – С.34-37.

212. Мингазов, Т.А. Воспроизводительная функция коров в связи с сезонными изменениями обеспеченности в каротине /Т.А. Мингазов // *Труды СибНИИЖ.* – 1998. – Т.4. – С.87-89.

213. Maurer, R.R. Hormonal asynchrony and embryonic development / R.R. Maurer // *Theriog.* – 2003. – vol. 12, I. - P.11-22.

214. Горбунов, Ю.А. Усовершенствованные методы оценки качества спермы быков производителей / Ю.А. Горбунов, В.В.Жаркин, Г.Г.Мордань // *Зоотехническая наука Беларуси: Тр. Бел НИИ животноводства* – Мн., 1999, №3 – С.37-38.

215. Клинский, Ю.Д. Направленная регуляция и интенсификация процессов размножения у сельскохозяйственных животных в условиях промышленной технологии / Ю.Д. Клинский // *Гормоны в животноводстве: Тр./Всесоюз. ин-т жив-ва.* – Дубровицы, 1991. – Вып. 64. – С.7-8.

216. Клинский, Ю.Д. Проблемы интенсификации молочного скотоводства / Ю.Д. Клинский // *Сельское хозяйство за рубежом.* – 1995. - №7. – С.44-50.

217. Хилькевич, С.Н. Усовершенствование методов получения и пересадки эмбрионов крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13/ВИЖ. – Дубровицы. – 2005. – 28 с.

218. Смылова, Н.И. Приживляемость эмбрионов в зависимости от гормонального профиля крови телок-реципиентов \

Н.И. Смыслова, М.Н. Ефремова, Ю.Н. Петраков // Биотехнология в животноводстве. Бюл. научн. работ ВИЖ. Дубровицы. – 2007. С.50-52.

219. Прокофьев, М.И. Биотехнология регуляции воспроизводительной функции у крупного рогатого скота / М.И. Прокофьев // Сб. н. Тр./Всесоюз. НИИ физиол. биохим. и питания с.-х. животных. - т. XXVII. Боровск, 1993. – С.33-40.

220. Sreenan, I.M. Factors affecting pregnancy rate following embryo-transfer in the cows / I.M. Sreenan // Theriogen. – 2007. - vol.27, I. - P.99-114.

221. Heyman, I. Embryonic loss in cattle after transfer of fresh, frozen or cultured embryos / I. Heyman // Proc. Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I. – 2004. – vol. 2. - 228 p.

222. Maurer, R.R. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle / R.R. Maurer // J. Anim. Sci. – 2003. vol. 56. I. – P.531-539.

223. Будевич, А.И. Сохранность и приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота / А.И.Будевич, Ю.А.Горбунов, И.И.Будевич // Зоотехническая наука Беларуси: Тр. РУП «Институт животнов. НАН Беларуси». – Мн., – 1999. - Т. 34 – С.41-44.

224. Варнавский, А.И. Влияние методов замораживания на подвижность и ультраструктуру живчиков быка и барана / А.И. Варнавский // Животноводство. – 1990. - №9. – С.53-56.

225. Зверева, Г.В. Электронно-микроскопические и биологические исследования сохранения семени быка / Г.В.Зверева // Доклады советских ученых на 5 Междунар. конгр. по биологии разн. и иск. осем. животных. - М., 1994. – С.20-21.

226. Кононов, В.П. Способ оценки биологической полноценности сперматозоидов / В.П. Кононов // Тр ВНИИ животноводства. - Дубровицы, 2006. – С.13-16.

227. Корбан, Н.В. Низкотемпературная консервация спермы хряков / Н.В.Корбан, Л.Г.Мороз, И.Ш. Шапиев // Методические рекомендации. – Л., 2010. – 61 с.

228. Платов, Е.М. Необходимо учитывать скорость движения спермиев /Е.М.Платов // Животноводство. – 1996. -№4. – С.59-61.

229. Раковский, Я.П. Особенности спонтанной биохемиолюминесценции половых клеток самцов с.-х. животных /Я.П.Раковский, В.С.Васильев, А.А.Бегма // Биохемиолюминесценция в сельском хозяйстве. – 2006. – С.33-35.

230. Рустенов, А.Р. Оценка подвижности спермиев быков методом лазерной спектроскопии оптического смещения / А.Р. Рустенов, В.М. Прокопцев, С.Б.Ланда и др. // Сельхоз. биол. - 2000. - 4. – С.180-188.

231. Graham, E.F. An assay of semen quality by use of sephadex filtration / E.F.Graham, J.A.Vasques, M.K.Schmehl // In: VIII Intern. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Krakow, 2006. – P.896-899.

232. Горбунов, Ю.А. Методы оценки качества спермы быков-производителей // Наука-производству / Ю.А. Горбунов, Н.Г. Минина, В.В.Жаркин и др. // Материалы IV междунар. научно-практ. конф. – Гродно, 2001. – С.183-184.

233. Морозов, В.А. Объективное определение активности спермы /В.А. Морозов // Сб. тр. СибНИИ животноводства, - Новосибирск, 1998. - Вып.1. – С.51-56.

234. Becker, W.C. Influence of glycerol level diluent and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws / W.C. Becker, P.Z. Senger, E.R.Aalseth // J. of Animal Sci., 2007, v. 44. – P.1067-1071.

235. Bush, J. Partial characterization of a unique growth factor secreted by human Sertoli cells / J. Bush, D.Lamb, L.Lipshutz // Fertil. Steril. 2008. – Vol. 49. - №4. – P.658-665.

236. Karras, W. Diagnostik und furberische. Darstellung des persistierenden Akrosoms. Berl. und Munchen / W. Karras // Tiererztl. Wschr., 2005, vol. 76. – P.68-71.

237. Fornusek, L. Ucinek frolides pro alouhodobe ushowavano na akrosomy beranech spermiy / L.Fornusek, V. Vetviska., O.Petelissova // «Vet. med.» (WSSR), 2001, 26, №4. – P.213-221

238. Патент РБ №5946 А61D 19/00 Способ оценки качества спермы. / Шейко И.П., Горбунов Ю.А., Жаркин В.В., Мордань Г.Г. // (Беларусь) - № а 19990293; заявлено 03.02.1999; опубл. 03.30.2004 Офиц. бюл. №1, нац. центра интел. собств. – 2004, С.98.

239. Мордань, Г.Г. Метод оценки качества свежезятой спермы быков производителей: Сб. науч. тр. «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства» / Г.Г.Мордань // Белорус. с.-х. акад. – Горки, 2001. – С.165-167.

240. Мордань, Г.Г. Влияние сезона года на степень повреждения акросом спермиев быков / Г.Г.Мордань // Наука-производству: Материалы V межд. научно- практ. конф. – Гродно, 2002. – С.174-175.

241. Мордань, Г.Г. Использование высокоценных племенных быков-производителей при искусственном осеменении / Г.Г.Мордань, А.И. Будевич, Ю.А. Горбунов // Зоотехническая наука Беларуси: Тр./БелНИИживотноводства – Мн., 2000. – Т.35. – С.38-45.

242. Мордань, Г.Г. Оплодотворяющая способность спермы быков – производителей различной плодовитости / Г.Г.Мордань, А.И. Будевич, Ю.А. Горбунов // Наука – производству: Материалы V межд. научно-практ. конфер. – Гродно, 2002. – С.178-179.

243. Молова, М.В. Влияние низких температур на структурную характеристику акросомы сперматозоидов барана / М.В. Молова // Криобиология для половых клеток. София, 1993. – С.58-70.

244. Соколовская, И.И. О значении акросомы в оценке семени самцов - производителей / И.И. Соколовская // Животноводство. – 1991. - № 9.- С.39-41.

245. Crabo, B.J. The effect of glycerol on bull and boar spermatozoa in vitro measured as loss of intracellular glutaminoxaloacetic transaminase / B.J. Crabo, R.E.Bower, E.F.Graham // In: II Nord. Vet. Congr. Bergen, 2000. – 242 p.

246. Graham, E.F. Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing /E.F.Graham // Cryobiology, 1997.- v. 4. – P.75-84.

247. Pace, M.M. The release of glutamic oxaloacetic transaminase from bovine spermatozoa as a test method of assessing semen quality and fertility/ M.M. Pace, E.F. // *Biol. Reprod.*, 2000. - v. 3. - P.140-146.

248. Szell, A. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour/ A. Szell // *J. Reprod. Fertil.*, 76, 2006. - P. 401-408.

249. Toruusck, L. Uciniek fedides pro alouhodobe ushowavani na akrozomy berauech spermii "vet med" (USSR)/ L.Toruusck, V.Vetviska, J. Pefelicova // *Biol. Reprod.*, 26, 4, 2001. - P.213-221.

250. Ельчанинов, Л.П. Методические рекомендации по объективной оценке семени быка и прогнозирования результатов искусственного осеменения/ Л.П. Ельчанинов/ Дубровицы, ВИЖ, 1993. - 26с.

251. Ван-Дюйн, К. Зависимость между качеством семени и его оплодотворяющей способностью/ К. Ван-Дюйн // *С.-х. за рубежом.* - 2002. - №5. - 23с.

252. Ван-Дюйн, К. Рациональный метод определения оплодотворяющей способности сперматозоидов/ К. Ван-Дюйн // *Тр. V-го междунар. конгр. по воспроизведению и иск. осемен. животных.* - Таренто, Италия. - 1994. - Т.4. - С.323-328.

253. Инструкция по взятию, оценке и замораживанию спермы быков-производителей на племпредприятиях: Утв. НТС Минсельхозпрода РБ 27.01.98 / М-во сельского хоз-ва и продовольствия РБ, БелНИИЖ; сост. Е.В. Раковец, И.П. Шейко, Ю.А. Горбунов и др. - Жодино, 1998. - 38 с.

254. Наук, В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации/ В.А. Наук/ Кишинев: «Штинца», 2001. - 199 с.

255. Акопян, В.Б. Определение качества спермы методом ультразвуковой цитолозиметрии / В.Б. Акопян, Э.Б. Мирзоев, А.А. Рыбакова // *Доклады ВАСХНИЛ.* - 2001. - №4. - С.53-56.

256. Atherton, R.W. Spectrophotometric quantitation of mammalian spermatozoan motility/ R.W. Atherton, E.W. Radnay, K.J. Polakovski // *Human Biol, Reprod.* -2008. - Vol. 18., - P.624-628.

257. Dunphy, B.C. The clinical value of conventional semen analysis/ B.C. Dunphy, I.M. Heal, I.D. Cooke // *J. Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 51, № 2. – P.324-329.
258. Graham, E.F. Fertility studies with frozen boar spermatozoa/ E.F. Graham, A.H.J. Rajamannan, M.K. Schmehl // *A. I. Dig.* – 2001. – V. 19, №19 (6). – P.6-8.
259. Jones, R.C. The effects of cooling to 5 °C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa/ R.C. Jones // *J. Reprod. Fertil.*, - 2009.- v.56. – P.223-238.
260. Krause, D. Modern methods for evaluation of deep-frozen semen/ Krause D. // *Arch. Andrology*, - 2000.- v. 5. – P.34-40.
261. Laszczka, A. Wideomikrografia komputerowa – system CVM: Cellsoft – nowoczesna metoda oceny ruchliwosci plemnikow/ A.Laszczka // *Przegl. Hodowl.* – 2009. – 57, №8. – S.15-17.
262. Elmore, R.G. Evaluating bulls for breeding soundness: Sperm morphology / R.G. Elmore // *Veter. Med. (Edwardsville)*. - 2005.- 80, 9. – P.90-95.
263. Sattelle, D.B. Motility of bovine spermatozoa studied by lazer light seattering/ D.B. Sattelle, G.R. Palmer, M. Dott // *J. Eur. Biophys.* – 1985. – Vol. 11, №3. – P.203-210.
264. Smith, A.U. Survival of spermatozoa at low temperatures/ A.U. Smith // *J. Nature.*- 2000. - V. 16, No 4225. – P.668-669.
265. Uoffana, M. Seguencias euregistree pour seqqir d'efalous de motilite das spermatozoids/ M. Uoffana // *Malgras Elenage jusem.*- 2003, 195.- S.17-25.
266. Andersen, J.B. Breeding efficiency of frozen bull semen after 5 years storage at - 196°C in liquid nitrogen. – In: VIII Intern. Congr. Anim. Reprod/ J.B. Andersen // *Artif. Insem. Krakov*, 2006.- v. 4 – P.783-785.
267. Bane, A., Nicander, L. Applied Animal reproduction/ A. Bane, L. Nicander // h. Joe Bearden and John Euduy. – 3 rd ed. 1992. – P. 352.
268. Smith, J.F. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa / J.F.Smith // *Anim. Prod., Canterbury*, 11-14 Febr. – 2007. – 57. – P.246-250.

269. Anzar, M. Efficacy of the Hamilton thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen / M. Anzar, M.M. Hassan, E.F. Graham // *Theriogenology*. – 2001.- №2. – P.307-317.

270. Bakst, M.R., Sexton, T.J. Fertilizing capacity and ultra-structure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing / M.R. Bakst, T.J. Sexton, L. Nicander // *J. Reprod. Fertil.*, 2009. - v. 55 – P.1-7.

271. Скорняков, Б.А. Электронно-микроскопическое изучение взаимодействия замораживания на целостность половых клеток спермы быков/ Б.А. Скорняков / Тезисы докладов научно-производственной конференции по теории и практике воспроизводства сельскохозяйственных животных. Харьков. - 1992. – С.71-72.

272. Антонюк, В.С. Биотехнология получения и трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота: Методические рекомендации/ В.С. Антонюк, И.И.Будевич, Ю.А. Горбунов [и др.] // РУП «Институт животноводства НАН Беларуси» - Жодино, 2004. – С.14-15.

273. Taylor, M.J. Physico-chemical principles of low temperature biology. W: *The Effects of Low Temperatures on Biological Systems* / M.J. Taylor, B.W. Grout, G.J. Morris (red.), Edward Arnold (publishers), London, 2007. – P.3-37.

274. Zwierzchowski, L. *Biotechnologia zwerząt* / L. Zwierzchowski, K. Jaszczak, J. Modlinski // Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 2007. – S.491-493.

275. Valdez, C.A. Confirmation by cryo-electron microscopy of the absence of crystalization using a vitrification solution / C.A.Valdez, O. Abas Mazni, H. Kanagava, S. Fujikawa // *Cryo-Lett.*, 11, 2000. – P.351-358.

276. Valdez, C.A. Confirmation by cryo-electron microscopy of the absence of crystalization using a vitrification solution / C.A.Valdez, O. Abas Mazni, H. Kanagava, S. Fujikawa // *Cryo-Lett.*, 11, 2000. – P.351-358.

277. Горбунов, Ю.А. Способ комплексной оценки качества спермы быков и его использование при трансплантации эмбрио-

нов/ Ю.А. Горбунов // Сельское хозяйство проблемы и перспективы: Сб. тр. / УО «ГГАУ» - Гродно, 2005. – Т.4. - Ч.3. – С.63-67.

278. Патент РБ 7110 А61D 7/00, А61Р 31/04 Способ профилактики и лечения эндометритов у коров. / Горбунов Ю.А., Будевич А.И., Минина Н.Г. (Беларусь) - № а20010799; опубл. 03.30.2002 Офиц. бюл. №2, нац. центра интел. собств. – 2012, С.121.

279. Горбунов, Ю.А. Метод витрификации эмбрионов крупного рогатого скота / Ю.А. Горбунов // Фундаментальные и прикладные проблемы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных в изменившихся условиях системы хозяйствования и экологии: Сб. науч. тр. Ульяновская гос. с.-х. академия – Ульяновск, 2005.- Т.2. – С.110-112.

280. Горбунов, Ю.А. Методические рекомендации «Усовершенствованная технология криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред» Методические рекомендации / Горбунов Ю.А., Будевич А.И., Минина Н.Г. (утв. НТС Минсельхозпрода 16.12.2003)// – Минск. – 2004. – 30 с.

281. Шелудяков, М.В. Метод криоконсервации эмбрионов с использованием высококонцентрированных защитных сред / М.В. Шелудяков и [др.] // Перспективы развития животноводства в северо-западном регионе: Материалы междунар. научн.- практ. конф., Калининград, 1-2 ноября 2002 г. – Калининград, 2002. - С.69-71.

282. Методика определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий. – Животноводство. - 1994, В.31. – С.73-77.

283. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий // Минск: Высш. шк., 1979. – 327 с.

284. Соколовская, И.И. Методические рекомендации по иммунологии воспроизведения / И.И. Соколовская // Дубровицы, 1995. – С.40-45.

285. Студенцов, А.П. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения/ А.П. Студенцов // Учебник для

студентов высших учебных заведений – Минск: «Колос», 2000. - С.199-401.

286. Нищик, Е.В. Система зооветеринарных мероприятий по борьбе с яловостью крупного рогатого скота / Е.В. Нищик // БелНИИЭВ. Минск: «Союзучетиздат», 1992. – С.34-38.

287. Эрнст, Л.К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйст-венных животных / Л.К. Эрнст // М.: Агропромиздат, 1999. - С.190-193.

288. Вишневский, М.М. Содержание прогестерона в крови при вызывании суперовуляции ФСГ/ М.М. Вишневский // Тез. докл. Всес. науч. – техн. конф. «Использование гормональных препаратов в животноводстве». Дубровицы, Моск. обл. 1-2 окт.1991 г. / Всесоюзн. институт жив-ва. – Москва, 1991. – С.95-96.

289. Способ трансплантации эмбрионов. Патент РФ № 5032321; 2007г. Авторы: Шейко И.П., Горбунов Ю.А. и др.

290. Адаменко, В.Г. Об энергетическом потенциале организма в состоянии гипноза (исследование проводимости точек акупунктуры) / В.Г. Адаменко // Вопросы биоэнергетики: Материалы науч.-метод. семинара / Акад. наук СССР. Каз. ун-т. - Алма-Ата, 1969. - С. 34-39.

291. Казеев, Г.В. Применение метода диагностики состояния органов и систем организма по точкам акупунктуры крупного рогатого скота с помощью прибора ВДП: Методические рекомендации / Г.В. Казеев, Е.В. Варламов, А.В. Старченкова // Всесоюзн. с.-х. ин.-т заоч.обр. – Балашиха, 2001. - 16 с.

292. Казеев, Г.В. Биоэнергетика животных и разработка методов ее коррекции при нарушении функции воспроизводства: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.02.01 / Г.В. Казеев; Рос. гос. заоч. ун-т. – М., 2003. – 37 с.

293. Гузеватий, О.Е. Аналіз різних режимів відтаювання при кріоконсервації ооцитів корів/ О.Е. Гузеватий // Генетико-селекційні та технологічні проблеми відтворення сільськогосподарських тварин: Тез. доп. наук. – практ. конф. (19-20 травня 1994 р.). – Київ, - 1994. – С.76-78.

## Содержание

<b>Введение</b>	3
1. Организация работы по трансплантации эмбрионов	7
1.1. Современный уровень развития метода криоконсервации эмбрионов	7
1.2. Индукция полиовуляции и определение оптимального времени осеменения коров-доноров	28
1.3. Факторы, влияющие на оплодотворяющую способность доноров и приживляемость эмбрионов у реципиентов	41
1.4. Эмбриональные потери и их предупреждение	83
1.5. Оценка замороженно-оттаянной спермы	93
1.6. Методы индукции охоты и полиовуляции. Определение оптимального времени осеменения коров-доноров	102
2. Цель, задачи и методика исследований	118
3. Способы повышения эффективности трансплантации эмбрионов	123
3.1. Требования по организации моциона сухостойных коров-доноров в переходный период	123
3.2. Результаты трансплантации эмбрионов в связи с использованием активного моциона коров-доноров	132
3.3. Компьютеризированный прием определения состояния репродуктивных органов у коров-доноров	135
3.4. Диагностика состояния фолликула с использованием УЗИ-сканера	139
3.5. Влияние возраста коров-доноров на реакцию полиовуляции и качество эмбрионов	140
3.6. Влияние наличия (либо отсутствия) лактации у доноров на качество эмбриопродукции	142
3.7. Влияние уровня молочной продуктивности доноров на реакцию полиовуляции и качество эмбрионов	145
4. Способ оценки сохранности акросом спермиев	148

5. Нормализация репродуктивной функции у коров-доноров	156
6. Способ повышения приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов	165
7. Приемы повышения жизнеспособности эмбрионов	170
7.1. Результативность применения аминазина коровам-донорам	170
7.2. Определение БАТ, отражающих состояние половых органов и уровень их активности у доноров	174
8. Способ акупунктурно-гормонального воздействия на организм коров-доноров	195
8.1 Степень акупунктурного воздействия в связи с показателями крови и сохранностью эмбрионов	202
9. Способ криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием высококонцентрированных защитных сред	213
10. Экономическая эффективность внедренных разработок в практику животноводства	222
Выводы	223
Заключение	228
Рекомендации по практическому использованию научных разработок	242
Список использованных источников	244
Приложения	277

## Приложение 1

Оним из резервов повышения объёма производства молока и говядины в условиях работы МТК является увеличение в стаде количества генетически ценных высокопродуктивных коров. Однако этому, в значительной степени, препятствует высокая яловость животных. Каждая пятая корова в течение календарного года не даёт приплода, причем, бóльшая часть из них относится к высокоудойным животным стада. Вместе с тем получать ежегодно по 90 телят на 100 коров при средней продуктивности 9000 кг молока на фуражную корову – задача вполне разрешимая. Необходимо только специалистам хозяйства постоянно заниматься вопросами воспроизводства стада, умело организовывать и согласованно проводить эту работу по предлагаемой в приложении № 1 системе и календарному плану зооветеринарных мероприятий. Она нацеливает зоотехническую и ветеринарную службы на совместное проведение работы по повышению выхода и сохранности молодняка. В первую очередь ею должны руководствоваться зоотехники-селекционеры, ветврачи-гинекологи и работники по искусственному осеменению, от которых во многом зависит продуктивность, племенная ценность, эффективность стимуляции половой функции животных, лечения послеродовых заболеваний, а также обеспеченность хозяйства генетически ценным ремонтным молодняком. Перечисленные в указанной системе мероприятия могут и должны быть выполнены в хозяйстве в разрезе всех ферм и комплексов.

Календарный план может быть взят за основу и в работе специалистов районного звена: райплемстанции и ветстанции, а также зоотехнической службы районов, директоров районных ветеринарных лабораторий. Главное в их совместной работе – контроль за правильной организацией и неукоснительным исполнением ранее выданных поручений по устранению выявленных недостатков, а также проведение практической учёбы в условиях ферм и комплексов с принятыми на работу специалистами хозяйства. Обязательным является ежемесячный анализ состояния воспроизводства на фермах, с одновременным оказани-

ем практической помощи по выявлению и устранению причин бесплодия.

Молочное скотоводство располагает значительными резервами дальнейшего увеличения производства молока. К ним относятся повышение уровня кормления в соответствии с продуктивными возможностями скота, улучшение селекционно-племенной работы и воспроизводства стада, более широкое внедрение элементов промышленной технологии на новых комплексах. Решение этих вопросов позволит существенно увеличить производство молока в хозяйствах, повысить эффективность и производительность труда работников в отрасли молочного скотоводства, создать материальную основу и необходимые предпосылки для подъема её на качественно новую ступень.

Система мероприятий и календарный план работы зооветспециалистов по повышению эффективности искусственного осеменения крупного рогатого скота в условиях МТК

№ п/п	Наименование работы	Основное содержание работы	Дата исполнения	Исполнители
<b>Январь</b>				
1.	Организация внутрихозяйственного звена воспроизводству	Группа должна включать зоотехника-селекционера (руководитель группы), ветеринарного врача-гинеколога, техников по искусственному осеменению (при работе по кольцевой системе)	2-10	Руководитель хозяйства, Зооветспециалисты звена
2.	Обучение врача-гинеколога	Обучение гинекологическому исследованию животных на сроки стельности, патологические изменения в половых органах и способам их устранения (в условиях производства)	2-15	Сотрудники УО «ГГАУ»
3.	Заполнение журналов учета осеменения и отелов (форма 10-МОЛ)	Завести новые журналы учета по состоянию на 1-е января. Заполнить таблицу №3 журнала за прошлый год и №4 нового журнала	2-10	Техники по искусственному осеменению. Зоотехник-селекционер
4.	Учет бесплодных животных	Провести ректальное обследование всего случного поголовья. Составить опись животных безрезультатного осеменения	15-31	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер,

		и не приходящих в охоту с указанием причины бесплодия		зав. фермами.
5.	Применение стимуляторов половой функции и лечебных средств. Завести гинекологический журнал	Применить стимуляторы по предложенным схемам коровам, не пришедшим в охоту (согласно описи) и многократно осемененным. Провести лечение животных, с клинически выраженными эндометритами. О проведенной работе записать в гинекологический журнал	20-31	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер.
6.	Организация прогулок	Проводить ежедневный моцион скота	1-31	Зоотехник-селекционер, зав. фермами
7.	Контроль за состоянием обмена веществ животных	Провести анализ крови от 10% коров на основные биологические показатели: кальций, фосфор, общий белок, каротин, сахар, резервную щелочность и др. По результатам исследований организовать добавки в рацион микроэлементов, витаминов и минеральных веществ.	20-30	Главный ветврач (ветслужба хозяйства)
Февраль				
8.	Контроль за качеством кормов, организация подкормок	Провести лабораторное исследование кормов, организовать минерально-витаминную подкормку поголовья, провести курс витаминизации коров, отел которых ожидается в феврале-марте	1-10	Зоветслужба хозяйства и районная ветлечебница
9.	Запуск коров	Составить графики запуска коров, отел которых ожидается в апреле-мае. Проверить своевременность запуска коров за январь-февраль	5-10	Зоотехник-селекционер, зав. фермами
10.	Гинекологическое обследование, применение стимуляторов	Обследовать коров, отелившихся в декабре и еще не пришедших в охоту. Составить опись с указанием причины бесплодия. Применить стимулирующие препараты. Провести лечение гинекологически больных животных. Заполнить табл. 9 (форма 10-МОЛ)	10-20	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер, техник по искусственному осеменению.
11.	Организация прогулок	Проводить ежедневный моцион скота	1-28	Зоотехник-селекционер, зав. фермами
Март				
12.	Совещание руководителя и главных спе-	Обсуждение итогов работы по воспроизводству за 2 месяца и задачи на март-апрель	5-10	Руководитель и главные специалисты

	специалистов хозяйства			хозяйства, сотрудники УО «ГГАУ»
13.	Исследование на стельность и гинекологические заболевания	Исследовать на стельность коров, осемененных до 1 января. Даты ожидаемых отелов проставить в журналах (форма 3-И.О.). На выявленных не стельных животных составить опись с указанием причины бесплодия. Провести гинекологическое исследование животных, отелившихся до 10 февраля и еще не приходивших в охоту, а также многократно осемененных, включить их в опись.	5-15	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер, техник по искусственному осеменению, зав. фермами, сотрудники УО «ГГАУ»
14.	Применение стимуляторов половой функции	Провести стимуляцию охоты у бесплодных коров, лечение животных с гинекологическими заболеваниями, курс витаминизации коров, отел которых ожидается в марте-апреле. Заполнить табл.9 (форма 10-МОЛ)	10-20	Ветврач-гинеколог, зав. фермами, техник по искусственному осеменению.
15.	Исследование осемененных телок	Исследовать на стельность телок, осемененных в 4 квартале и январе, стельных выделить в отдельное стадо. С не стельными решить вопрос о выбраковке или организации мер по их плодотворному осеменению	20-31	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер.
16.	Организация прогулок	Проводить ежедневный моцион скота	1-31	Зоотехник-селекционер, зав. фермами
Апрель				
17.	Отчет группы по воспроизводству	Проанализировать состояние воспроизводства на 1 апреля, составить предварительные данные об ожидаемом получении приплода в текущем году	1-5	Члены внутренней группы по воспроизводству, сотрудники УО «ГГАУ»
18.	Составление графика запуска коров	Составить график запуска коров, отел которых ожидается в июне-июле. Проверить своевременность запуска коров за март-апрель	5-10	Зоотехник-селекционер, зав. фермами
19.	Контрольное исследование крови, витаминизация	Провести выборочное исследование коров на основные биохимические показатели (см. пункт 7). Провести курс	5-15	Главный ветврач (ветслужба хозяйства)

		витаминизации КМП животных, отел которых ожидается в апреле-мае. Организовать добавки в рацион микроэлементов и минеральных веществ		
20.	Лечение гинекологически больных коров	Провести лечение гинекологически больных животных, обратив особое внимание на коров с эндометритами, а также гипофункцией яичников и многократно осемененных. Заполнить табл. 9 (форма 10-МОЛ)	10-15	Ветврач-гинеколог, техник по искусственному осеменению, зоотехник-селекционер, зав. фермами
21.	Организация прогулок	Проводить ежедневный моцион скота	1-30	Зоотехник-селекционер, зав. фермами
Май				
22.	Лечебно-гинекологическая работа	Провести лечение гинекологически больных животных	10-25	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер, зав. фермами
23.	Сверка инвентарных номеров	Провести поголовную проверку наличия инвентарных номеров животных и сверить их на соответствие записям в журнале учета осеменения и отелов (форма 10-МОЛ). Обновить записи на трафаретах	10-20	Зоотехник-селекционер, работник по искусственному осеменению, зав. фермами.
24.	Контроль за организацией осеменения, диагностики и лечения маститов, лечение диареи и пневмонии телят (аэрозольный генератор)	Проверить состояние расколов и станков для искусственного осеменения, их готовность к работе в летних лагерях, правильность ведения учета, организацию лечебной работы, вопросы сохранности телят	15-25	Главный зоотехник и главный ветврач хозяйства
25.	Совещание зооветспециалистов и внутрихозяйственной группы по воспроизводству	Подвести итоги работы за 4 месяца, наметить задачи по воспроизводству в пастбищный период	25-31	Главный зоотехник, главный ветврач, специалисты группы по воспроизводству, сотрудники УО «ГТАУ»

Июль				
26.	Запуск коров	Составить график запуска коров, отел которых ожидается в августе-сентябре. Проверить своевременность запуска коров за май-июнь	5-10	Зоотехник-селекционер, зав. фермами
27.	Проверка животных на стельность	Проверить коров, осемененных в I квартале и телок, осемененных в феврале-апреле, на стельность. Проставить даты ожидаемых отелов коров в журнал учета осеменений и отелов (форма 10-МОЛ)	10-20	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер, зав. фермами
28.	Учет бесплодных животных	Провести гинекологическое обследование коров, отелившихся до 1 мая и не приходивших в охоту, а также многократно осемененных. Составить опись животных с указанием причины бесплодия	10-20	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер, зав. фермами.
29.	Применение стимуляторов половой охоты – КМП и витаминов, лечебная работа	Применить стимуляторы с целью вызывания охоты и повышения оплодотворяемости коров, провести лечение гинекологически больных животных. Заполнить табл. 9 в журнале учета осеменений и отелов (форма 10-МОЛ)	15-25	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер, зав. фермами, сотрудники УО «ГТАУ»
Июль				
30.	Подведение итогов работы за первое полугодие	Заполнить табл. 5 журнала 10-МОЛ. По таблице 5 составить данные об ожидаемом получении приплода в текущем году. Данные таблицы представить зам. директора по животноводству	1-10	Техники по искусственному осеменению, зоотехник-селекционер, сотрудники УО «ГТАУ»
31.	Лечебно-гинекологическая работа	Провести лечение гинекологически больных животных. Занести данные в акушерско-гинекологический журнал	10-20	Ветврач-гинеколог, зав. фермами.
Август				
32.	Запуск коров	Составить график запуска коров, отел которых ожидается в сентябре, ноябре. Проверить своевременность запуска коров за июль-август	1-5	Зоотехник-селекционер, зав. фермами
33.	Ремонт пунктов и фиксации станков	Отремонтировать фиксационные станки и оборудовать перед ними накопительную площадку, разме-	1-31	Руководитель и ветслужба хозяйства,

	к осеменению телок. Оборудование выгульных площадок и станков для осеменения коров и телок на комплексе и телочниках	ром 10 м <sup>2</sup> . Обеспечить нормальные условия работы в течение всего года (оснастить оборудованием, инструментами, реактивами)		сотрудники УО «ГГАУ»
34.	Контроль за качеством заготавливаемых кормов	Составить график доставки проб заготавливаемых кормов в районную лабораторию или в УО «ГГАУ» и провести исследования	1-31	Зооветслужба хозяйства, зав. лабораторией по исследованию кормов, сотрудники УО «ГГАУ»
35.	Составление заявки на медикаменты для лечения маститов, гинекологических заболеваний, диареи и пневмонии у телят (аэрозольный генератор)	Составить заявку согласно каталога агрозоветснаба на приобретение препаратов для лечения маститов, гинекологических заболеваний, стимуляции воспроизводительной функции, диареи и пневмонии у телят (аэрозольный генератор)	1-31	Главный ветврач, сотрудники УО «ГГАУ»
Сентябрь				
36.	Исследование на стельность и гинекологические заболевания	Обследовать коров, осемененных в апреле-июне на стельность, составить опись неоплодотворенных, в нее включить животных, отелившихся до 1 августа и не пришедших в охоту, а также многократно осемененных с указанием причины бесплодия	5-20	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер, зав. фермами.
37.	Лечебно-гинекологическая работа. Обработка КМП и витаминами	Применить стимуляторы половой функции, провести лечение гинекологически больных животных. Заполнить табл. 9 (форма 10-МОЛ)	15-25	Ветврач-гинеколог, техник по искусственному осеменению.

38.	Выбраковка коров	Провести выбраковку длительно бесплодных, не поддающихся лечению и стимуляции, а также низкопродуктивных нестельных коров. Одновременно представить зам. директора по животноводству расчеты по выполнению плана поголовья коров на конец года.	5-20	Зооветспециалисты хозяйства, зав. фермами
39.	Обследование осемененных телок	Обследовать на стельность телок, осемененных в мае-июне. Стельных выделить в отдельное стадо	5-20	Ветврач-гинеколог, зоотехник-селекционер, зав. фермами
40.	Формирование групп телок для осеменения в стойловый период.	Организовать отдельные фермы или группы ремонтных телок, обеспечить благоприятные условия их кормления, содержания. Отремонтировать фиксационные станки и накопительные площадки для искусственного осеменения и выдержки телок	15-30	Главный зоотехник, зоотехник-селекционер, зав. фермами
41.	Проверка готовности к работе в осенне-зимний период. Оборудовать или переделать станки для искусственного осеменения коров и телок, а также выгульные площадки на комплексе и фермах	Проверить санитарное состояние ферм и пунктов, готовность их к зимовке, условия для организации прогулок для животных в стойловый период, состояние упитанности животных, наличие необходимого оборудования, лечебную работу, ход осеменения	20-30	Зооветспециалисты хозяйства, сотрудники УО «ГТАУ»
<b>Октябрь</b>				
42.	Лечебно-гинекологическая работа. Правила ведения журнала	Провести лечение гинекологически больных животных. Правила ведения журнала	10-20	Ветврач-гинеколог, зав. фермами, сотрудники УО «ГТАУ»
43.	Анализ оплодотворяющей способности спермы быков-производителей	Заполнить таблицу 8 журнала 10-МОЛ за прошлый год. О результатах сообщить в райплемстанции	10-20	Зоотехник-селекционер, техник по искусственному осеменению

	лей			нению
44.	Подготовка к стойловому содержанию животных. Проверить соблюдение проведения искусственного осеменения телок и коров	Провести окончательную подготовку животноводческих помещений, пунктов по искусственному осеменению и территории к стойловому содержанию животных	15-31	Руководитель и главный зоотехник хозяйства, сотрудники УО «ГГАУ»
<b>Ноябрь</b>				
45.	Совещание руководителя и главных специалистов хозяйства	Подвести итоги работы по воспроизводству за 10 месяцев, определить задачи на стойловый период (кормление и применение подкормок, осеменение коров и телок, работа техника по искусственному осеменению и врача-гинеколога, организация прогулок в выгулах, учет на фермах, лечебная работа и т.д.)	10-20	Руководитель и главные специалисты, сотрудники УО «ГГАУ»
46.	Организация моциона	С первого дня постановки на стойловое содержание ежедневно выпускать коров на прогулку не менее, чем на 3 часа		Зав. фермами, сотрудники УО «ГГАУ»
47.	Контроль за состоянием обмена веществ животных. Организация витаминно-минеральной подкормки	Создать группы животных в количестве 10% от наличия коров на фермах и провести анализ крови на основные биохимические показатели: кальций, фосфор, общий белок, каротин, сахар, резервную щелочность. По результатам исследований организовать добавки в рацион витаминов и минеральных веществ	20-30	Ветслужба хозяйства, зоотехник-селекционер
<b>Декабрь</b>				
48.	Запуск коров	Составить графики запуска коров, отел которых ожидается в феврале-марте. Проверить своевременность запуска животных за ноябрь, декабрь	1-5	Зоотехник-селекционер
49.	Проверка организации прогулок коров. Соблюдение технологии искусственного осе-	Проверить организацию и проведение прогулок коров на всех фермах, ход осеменений и отелов, наличие нумерации животных, наличие акушерского инструментария и спецодежды. Принять меры по устранению недостатков	1-10	Зоветспециалисты, сотрудники УО «ГГАУ»

	менения телок и коров			
50.	Инвентаризация скота	Провести индивидуальное взвешивание каждой коровы, определить упитанность, уточнить возраст, наличие инвентарных номеров (при отсутствии присвоить номера с внесением записей в журнале (форма 3-И.О.). Составить опись скота. Обновить записи на трафаретах	5-20	Зоотехник-селекционер, зав. фермами, техник по искусственному осеменению, сотрудники УО «ГТАУ»
51.	Обследование животных на стельность, выбраковка коров	Исследовать на стельность коров и телок, осемененных в июле, августе, сентябре. Провести окончательную выбраковку и сдачу сверхпланового поголовья бесплодных коров или перевести их в группу откорма	5-20	Зооветслужба хозяйства
52.	Организация прогулок	Проводить ежедневный моцион скота	1-31	Зав. фермами

Настоящий календарный план мероприятий составлен на основании проведения анализа состояния воспроизводства крупного рогатого скота на молочно-товарных комплексах Беларуси.

## Приложение 2

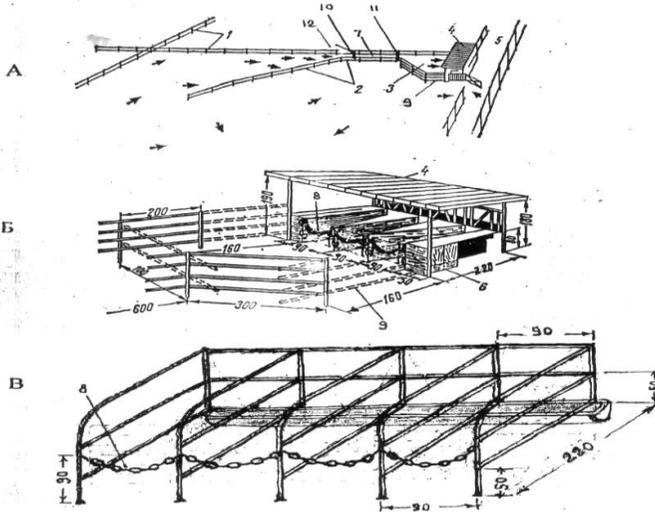


Рисунок 1 А и Б – «Уголок» для искусственного осеменения коров и тёлочек в условиях лагерного содержания:

А. Раскол с накопителем и станками для осеменения.

Б. Станки для осеменения (вид сбоку).

В. Стационарные станки для осеменения в условиях животноводческого комплекса (вид сзади).

1 – ограждение летнего лагеря; 2 – ограждение раскола; 3 – накопитель со станками; 4 – навес над станками; 5 – дорога на пастбище; 6 – откидная фиксирующаяся горизонтально полка для инструментов и материалов; 7 – узкий коридор раскола – место для ветеринарных обработок при фиксации животных в порядке очередности; 8 – цепь фиксационная от транспортёра (с одной стороны приварена, с другой цепляется за штырь) 9 – боковой выход для выгона животных; 10 – фиксационная жердевая завала препятствующая движению животного взад; 11 – фиксационная калитка на завесах для прогона животных вперёд; 12 – место нахождения специалиста (верхняя планка и боковые столбы узкого прохода расположены с возможностью находиться здесь специалисту на период подгона следующего животного).

Научное издание

**Горбунов Юрий Анатольевич**  
**Минина Наталья Генриховна**

*БИОТЕХНОЛОГИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
ЭМБРИОНОВ В СКОТОВОДСТВЕ*

Монография

Компьютерная верстка: Н. Г. Минина

Подписано в печать 25.08.2014.  
Формат 60×84/16. Бумага офсетная.  
Печать Riso. Усл. печ. л. 13,25. Уч.-изд. л. 15,83  
Тираж 100 экз. Заказ 3684

*Издатель и полиграфическое исполнение:*



Учреждение образования  
«Гродненский государственный аграрный университет»  
Свидетельство о государственной регистрации  
издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий  
№ 1/304 от 22.04.2014.  
Ул. Терешковой, 28, 230008, г. Гродно.

Сверстано и отпечатано с материалов, предоставленных на электронных носителях. За достоверность информации, а также ошибки и неточности, допущенные авторами, редакция ответственности не несет.