

7,9%. Однако экстракт хвоя является отечественным препаратом, и стоимость его значительно ниже стоимости варостоба. Поэтому применение хвойного экстракта является экономически оправданным, так как он показал достаточно высокую эффективность.

Кроме того, при наблюдении за поведением пчел во время опыта отмечали, что по мере выздоровления пчелосемей работоспособность и активность пчел повысилась, пчелы стали лучше выкармливать расплод, отмечался более интенсивный лёт пчел на медосбор, причем более ярко это проявилось в группах пчелосемей, которым скармливали сахарный сироп с настоем перца горького и экстрактом хвои, следовательно, данные растительные препараты также обладают общеукрепляющим и тонизирующим действием.

Заключение. Наши исследования показали, что на пасеках Витебского района достаточно широко распространен варроатоз. При этом у подавляющего большинства инвазированных семей выявлена слабая степень поражения. Из лечебных препаратов наибольшую эффективность показали варостоб и экстракт хвои в дозе 5 мл экстракта на 10 л сахарного сиропа (1:1). Менее эффективен настой перца горького в дозе 5 мл на 1 литр сиропа (1:1).

Литература. 1. Панькив, Е. М. Варроатоз пчел / Е. М. Панькив, Е. Ф. Садовникова // Вклад молодых ученых в инновационное развитие АПК России : сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых, посвящ. 65-летию ФГОБУ ВО Пензенская ГСХА. – Пенза : РИО ПГСХА, 2016. – Т. 1. – С. 221–223. 2. Панькив, Е. М. Эффективность применения растительных препаратов при варроатозе пчел / Е. М. Панькив, Е. Ф. Садовникова // Молодежь – науке и практике АПК : материалы 102 Междунар. науч.-практ. конф. студентов и аспирантов, Витебск, 29–30 мая 2017 г. : в 2 ч. – Витебск : ВГАВМ, 2017. – Ч. 1 : Ветеринарная медицина и биологические науки. – С. 120.

Статья передана в печать 12.10.2018 г.

УДК 636.09:612.646:606:615.331

ИННОВАЦИОННЫЙ ЭТАП БИОТЕХНОЛОГИИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ – ПРОБИОТИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА СЛИЗИСТЫХ КОРОВ-ДОНОРОВ

*Сидашова С.А., **Авдосьева И.К., ***Григорашева И.Н., ****Стрижак А.В.
*СООО «АФ «Петродолинское», Одесская обл., Украина
**ДНДКИ ветеринарных препаратов и кормовых добавок, Львов, Украина
***ООО «Возрождение М», Одесса, Украина
****Харьковский НУ имени И.Н. Каразина, Харьков, Украина

*Среди факторов негативного действия на качество эмбрионов коров, извлеченных in vivo, большое влияние имеет клиническое состояние слизистых половой системы. Практически проверен альтернативный этап подготовки доноров, а именно, применение пробиотика «Мультибактерин ветеринарный Bs+La». В опыте коровы (n=13), после обработки слизистых пробиотиками в соответствии со схемой, показали лучшие данные прозрачности промывных сред из полости матки (92,31% in vitro), в контроле (n=18), соответственно – 11,11%. У коровы-донора в опыте установлено высокое качество всех полученных зародышей. Первые этапы альтернативной схемы пробиотической защиты слизистых доноров эмбрионов свидетельствуют о перспективности методики оптимизации трансплантации эмбрионов. **Ключевые слова:** корова-донор эмбрионов, слизистые оболочки, трансферабельность, морфология, пробиотики, нормофлоризация, in vitro.*

INNOVATIVE STAGE OF BIOTECHNOLOGY OF EMBRYON TRANSPLANTATION - PROBIOTIC PROTECTION OF MUCOUS DONOR COWS

*Sidashova S.A., **Avdosieva I.K., ***Grigorasheva I.N., ****Strizhak A.V.
* SOOO "AF" Petrodolinskoe ", Odessa region, Ukraine
** DNCDI of veterinary drugs and fodder additives, Lviv, Ukraine
*** LLC "Vozrozhdenie M", Odessa, Ukraine
**** Kharkov National University named after I. Karazin, Kharkov, Ukraine

*Among the factors of negative effect on the quality of embryos of cows, extracted in vivo, the clinical state of the mucous reproductive system has a great influence. The alternative stage of donor training has been practically tested, namely, the use of the probiotic "Veterinary Bacterial Multibacterin Bs + La". In the cow experiment (n = 13), after treatment with probiotic mucosa in accordance with the scheme, the best transparency data of washings from the uterine cavity (92.31% in vitro), in control (n = 18), respectively 11.11%. The donor cow in the experiment established the high quality of all the embryos obtained. The first stages of the alternative scheme of probiotic protection of mucous donors of embryos testify to the prospects of the optimization technique TE. **Keywords:** embryonic donor cow, mucous membranes, transferability, morphology, probiotics, normoflorization, in vitro.*

Введение. Интенсификация функции воспроизведения высокопродуктивных особей на сегодня является важным заданием промышленного животноводства, поэтому трансплантация эмбрионов (ТЭ) становится структурообразующим звеном биотехнологии ускоренного размножения генетически ценных животных, особенно актуальной в отрасли скотоводства, где селекция детерминирована малоплодностью самок крупного рогатого скота.

Значение методов ТЭ в современном промышленном скотоводстве подтверждается ежегодным наращиванием объемов эмбриодонации, криоконсервации и трансферов эмбрионов по данным Международной ассоциации эмбриотрансплантации (www.iets.org) [3, 7].

В условиях социально-экономического кризиса в Украине неконтролируемое распространение импортной селекции негативно влияет на современную и будущую генетику молочных стад, создает условия для деформации генофонда в сторону голштинской монопороды, снижает уровень продовольственной безопасности страны [3, 4].

За последние десятилетия были проведены многочисленные зарубежные и отечественные исследования по изучению факторов, влияющих на количество и качество эмбрионов после гормональной индукции полиовуляции (ПО) и трансцервикального вымывания из полости рогов матки самок-доноров (*in vivo*) [1, 5, 6]. На основе результатов научных экспериментов был разработан и внедрен в практику ряд инноваций, которые заметно упростили процессы трансцервикального извлечения эмбрионов и повлияли на развитие биотехнологии получения доимплантационных зародышей млекопитающих *in vitro*. Но, несмотря на эти достижения, процедуры подготовки животных к эмбриодонации остаются трудоемкими, затратными по времени, причем выход трансферабельных эмбрионов на один цикл обработки остается в среднем в пределах 5-7 зародышей [8, 24, 25]. Эти обстоятельства заметно сдерживают распространение метода и тормозят накопление генетических ресурсов в криобанках (виртуальных генетических криостада) [4].

В последнее время обращено внимание на значение клинического состояния слизистых коров в условиях кардинальной перестройки технологии промышленного производства молока. На основе анализа литературы и результатов собственных исследований мы проследили изменения в количественно-качественном составе эмбриосборов, полученных при разных методах стимуляции ПО доноров, и сделали заключение, что даже при оптимальной технологии содержания и кормления значительная часть фолликулярной продукции гонад коров-доноров была непригодна к дальнейшему использованию. Статистические данные разных источников обобщенно сообщают - качественные эмбрионы в эмбриосборе *in vivo* составляли 15-65% [1, 6].

Литературные источники подтверждают рост количества хронических воспалительных процессов в органах репродукции коров современных молочных пород, особенно при высоком уровне голштинизации поголовья. Донорские группы фактически и по генотипу являются наиболее продуктивной частью стада, для которой характерно проявление полиморбидности организма [4]. На фоне существенного снижения иммунитета высокопродуктивных животных в условиях формирования паразитобиоценозов промышленных комплексов, изменяются функциональные и барьерные возможности слизистых оболочек, в том числе эндометрия коров. Давление техногенных стрессов провоцирует формирование ассоциированных дисбиозов и патологических биопленок, характерных для современной условно-патогенной ассоциированной микрофлоры животноводческих помещений [2]. Все это создает условия для латентных воспалительных и деструктивно-склеротических изменений маточного эпителия, который утрачивает свою питательную и защитную функцию и становится неблагоприятной средой для зародыша. Известно, что между клиническим состоянием эндометрия и функцией яичников коров существует тесная физиологическая связь, что при хронических патологиях определенно негативно влияет на продукцию жизнеспособных зародышей после гормональной индукции ПО.

В литературе недостаточно освещены вопросы влияния клинического состояния слизистых оболочек на результативность *in vivo* эмбриодонации самок крупного рогатого скота.

Цель нашей работы определялась необходимостью разработки и проверки физиологически корректной методики подготовки слизистых коров-доноров к процедурам эмбриодонации *in vivo* и оценки качества эмбрионов *in vitro*.

Материалы и методы исследований. Научно-производственное исследование проводилось на базе ведущих племенных молочных предприятий Украины в три этапа. На первом этапе (2009-2012 гг.) проведен анализ результатов практической деятельности Лаборатории трансплантации эмбрионов «Полтаваплемсервис» по получению генетических ресурсов путем тестовых циклов эмбриодонации-вымывания эмбрионов у высокопродуктивных коров в трех стадах: № 1 – ПАТ «Полтаваплемсервис»; № 2 - ПрАТ «Агро-Союз» (Днепр); № 3 – ПП «РВД-Агро» (Черкассы). Используемые методики исследований и результаты работы Лаборатории ТЭ «Полтаваплемсервис» представлены в ряде публикаций и в электронной базе данных Европейской Ассоциации ТЭ. В группы обследованных коров подбирали полновозрастных коров молочных пород с продуктивностью 8500-14000 кг молока за лучшую лактацию. Во всех предприятиях условия содержания и эксплуатации высокопродуктивных коров племядра – потенциальных доноров эмбрионов в целом соответствовали зоогигиеническим требованиям, противозпизоотические мероприятия и профилактические вакцинации были проведены в соответствии с действующими ветеринарными требованиями.

ми. Все биотехнологические процедуры проводились в специальных станках для фиксации коров, в ходе опытов здоровью животных не причиняли вреда.

В ходе второго - третьего этапов нами была разработана и проверена альтернативная схема подготовительного этапа эксплуатации доноров, основой которой являлась метапрофилактика дисбиозов слизистых коров путем применения комплексной бактериальной терапии с дозированным вводом поликомпонентных пробиотиков (в контроле – традиционные схемы антибиотикотерапии). Проверка эффективности пробиотической защиты слизистых потенциальных доноров эмбрионов проводилась на базе племрепродуктора СООО «АФ «Петродолинское» Одесской области в 2016-2017 гг. (ферма № 4; представленная нумерация использована далее в тексте и таблицах).

Производственная проверка эффективности методики нормофлоризации слизистых коров-потенциальных доноров с использованием рабочей шкалы технологической прозрачности вымытых сред из полости матки представлена в таблице 1.

Инновационность методики заключалась в комплексном подходе к решению проблемы дисбиозов слизистых разных систем организма высокопродуктивных животных и расширению барьерного эффекта репродуктивных слизистых путем глубокой нормофлоризации (внутриматочные инфузии). Во всех процедурах нормофлоризации был задействован поликомпонентный пробиотик «Мультибактерин ветеринарный Bs+La», (Украина), состоящий из композиции живых симбиотических культур штаммов *Lactobacillus acidophilus* *um. Aw* (10^9 м.т./см³), *Bacillus subtilis* 534 (10^9 м.т./см³), *Bacterium bifidum adolescentis* C (10^9 м.т./см³).

Результаты исследований. Результаты исследований были суммированы и представлены в таблицах и фото. Полученные данные были обработаны в соответствии с программой IBM Statistics – 2011 (Version 20) с исчислением стандартных статистических показателей.

Таблица 1 - Схема профилактики повреждений слизистых оболочек в контрольной и опытной группах коров-потенциальных доноров перед процедурами ТЭ

Периоды обработки	Процедуры, препараты, дозирование, способы введения, морфофункциональный контроль состояния органов репродукции	
	Опыт	Контроль
1-й день	Комплексное гинекологическое обследование потенциального донора эмбрионов (вагинальное, ректальное, УЗИ)*; оценка эффективности переваривания /транзита кормов, состояния фекалий.	Комплексное гинекологическое обследование потенциального донора эмбрионов (вагинальное, ректальное, УЗИ)*.
2-й день и далее до начала гормонограммы		Внутриматочная глубокая антисептика с применением препаратов с антибиотиками (в соответствии с чувствительностью микрофлоры или широкого спектра противомикробного действия). Кратность, дозы и продолжительность курса определяются, исходя из показаний клинического состояния животного и наставлений к применению препаратов.
2-й день и далее: за 4-5 недель до начала гормонограммы	Пробиотический препарат «Мультибактерин ветеринарный Bs+La» вводится методом аэрации и смешивания с другими компонентами моноорма в дозе 5-10 мл на гол./день.	
За 3-4 недели до начала гормонограммы	Внутриматочное введение взвеси «Мультибактерин ветеринарный Bs+La» в дозе 30-100 мл** на протяжении 3-5 дней однократно (разведение теплой дистиллированной водой или физраствором 1:10; первое введение – разведение 1:1-3). Внутривагинальное орошение слизистых той же взвесью 2-4 раза.	
За 1-2 недели до начала гормонограммы	Витаминизация и применение препаратов - биостимуляторов: в соответствии с выбранной схемой подготовки самки к эмбриодонации.	Витаминизация и применение препаратов - биостимуляторов: в соответствии с выбранной схемой подготовки самки к эмбриодонации.
За 7-10 дней до начала гормонограммы	Комплексная гинекологическая диагностика состояния репродуктивных органов. Проверка транзита кормов.	

Таблица 2 - Анализ количественно-качественного состава эмбриосборов от позитивных коров-доноров украинских племенных предприятий

Предприятие №	n*	Всего эмбриосбор **	В т. ч. качественные эмбрионы по морфологической оценке <i>in vitro</i> :			±m
			ТФЭ, шт.***	%	ТФЭ/цикл-донор	
1	17	162	76	46,91	4,47	0,06
2	13	142	68	47,89	5,23	0,08
3	12	137	92	67,15	7,67	0,08
4	1****	4	4	100,0	4,00	1,00
M ± m	43	445	240 ±5,34 ^a	53,93	5,58±1,63 ^b	

Примечания: * - количество коров с позитивной реакцией ПО после гормональной стимуляции и трансцервикального извлечения ≥ 3-х качественных эмбрионов; ** - сумма всех извлеченных эмбрионов (качественные + дегенерированные) + яйцеклетки; ТФЭ *** - качественные, пригодные к дальнейшему развитию эмбрионы; **** - № 4 – гормонограмма с препаратом СЖК (синхростин), № 1-3 – гормонограммы с препаратами ФСГ; a-b (p < 0,01) r = + 0,712.

В таблице 3 показано, что в опытной группе (n=12) в ходе проверки прозрачности вымытой среды только в одном случае (8,33%) в поле зрения микроскопа были видны незначительные помутнения в виде прозрачной слизи. Промывная среда из матки позитивного донора в опыте имела максимальную визуальную прозрачность и пригодность к поиску эмбрионов.

Таблица 3 - Сравнение показателей визуальной чистоты промывных сред из матки коров-доноров эмбрионов (оценка *in vitro* в поле зрения светового микроскопа 29x)

Процедура вымывания	Контроль (ферма № 3): антибиотикотерапия		Опыт (ферма № 4): пробиотическая защита		±m
	n	% прозрачных образцов	n	% прозрачных образцов	
Тестовые вымывания (индуцированный цикл)*	12	8,33	12	91,67	1,00
Фактические вымывания – эмбриосборы**	6	16,67	1	100,00	0,17
M ± m	18	11,11±4,25 ^a	13	92,31±4,64 ^b	

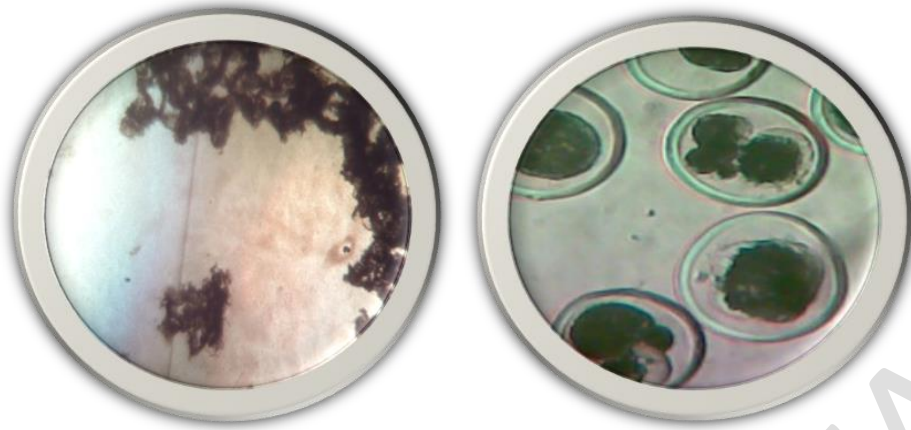
Примечания: * - пробные вымывания полости матки после индукции одиночной овуляции (тест); ** - вымывания *in vivo* у доноров после предварительной гормональной стимуляции ПО и извлечения эмбрионов разного качества; a-b (p < 0,05) r = + 0,901.

В контрольной группе, где использовали традиционную схему гинекологической терапии [6, 8], в тестовых вымываниях были визуально прозрачными лишь 8,33% сред, а у позитивных доноров – 16,67 % (рисунок 1а). Среди общего эмбриосбора (n=6 доноров) установлено в контроле 32,85% дегенерированных эмбрионов и яйцеклеток (рисунок 1б).

Латентное течение хронических эндометритов с нечеткими или отсутствующими симптомами характерно для высокопродуктивных коров, которые являются потенциальными донорами генетических ресурсов (эмбрионов). Опыт показал, что традиционная этиологическая противомикробная терапия гинекологических патологий лактирующих коров часто малоэффективна и провоцирует развитие дегенеративно-склеротических процессов в слизистых репродуктивного тракта. Последствием этого является существенное снижение генеративного потенциала лучших коров племенных стад.

Предложенный нами альтернативный подход к реабилитации репродуктивной функции коров опирается на биологические особенности культур симбиотической нормофлоры млекопитающих, которые в условиях современных промышленных технологий животноводства приобрели важные преимущества для адекватной коррекции дисбиозов слизистых оболочек. Преимущество пробиотика «Мультибактерин ветеринарный Bs+La» перед другими пробиотиками кроется в мультиспецифичности его влияния на здоровье животных.

Кроме того, комплексное использование пробиотиков нормализует половую функцию самок КРС не только за счет противовоспалительного и детоксикационного действия, но и в результате увеличения секреции эндогенных гормоноподобных веществ, что имеет прямое позитивное влияние на эмбриопродуктивность.



А. Вид под микроскопом (29х) промывной среды (видны отслоенные части эпителия, некротические частицы тканей)

Б. Дегенерированные эмбрионы на разной стадии распада, извлеченные из полости рогов матки донора на 7-й день после ПО: морфологическая оценка *in vitro* (29х)

Рисунок 1 - Микроскопическая картина промывной среды из полости матки коровы контрольной группы (гинекологическая антисептика – антибиотикотерапия)
(Фото автора из архива Лаборатории ТЭ «Полтаваплемсервис»)

За последние годы рядом исследований значительно расширены критерии оценки активности представителей нормальной микрофлоры, в том числе и тех, которые рекомендуются для ввода в состав пробиотических препаратов. Как одно из направлений в изучении возможностей культуры симбиотической микрофлоры – неотъемлемого компонента обеспечения эпизоотического благополучия в условиях промышленного животноводства, начато наше исследование, которое будет продолжено после возобновления финансирования.

Заключение. Проведенными исследованиями установлено, что 46,49% *in vivo* эмбриосборов у коров-доноров составляли дегенерированные эмбрионы и неоплодотворенные яйцеклетки, а лабораторный поиск эмбрионов был затруднен из-за низкой визуальной прозрачности промывных сред (8,33% визуально чистых образцов в контроле).

Экспериментальная проверка пробиотической методики подготовки коров-доноров к процедурам эмбриодонации путем применения композиции симбиотических культур штаммов, *Lactobacillus acidophilus* *str.* *Aw*, *Bacillus subtilis* 534, *Bacterium bifidum adolescentis* C, входящих в состав пробиотика «Мультибактерин ветеринарный Bs+La», показала оптимизацию методики ТЭ на этапах вымывания *in vivo* ранних зародышей (в опыте все эмбрионы были высокого качества); поиска *in vitro* (92,31% визуально чистых промывных сред) и разработки экологически корректных способов повышения продуцирования трансферабельных доимплантационных эмбрионов. Начатые исследования требуют продолжения для обеспечения бесперебойного производства генетических ресурсов лучших племенных стад Украины.

Литература. 1. Мельник, В. О. *Акушерство, гинекологія і біотехнологія відтворення тварин : конспект лекцій* / В. О. Мельник, С. О. Сідашова. – Миколаїв, 2013. – 140 с. 2. Сідашова, С. О. *Методика оцінки генетичного потенціалу високопродуктивних корів – донорів ембріонів молочних порід племінних стад вітчизняних підприємств* / С. О. Сідашова // *Мат. наук.-метод. конференції проф.-виклад. складу та аспірантів ветеринарного факультету ОДДАУ, 16-18 квітня 2017 р.* – Одеса. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://osau.edu.ua/uk/kontakti>. 3. Сідашова, С. А. *Ефективне виробництво: від діагнозу к стельності* / С. А. Сідашова // *Матер.1 Междун. науч.-практ. конф. «Молочная империя».* – Донецк, 2012. – С. 236-246. 4. Сідашова, С. О. *Досвід застосування пробіотичного захисту слизових для удосконалення технології трансплантації ембріонів ВРХ* / С. О. Сідашова, І. К. Авдосьєва, І. М. Григорашева // *Науково-техніч. бюл. ІБТ і ДНДКІ ветпрепаратів і кормових добавок.* – 2017. – Вип. 17. – С. 116-119. 5. Selk, G. *Embryo transfer in cattle* / G. Selk // *Division of Agricultural Sciences and Natural Resources – Oklahoma Cooperation Service.* - 2014. - № 3158. – P. 4. 6. Pener, P. *The International Transfer School* / P. Pener // *Internet resource / mhtml:file // G:school transfer.mht.* – 20.04.2012. – 22 p. 7. *Transplantation of embryos at dairy cattle* // [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/2017/file>.

Статья передана в печать 30.10.2018 г.