

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ СМЕРТНОСТИ У МОЛОЧНЫХ КОРОВ

А.Г. НЕЖДАНОВ¹, В.И. МИХАЛЁВ¹, Е.Г. ЛОЗОВАЯ², К.А. ЛОБОДИН²,
В.А. САФОНОВ³

Ранняя эмбриональная смертность и ее высокая частота у лактирующих коров — причины снижения потенциала плодовитости животных, темпов их воспроизводства и рентабельности в современном молочном скотоводстве. Целью настоящей работы было выявление патогенетической значимости эндокринных, метаболических и иммунных нарушений у лактирующих коров в проявлении эмбриональной смертности на ранних этапах гестации. Исследования проводили на коровах черно-пестрой породы со среднегодовой молочной продуктивностью 6,4-7,6 тыс. кг. Диагностику беременности и эмбриональной смертности осуществляли на 19-е-23-и, 28-32-е и 38-45-е сут после искусственного осеменения. Применяли метод трансректального эхографического обследования с использованием ультразвукового сканера Easi-Scan-3 («BCF Technology», Великобритания). В те же сроки от коров, у которых проходило физиологическое формирование эмбриона ($n = 9$, контроль), а также от животных, у которых была зафиксирована его гибель ($n = 9$), получали венозную кровь для лабораторных исследований. В сыворотке крови определяли концентрацию половых гормонов прогестерона, эстрадиола-17 β и тестостерона методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем (ООО «Хема-Медика», Россия) и анализатора иммуноферментных реакций Униплан АИФР-1 (ЗАО «Пикон» Россия). Содержание в сыворотке и цельной крови белков, общих иммуноглобулинов, мочевины, креатинина, холестерина, глюкозы, витаминов Е и С, общего кальция, неорганического фосфора, связанного с белком йода (СБЙ), среднемолекулярных пептидов (СМП), малонового диальдегида (МДА), активность щелочной фосфатазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаргатаминотрансферазы (АсАТ), γ -глутамилтрансферазы (ГГТ), глутатионпероксидазы (ГПО), каталазы определяли посредством унифицированных методов исследования с помощью биохимического анализатора Hitachi-902 («Roche Diagnostics GmbH», Германия-Япония) и спектрофотометра UV 1700 («Shimadzu Corp.», Япония); количество цинка, меди, марганца, селена, магния — на атомно-адсорбционным спектрометре Perkin Elmer-703 («PerkinElmer», США), морфологический состав крови на гемоанализаторе ABX Micros 60 («ABX Diagnostics», Франция). Бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) и лизоцимную активность сыворотки крови (ЛАСК), циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) определяли в соответствии с методическими рекомендациями по оценке и коррекции иммунного статуса животных. Установлено, что эмбриональная смертность у коров ассоциирована с эндокринной недостаточностью половых желез. Продукция прогестерона у них в сравнении с животными контрольной группы на разных этапах гестации была ниже на 12,0-43,3 %, эстрадиола-17 β — на 45,0-85,5 %. Их метаболический профиль характеризовался повышением концентрации в крови белка на 3,2-5,4 %, мочевины — на 9,8-23,6 %, креатинина — на 10,1-13,5 %, холестерина — на 10,9-17,1 %, СМП — на 6,1-34,7 %, активности ЩФ — на 12,8-36,2 %, АлАТ — на 3,6-13,2 %, АсАТ — на 13,8-30,8 %, ГГТ — на 45,4-77,5 %, индекса эндогенной интоксикации — на 13,0-40,0 %, что было следствием печеночной и почечной недостаточности, проявлением синдрома холестаза и эндогенной интоксикации. Наблюдался дефицит эссенциальных биоэлементов, повышенная активность процессов перекисного окисления липидов, пониженная активностью системы антиоксидантной защиты, накопление токсических продуктов ПОЛ и развитие окислительного стресса. При гибели эмбрионов у коров концентрация цинка в крови была меньше, чем в контроле, на 9,7-27,2 %, меди — на 17,6-23,3 %, марганца — на 10,8-15,2 %, селена — на 16,3-29,1 %, СБЙ — на 7,3-33,4 %, магния — на 9,7-27,4 %, происходило снижение активности ГПО на 25,8-31,2 %, каталазы — на 26,5-51,2 %, содержания витамина Е — на 26,3-31,6 %, витамина С — на 25,1-57,1 %. В крови у коров увеличивалось количество лейкоцитов, их нейтрофильных и эозинофильных форм, моноцитов при снижении фагоцитарной активности, количества лимфоцитов, иммуноглобулинов, БАСК и ЛАСК. Наблюдался влагалищный дисбиоз. Таким образом, в многофакторной этиологии ранней эмбриональной смертности детерминирующими патофизиологическими факторами выступают дисэлементозы, оксидативный стресс и эндогенная интоксикация, эндокринная и иммунная недостаточность.

Ключевые слова: коровы, эмбриональная смертность, дисэлементозы, окислительный стресс, эндогенная интоксикация, эндокринная и иммунная недостаточность.

У лактирующих коров эмбриональная смертность (внутриутробная гибель зародышей на ранних этапах их формирования и развития) становится одной из актуальных проблем современного молочного скотовод-

ства. Частота этой патологии колеблется от 20 до 45 % (1-5) и повышается с ростом молочной продуктивности (6-8), сопровождающейся глубокой перестройкой эндокринного, метаболического и иммунного гомеостаза в организме животных. По сообщениям некоторых авторов (6, 7), она может составлять 48-55 %. В исследованиях С.В. Белика (8) ранняя гибель зародыша у коров с молочной продуктивностью до 6 тыс. кг была зафиксирована у 33 % животных, 6-7 тыс. кг — у 43 %, более 7 тыс. кг — у 67 % коров.

За последние десятилетия молочная продуктивность коров увеличилась с 4-5 тыс. до 8-11 тыс. кг, а их оплодотворяемость от первого осеменения, клинически диагностируемая через 50-60 сут, снизилась с 60-65 до 32-35 % (9-12). Повышение эмбриональной смертности ведет к снижению потенциала плодовитости коров, темпов воспроизводства и рентабельности всей отрасли. Поэтому раскрытие патогенетической значимости материнских факторов риска этой патологии имеет как научное, так и практическое значение для разработки эффективных методов профилактики.

В представленной работе мы впервые провели комплексную оценку показателей гормонального, метаболического и иммунного статуса лактирующих коров на ранних сроках гестации при физиологическом формировании эмбриона и его гибели. Показана патогенетическая значимость дисэлементозов, оксидативного стресса, эндогенной интоксикации, эндокринной иммунной недостаточности в нарушении эмбрионального развития.

Цель работы — выявление роли эндокринных, метаболических и иммунных нарушений у лактирующих коров в проявлении эмбриональной смертности на ранних этапах гестации.

Методика. Исследования выполняли в зимний период 2014 года в условиях ООО «СП Вязноватовка» (Нижедевицкий р-н, Воронежская обл.) на коровах черно-пестрой породы (общее число лактирующих коров в эксперименте — 32) со среднегодовой молочной продуктивностью 6,4-7,6 тыс. кг при привязной технологии содержания. Рацион животных включал силос кукурузный (25 кг), сено эспарцета (3 кг), солому ячменную (3 кг), зерносмесь (7 кг), жмых подсолнечный (1 кг). Суточное потребление корма в перерасчете на сухое вещество составляло 17,6 кг (в 1 кг содержалось 5,5 г кальция, 4,0 г фосфора, 2,3 г магния, 7,2 мг меди, 33,0 мг цинка, 34,5 мг марганца, 0,18 мг селена, 0,37 мг йода).

Диагностику беременности и эмбриональных потерь проводили на 19-е-23-и, 28-32, 38-45 сут после искусственного осеменения посредством трансректального эхографического обследования ультразвуковым сканером Easi-Scan-3 («BCF Technologi», Великобритания) с линейным датчиком 4,5-8,5 МГц (13). В те же сроки гестации от коров, у которых прошло физиологическое формирование эмбриона ($n = 9$, контроль), а также от животных, у которых была зафиксирована его гибель ($n = 9$), получали венозную кровь для лабораторных исследований.

В сыворотке крови определяли концентрацию половых гормонов (прогестерон, эстрадиол-17 β , тестостерон) методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем (ООО «Хема-Медика», Россия) и анализатора иммуноферментных реакций Униплан АИФР-1 (ЗАО «Пикон» Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

Содержание в сыворотке и цельной крови белков, общих иммуноглобулинов, мочевины, креатинина, холестерина, глюкозы, витаминов Е и С, общего кальция, неорганического фосфора, связанного с белком йода (СБЙ), среднемолекулярных пептидов (СМП), малонового диальдегида (МДА), активность щелочной фосфатазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы

(АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), γ -глутамилтрансферазы (ГГТ), глутатионпероксидазы (ГПО), каталазы оценивали с помощью унифицированных методов исследования показателей обмена веществ (14) с использованием биохимического анализатора Hitachi-902 («Roche Diagnostics GmbH», Германия-Япония) и спектрофотометра UV 1700 («Shimadzu Corp.», Япония); количество цинка, меди, марганца, селена, магния — на атомно-адсорбционном спектрометре Perkin Elmer-703 («PerkinElmer», США), морфологический состав крови — на гемоанализаторе АВХ Micros 60 («АВХ Diagnostics», Франция). Бактерицидную (БАСК) и лизоцимную активность сыворотки крови (ЛАСК), циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) определяли в соответствии с методическими рекомендациями по оценке и коррекции иммунного статуса животных (15). Цервикально-вагинальную слизь исследовали на общую бактериальную обсемененность, определяли титр энтеро-, лакто- и бифидобактерий, а также наличие грибов общепринятыми микробиологическими методами.

Полученные в эксперименте данные обрабатывали с применением прикладной программы Statistica 8.0 («StatSoft Inc.», США). В таблицах приведены средние значения (X) и ошибка (x). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Гибель эмбрионов у коров регистрировали на фоне функциональной недостаточности половых желез (табл. 1). Так, содержание в крови у животных прогестерона при гибели зародыша на разных этапах гестации было на 12,0-43,3 % ниже, чем в контроле. При нормальном формировании эмбриона этот показатель у коров-матерей возрастал на 28,8 %, при гибели эмбриона — снижался по сравнению с первоначальными значениями на 18,0 %.

1. Концентрация половых стероидов в сыворотке крови у коров черно-пестрой породы при физиологическом формировании эмбриона и его гибели ($X \pm x$, ООО «СП Вязноватовка», Нижнедевицкий р-н, Воронежская обл., 2014 год)

Гормон	Срок гестации, сут		
	19-е-23-и	28-32-е	38-45-е
Прогестерон, нмоль/л	31,6 \pm 3,61/27,8 \pm 2,84	40,7 \pm 6,17/24,2 \pm 2,81*	40,2 \pm 5,06/22,8 \pm 3,33**
Тестостерон, нмоль/л	1,63 \pm 0,21/1,78 \pm 0,37	2,08 \pm 0,28/1,96 \pm 0,40	2,86 \pm 0,56/1,15 \pm 0,17*
Эстрадиол-17 β , пмоль/л	146,2 \pm 26,2/78,8 \pm 22,6	117,3 \pm 10,5/80,9 \pm 5,5*	142,1 \pm 14,6/40,4 \pm 7,0**

Пр и м е ч а н и е. Перед и после косой — соответственно физиологическое формирование и гибель эмбриона.
*, **, *** Соответственно $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ относительно контроля (физиологическое формирование эмбриона).

Развивающаяся гипопрогестеронемия влечет за собой не только неполноценность секреторной трансформации эндометрия и снабжения формирующегося зародыша питательными веществами, но и повышение агрессивной реакции периферических мононуклеаров (лимфоцитов, моноцитов) и макрофагов эндометрия в отношении тканей эмбриона через активацию продукции антител, кислородного взрыва макрофагов и стимуляцию выработки противовоспалительных цитокинов (15–20).

2. Биохимические показатели крови у коров черно-пестрой породы при физиологическом формировании эмбриона и его гибели ($X \pm x$, ООО «СП Вязноватовка», Нижнедевицкий р-н, Воронежская обл., 2014 год)

Показатель	Срок гестации, сут		
	19-е-23-и	28-32-е	38-45-е
Белок общий, г/л	81,1 \pm 1,1/83,9 \pm 1,8	80,0 \pm 1,4/82,6 \pm 1,4	79,8 \pm 2,9/84,1 \pm 1,9
Мочевина, ммоль/л	3,14 \pm 0,16/3,88 \pm 0,27	3,21 \pm 0,31/3,56 \pm 0,06	3,41 \pm 0,25/3,54 \pm 0,34
Креатинин, мкмоль/л	78,4 \pm 2,9/86,3 \pm 3,4	78,7 \pm 2,7/89,3 \pm 6,8	84,8 \pm 5,3/85,4 \pm 5,3
Холестерин, ммоль/л	6,15 \pm 0,16/7,20 \pm 0,39*	5,87 \pm 0,18/6,59 \pm 0,19*	5,99 \pm 0,27/6,75 \pm 0,29
Глюкоза, ммоль/л	2,75 \pm 0,06/2,55 \pm 0,04	2,39 \pm 0,06/2,36 \pm 0,04	2,87 \pm 0,09/2,91 \pm 0,22

	<i>Продолжение таблицы 2</i>		
Щелочная фосфатаза, Е/л	60,6±5,2/82,6±6,5*	63,5±4,7/71,6±6,2	67,2±5,2/103,4±7,4**
Аланинаминотрансфераза, Е/л	29,4±2,4/31,5±1,9	30,8±1,4/31,9±2,5	34,1±2,9/38,6±2,8
Аспаргатаминотрансфераза, Е/л	64,4±4,8/64,7±3,9	58,7±4,0/76,8±7,6	62,9±3,9/71,6±4,4
γ-Глутамилтрансфераза, Е/л	22,5±1,8/31,6±2,9*	20,9±1,2/37,1±5,8*	18,5±0,8/26,9±1,8***
Среднемолекулярные пептиды, усл. ед.	0,46±0,03/0,57±0,03*	0,49±0,03/0,52±0,04	0,49±0,05/0,66±0,05*
Индекс эндогенной интоксикации, усл. ед.	19,1±0,9/24,6±0,04***	18,4±1,2/20,8±0,9	16,6±0,7/22,9±1,2***
Кальций общий, ммоль/л	2,76±0,09/2,56±0,09	2,84±0,09/2,60±0,10	2,80±0,08/2,48±0,11
Фосфор неорганический, ммоль/л	1,77±0,11/1,93±0,07	1,92±0,07/1,74±0,11	1,90±0,09/1,84±0,13
Магний, ммоль/л	1,26±0,01/1,02±0,03***	1,36±0,03/0,99±0,02***	1,13±0,05/1,02±0,03
Цинк, мкмоль/л	52,7±2,51/34,0±3,24***	40,8±2,83/31,2±3,03***	41,2±1,91/31,7±2,42**
Медь, мкмоль/л	17,5±0,84/13,9±0,33**	18,7±0,71/15,4±1,44*	15,9±0,72/12,2±0,96*
Марганец, мкмоль/л	2,64±0,11/2,24±0,14	3,43±0,07/3,06±0,18	2,50±0,07/2,58±0,14
Селен, мкмоль/л	1,27±0,08/1,00±0,11*	1,41±0,13/1,00±0,08*	1,23±0,10/1,03±0,09
Йод, связанный с белком, мкг%	4,10±0,17/3,80±0,24	4,58±0,14/3,05±0,15**	4,25±0,22/3,65±0,13*

Примечание. Перед и после косой — соответственно физиологическое формирование и гибель эмбриона.
 *, **, *** Соответственно $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ относительно контроля (физиологическое формирование эмбриона).

О нарушении гормонсинтезирующей функции яичников у коров с эмбриональной смертностью свидетельствовала также низкая концентрация в их крови эстрадиола-17β и тестостерона, ответственных за синтез белков у эмбриона и пролиферативные изменения в тканях матки у коров (см. табл. 1). В 1-й мес гестации разница с контрольными животными по содержанию эстрадиола-17β составила 45,0-85,5 %, к моменту гибели эмбриона — 352,0 %. Концентрация тестостерона в крови у коров с нормальным формированием эмбриона постепенно возрастала с 1,63±0,21 до 2,86±0,56 нмоль/л, или на 75,4 % ($p < 0,001$). При гибели эмбриона содержание тестостерона в 1-й мес гестации достоверно не отличалось от контроля, а к моменту гибели оказалось ниже в 2,5 раза.

При оценке метаболического статуса коров было установлено, что реализация генетической программы формирования и развития эмбриона в первые 1,5 мес гестации физиологически протекает без выраженных изменений содержания в крови общего белка, холестерина, глюкозы, кальция, активности АсАТ (табл. 2). Вместе с тем в крови отмечалось постепенное увеличение концентрации мочевины на 8,6 %, креатинина — на 8,2 %, фосфора — на 7,3 %, среднемолекулярных пептидов — на 6,5 %, активности ЩФ — на 10,9 %, АлАТ — на 16,0 %, а также снижение активности ГГТ на 17,8 % и индекса эндогенной интоксикации — на 13,1 %. Эти изменения отражали усиление обменных процессов у коров-матерей уже на ранних этапах плацентации эмбриона.

При гибели эмбриона концентрация в крови белков в разные сроки исследований превышала аналогичный показатель в контроле на 3,2-5,4 %, содержание мочевины — на 9,8-23,6 %, креатинина — на 10,1-13,5 %, холестерина — на 10,9-17,1 %, среднемолекулярных пептидов — на 6,1-34,7 %, активность ЩФ возрастала на 12,8-36,3%, АлАТ — на 3,6-13,2 %, АсАТ — на 13,8-30,8 %, ГГТ — на 45,4-77,5 %, индекс эндогенной интоксикации — на 13,0-40,0 %. В совокупности эти показатели у коров с эмбриональной смертностью отражали нарушение функциональной деятельности печени и почек, проявляющиеся синдромами холестаза и эндогенной интоксикации.

Повышенная эндогенная интоксикация у животных с гибелью эмбриона была сопряжена с дефицитом прооксидантных биоэлементов и с пониженной активностью системы антиоксидантной защиты (см. табл. 2, 3). Так, у таких коров концентрация цинка в крови оказалась ниже контроля на 9,7-27,2 %, меди — на 17,6-23,3 %, марганца — на 10,8-15,2 %,

селена — на 16,3-29,1 %, йода, связанного с белком, — на 7,3-33,4 %.

Цинк — незаменимый биоэлемент в процессах синтеза и репарации ДНК, роста, размножения, дифференциации и миграции клеток, эмбриогенеза и иммуногенеза (21-25). Его биологические свойства связаны с индукцией цинк-медь-зависимой супероксиддисмутазы, защитой ДНК и транскрипционных белков от свободнорадикального окисления, ингибированием протеиназ, нейтрализацией бактериальных липополисахаридов и токсических металлов. При дефиците цинка снижается секреция половых и кортикостероидных гормонов, усиливается экспрессия цитокинов и воспалительные процессы в матке, подавляется размножения клеток и рост эмбриона. Медь определяет активность медь-цинк-зависимой супероксиддисмутазы, входит в состав церулоплазмينا и действует как антиоксидант, защищая размножающиеся клеточные структуры от перексидного стресса. При ее дефиците активируются процессы свободнорадикального окисления, снижается гормонопродуцирующая функция гипоталамуса, гипофиза и половых желез, что приводит к повышению смертности и резорбции эмбрионов (23, 24).

Дефицит селена и йода как составных компонентов биологически активных соединений (глутатионпероксидазы, йодтирониндейодиназы, тиреоидных гормонов) сопровождается усилением перекисидации липидов, нарушением общего метаболизма, снижением активности системы гипофиз—гонады, клеточного роста и тканевой дифференциации, гормоногенеза и иммуногенеза (26-31).

Достоверных различий по содержанию в крови марганца между группами животных мы не выявили, однако не исключаем роли дефицита этого микроэлемента в эмбриональной смертности. Такая роль показана в работах зарубежных исследователей (32, 33).

Дефицит магния в организме тоже приводил к ранней эмбриональной смертности. При гибели эмбриона его содержание в крови у коров было на 9,7-27,9 % ниже контроля. По-видимому, недостаток магния уменьшает энергетический потенциал размножающихся эмбриональных клеток, активность метаболических процессов и детоксикационных систем организма, усиливает синтез простагландинов E₂ и F₂, вызывая развитие эндотелиоза и снижение прогестеронсинтезирующей функции желтого тела яичника (34, 35).

Для коров, у которых фиксировали эмбриональную смертность, было характерно снижение содержания в крови кальция (на 7,2-11,4 % по сравнению с контролем). Четкие доказательства его специфического влияния на эмбриогенез отсутствуют. Возможно, дефицит кальция опосредуется через влияние на обмен эссенциальных микроэлементов.

В клинических опытах зарубежных исследователей (36, 37) было показано, что парентеральные инъекции коровам солей цинка, меди, селена и марганца способствуют повышению выживаемости эмбрионов на 9-13 %. Биологически необходимая аккумуляция биоэлементов (как и других нутриентов) в эмбрионе полностью определяется метаболическим статусом материнского организма (32). Можно утверждать, что дефицит и дисбаланс в биоэлементном статусе у лактирующих коров с эмбриональной смертностью связан с более высокой молочной продуктивностью и повышенным выведением микроэлементов из организма с молоком. Суточный удой у коров с физиологическим развитием эмбриона составлял $20,2 \pm 1,21$ кг молока, у коров с проявлением эмбриопатий — $24,6 \pm 1,03$ кг, что было выше на 21,8 % ($p < 0,05$).

Дефициту эссенциальных микроэлементов сопутствовали ослабле-

ние антиоксидантной защиты и повышенная активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (табл. 3). Нормальный эмбриогенез у коров протекал при некотором повышении активности свободнорадикального окисления липидов, о чем свидетельствовало увеличение концентрации в крови МДА на 6,4-8,9 %.

3. Показатели функционального состояния антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов у коров черно-пестрой породы при физиологическом формировании эмбриона и его гибели ($\bar{X} \pm x$, ООО «СП Вязноватовка, Нижнедевицкий р-н, Воронежская обл., 2014 год)

Показатель	Срок гестации, сут		
	19-е-23-и	28-32-е	38-45-е
МДА, мкмоль/л	1,24±0,11/1,79±0,14**	1,35±0,10/2,14±0,19**	1,32±0,10/1,83±0,11
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /л · мин	29,7±0,9/21,6±0,8***	34,6±0,5/16,9±0,4***	31,4±0,5/20,9±0,8***
ГПО, ммоль GSH/л · мин	18,2±0,9/13,5±0,9***	15,2±1,2/14,4±1,2	17,3±0,5/11,9±1,1***
Витамин Е, ммоль/л	36,9±3,3/27,2±2,2*	35,9±2,5/24,0±1,3***	34,8±2,9/23,8±1,9**
Витамин С, ммоль/л	19,8±1,4/8,5±0,9***	17,7±0,6/9,9±0,6***	17,9±0,8/13,4±1,1**

Примечание. Перед и после косой — соответственно физиологическое формирование и гибель эмбриона. GSH — восстановленный глутатион. МДА — малоновый диальдегид, ГПО — глутатионпероксидаза.
*, **, *** Соответственно $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ относительно контроля (физиологическое формирование эмбриона).

У коров с эмбриональной смертностью на 19-е-23-и сут формирования зародыша концентрация МДА в крови превысила показатель у контрольных животных на 44,3 %, на 28-32-е сут — на 58,5 %. Высокое содержание МДА сохранялось и после смерти эмбриона. Превышение контрольных значений на 38-45-е сут составило 38,6 %. Увеличение накопления токсических продуктов ПОЛ, по всей видимости, было связано с усиленным образованием активных форм кислорода (АФК) и активизацией процессов ПОЛ, а также с недостаточной эффективностью внутриклеточных и плазменных механизмов антиоксидантной защиты. Активность каталазы у таких животных по сравнению с контрольными в период имплантации была ниже на 26,5 %, в начальный период плацентации — на 51,2 %.

При клинически установленной гибели зародыша (38-45-е сут) эти различия составили 33,4 %. Показатели активности ГПО в случае гибели эмбрионов были ниже, чем у здоровых животных: при имплантации — на 25,8 %, при смерти — на 31,2 %, витамина Е — соответственно на 26,3 и 31,6 %, витамина С — на 57,1 и 25,1 %. Дефицит энзимных и неэнзимных антиоксидантов следует связать с их высоким расходом на детоксикацию и элиминацию активно вырабатываемых агрессивных свободных радикалов и с истощением резервов системы антиоксидантной защиты (АОЗ) из-за дефицита эссенциальных биоэлементов. Нарушение динамического равновесия в системе ПОЛ—АОЗ, сопровождаемое избыточным накоплением токсических продуктов ПОЛ, влечет развитие окислительного стресса, характеризующегося необратимой окислительной модификацией и повреждением белков и ДНК (38, 39), который следует считать одной из составных частей патогенеза эмбриопатий у коров.

Неблагоприятные последствия окислительного стресса для формирующегося эмбриона связаны не только с прямым эмбриотоксическим действием агрессивных форм свободных радикалов, но и с их негативным влиянием на гормонсинтезирующие структуры половых желез и иммунокомпетентную систему организма.

Уже на 19-е-23-и сут гестации в крови коров с риском гибели эмбриона отмечали увеличение общего количества лейкоцитов (на 12,9 %) и их нейтрофильных форм (на 14,0 %) (табл. 4), что могло свидетельствовать об интоксикации или развитии воспалительного процесса в половых органах. Также увеличивалось содержание моноцитов (на 77,8 %), которые слу-

жат активными фагоцитами и предшественниками тканевых макрофагов и вырабатывают компоненты комплемента.

О развитии токсических, аллергических и аутоиммунных реакций у коров при гибели эмбриона свидетельствовало увеличение (в 2 раза) содержания в крови эозинофилов, обеспечивающих разрушение гистамина, токсинов белкового происхождения, чужеродных белков и иммунных комплексов. При этом концентрация ЦИК (комплекс антиген-антитело-комплемента) у животных в этой группе была в 2,96 раза выше, чем у коров с нормальным течением беременности. Избыточное накопление ЦИК, связанное с развитием аллергических реакций, ведет к разрушению тканей половых органов и может затрагивать формирующийся зародыш.

4. Показатели иммунной защиты и естественной резистентности у коров чернопестрой породы при физиологическом формировании эмбриона и его гибели ($\bar{X} \pm x$, ООО «СП Вязноватовка», Нижнедевицкий р-н, Воронежская обл., 2014 год)

Показатель	Срок гестации, сут		
	19-е-23-и	28-32-е	38-45-е
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	8,5 \pm 0,50/9,6 \pm 0,44	9,0 \pm 0,28/10,0 \pm 0,62	8,5 \pm 0,34/10,0 \pm 0,46*
Нейтрофилы, %	28,6 \pm 1,8/32,6 \pm 2,1	30,8 \pm 2,1/27,8 \pm 1,4	29,3 \pm 1,7/35,0 \pm 2,9
Моноциты, %	2,7 \pm 0,2/4,8 \pm 0,2***	2,4 \pm 0,2/3,3 \pm 0,1**	2,9 \pm 0,2/3,3 \pm 0,2
Эозинофилы, %	5,2 \pm 0,3/10,6 \pm 0,9***	6,4 \pm 0,3/14,0 \pm 1,2***	5,6 \pm 0,3/13,3 \pm 1,1***
Лимфоциты, %	63,2 \pm 2,1/52,0 \pm 3,5	60,4 \pm 2,3/54,9 \pm 3,4	62,1 \pm 2,8/48,4 \pm 2,6**
ФАЛ, %	68,8 \pm 2,9/38,8 \pm 4,3	69,4 \pm 2,9/63,9 \pm 4,3	76,1 \pm 2,6/69,7 \pm 3,7
Иммуноглобулины, г/л	29,3 \pm 0,7/21,8 \pm 1,1***	28,6 \pm 0,8/20,8 \pm 0,9***	27,0 \pm 0,7/20,4 \pm 1,4***
ЦИК, г/л	0,23 \pm 0,02/0,68 \pm 0,06***	0,29 \pm 0,02/0,61 \pm 0,02***	0,30 \pm 0,02/0,57 \pm 0,04***
БАСК, %	82,2 \pm 1,9/61,4 \pm 5,3***	73,6 \pm 2,8/52,7 \pm 3,8***	79,0 \pm 2,9/57,5 \pm 3,2***
ЛАСК, мкг/мл	0,48 \pm 0,03/0,29 \pm 0,02***	0,40 \pm 0,03/0,28 \pm 0,02**	0,45 \pm 0,03/0,26 \pm 0,02***

Примечание. Перед и после косой — соответственно физиологическое формирование и гибель эмбриона. ФАЛ — фагоцитарная активность лейкоцитов, ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы, БАСК — бактерицидная активность сыворотки крови, ЛАСК — лизоцимная активность сыворотки крови.

* **, *** Соответственно $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ относительно контроля (физиологическое формирование эмбриона).

Концентрация ЦИК в крови находилась в обратной зависимости от фагоцитарной активности лейкоцитов, которая при гибели эмбриона была на 14,5 % ниже, чем у животных с его нормальным формированием. Высокое содержание ЦИК с пониженной активностью полинуклеарных лейкоцитов свидетельствовало как о перегруженности фагоцитарной системы, так и о повышенной миграции из костного мозга функционально незрелых форм нейтрофилов под воздействием интерлейкина-1, количество которого увеличивается во время беременности (18). У коров с проявлением эмбриональной смертности относительное количество лимфоцитов в крови было ниже контроля соответственно на 14,5 %, содержание общих иммуноглобулинов — на 25,6 %. Последнее может быть связано как с угнетением их синтеза, так и с увеличением образования и утилизации ЦИК.

У животных с нарушением эмбрионального развития дезадаптация к стрессу, вызванному формированием беременности, сочеталась со снижением показателей гуморальных факторов естественной резистентности. Бактерицидная активность сыворотки крови была меньше, чем в контроле, на 25,3 %, лизоцимная — на 39,6 %, что коррелировало с угнетением фагоцитарной реакции лейкоцитов.

На 28-32-е сут беременности выявленные ранее различия в показателях клеточного и гуморального иммунитета у коров из разных групп в целом сохранялись. При гибели эмбриона (по сравнению с нормальной гестацией) отмечалось увеличение количества лейкоцитов в крови на 11,1 %, процентного содержания моноцитов — на 37,5 %, эозинофилов — на 218,7 %, ЦИК — на 210,0 %, происходило снижение ФАЛ (фагоцитарная активность лейкоцитов) на 7,9 %, количества лимфоцитов — на 9,1%,

БАСК — на 28,4 %, ЛАСК — на 30,0 %. Аналогичные данные были получены и на 38-45-е сут. Обнаруженные изменения в иммунном статусе коров-матерей отражают сильно выраженную реакцию организма на воздействие эндотоксинов и антигенов зародыша, свидетельствуют об иммуннодефиците и пониженных адаптационных возможностях животных на ранних этапах гестации.

Известно, что существенную роль в обеспечении гомеостаза половых органов, их колонизационной резистентности и противоинфекционной защиты репродуктивного тракта играет микробиоценоз влагалища (39-41). Основные представители его нормофлоры — лакто- и бифидобактерии, выступающие в качестве антагонистов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, подавляя их рост и размножение. Защитный эффект лактобактерий и бифидобактерий связан с секрецией значительного количества молочной и других органических кислот, различных бактериоцинов, витаминов и иных биологически активных веществ, а также прямым стимулирующим влиянием на систему иммунокомпетентных структур репродуктивного тракта, местную и общую иммунологическую реактивность организма. Устойчивость микробиоценоза влагалища обеспечивается скоординированным взаимодействием эндокринной и иммунной систем. Нарушение функции любой из них приводит к дисбиозу, что проявляется замещением представителей нормальной микрофлоры условно-патогенными и патогенными микроорганизмами.

При физиологическом течении эмбриогенеза общая микробная обсемененность слизи влагалища была достаточно стабильной и колебалась от $509,7 \pm 24,3$ до $573,2 \pm 48,4$ КОЕ/мл.

Наличие лактобактерий регистрировали у 66,6-83,3 % животных при титре от $10^{-4,08}$ до $10^{-3,38}$. Бифидобактерии, входящие в состав нормофлоры и обладающие высокой колонизационной антагонистической и адгезивной активностью, при нормальном формировании зародыша были выявлены у 100 % животных. При смерти эмбриона бифидобактерии в слизи влагалища на 28-45-е сут гестации обнаруживали только у 50-75 % коров, причем титр бифидобактерий в эти сроки оказался в 2,22-2,95 раза ниже, чем у здоровых животных.

Снижение колонизации половых органов нормофлорой сопровождалось увеличением представленности в слизи влагалища энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*) и грибов. Частота выявления первых возросла с 10,0-16,6 % до 33,3-70,0 %, вторых — в 1,4-2,0 раза. Было установлено, что при этом величина pH влагалищной слизи повышалась с $7,38 \pm 0,16$ - $7,62 \pm 0,07$ до $8,25 \pm 0,15$ - $8,63 \pm 0,18$.

Таким образом, в полифакторной этиологии ранней гибели эмбриона у лактирующих коров патофизиологическими детерминантами выступают дефицит и дисбаланс эссенциальных минеральных элементов, а также оксидативный стресс и эндогенная интоксикация, которые развиваются на этом фоне, что приводит к эндокринной и иммунной недостаточности и сопровождается нарушением иммунных и трофических взаимоотношений в системе мать—зародыш. Коррекция дисэлементозов, антиоксидантного, эндокринного и иммунного статуса коров-матерей должны составлять основу разработки средств и методов профилактики эмбриональной смертности и решения проблемы фертильности в высокопродуктивном молочном скотоводстве.

394087 Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б,
e-mail: vnivipat@mail.ru;

²ФГБОУ ВО Воронежский государственный
аграрный университет им. императора Петра I,

394087 Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-а,
e-mail: llozovaja@yandex.ru;

³ФГБУН Институт геохимии и аналитической химии
им. В.И. Вернадского РАН,

119991 Россия, г. Москва, ул. Косыгина, 19,
e-mail: safrus2003@mail.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 2, pp. 338-348

PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF EMBRYONIC MORTALITY IN DAIRY COWS

A.G. Nezhdanov¹, V.I. Mikhalev¹, E.G. Lozovaya², K.A. Lobodin², V.A. Safonov³

¹All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Federal Agency of Scientific Organizations, 114b, ul. Lomonosova, Voronezh, 394087 Russia, e-mail vnivipat@mail.ru;

²Emperor Peter the Great Voronezh State Agricultural University, 114a, ul. Lomonosova, Voronezh, 394087 Russia, e-mail llozovaja@yandex.ru (corresponding author);

³V.I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Federal Agency of Scientific Organizations, 19, Kosygina, Moscow, 119991 Russia, e-mail safrus2003@mail.ru

The authors declare no conflict of interests

Received December 30, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2017.2.338eng

Abstract

Early embryonic mortality and its high frequency in lactating cows are among the causes for a decrease of animal performance, reproduction, and the effectiveness of modern dairy cattle industry as a whole. The aim of this research was to reveal pathogenic significance of maternal endocrine, metabolic and immune risk factors for occurrence of this pathology. The surveys involved black-motley cows with average annual productivity of 6.4-7.6 ths. kg. Pregnancy and embryonic mortality were diagnosed on days 19 to 23, 28 to 32, and 38 to 45 after artificial insemination by transrectal ultrasound examination with the use of an ultrasonic scanner Easi-Scan-3 (Great Britain). Venous blood samples were collected during the same periods. Blood progesterone, estradiol-17 β , testosterone, proteins, common immunoglobulins, circulating immune complexes, urea, creatinine, cholesterol, glucose, vitamins E and C, total calcium, inorganic phosphorus, protein-bound iodine, magnesium, zinc, copper, manganese, selenium, middle molecular peptides, malonic dialdehyde, alkaline phosphatase activity, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, catalase, bactericidal and lysozyme activity of blood serum, morphological blood composition were assessed with the use of a biochemical analyzer Hitachi-902 (Japan), a spectrophotometer UV 1700 (Japan), an atomic adsorptive spectrometer Perkin Elmer-703 (USA), a hematology analyzer ABX Micros60 (France), and spectrum analyzer Uniplan (Russia). The blood parameters were tested in 18 animals, 9 ones with physiological embryo formation (control) and 9 ones with embryo death. It was found out that embryonic death is firstly associated with an endocrine insufficiency of sex glands of the mother cows, as reflected by blood progesterone and estradiol-17 β level which at various stages of gestation was lower by 12.0-43.3 % and 45.0-85.5 %, respectively, when compared to the animals of control group. Under embryonic death, the mother cows' metabolic profile was characterized by an increase in blood concentration of protein (by 3.2-5.4 %), urea (by 9.8-23.6 %), creatinine (by 10.1-13.5 %), cholesterol (by 10.9-17.1 %), middle molecular peptides (by 6.1-34.7 %). Blood alkaline phosphatase activity was higher by 12.8-36.2 %, alanine aminotransferase — by 3.6-13.2 %, aspartate aminotransferase — by 13.8-30.8 %, gamma-glutamyltransferase — by 45.4-77.5 %, and endogenous intoxication index increased by 13.0-40.0 % that was a reflection of liver and kidney insufficiency, cholestasis syndrome manifestation and endogenous intoxication. The pathology was related to the deficiency of essential bioelements, increased lipid peroxidation (LPO), decreased function of antioxidant protection (AOP) system, accumulation of LPO toxic products and oxidative stress development. Under embryo death, blood zinc concentration was 9.7-27.2 % less, copper concentration — 17.6-23.3 % less, manganese — 10.8-15.2 % less, selenium — 16.3-29.1 % less, protein-bound iodine amount — 7.3-33.4 % less, magnesium — 9.7-27.4 % less, glutathione peroxidase activity — 25.8-31.2 % lower, catalase — 26.5-51.2 % lower, vitamin E — 26.3-31.6 % lower, and vitamin C — 25.1-57.1 % lower, as compared to the control animals. The changes in immune status of mother cows with embryonic mortality manifested themselves by an increase in the number of blood leukocytes, their neutrophilic and eosinophilic forms, monocytes, by a decrease in phagocytic activity, the number of lymphocytes, immunoglobulins, bactericidal activity and lysozyme activity in blood serum, and also by vaginal dysbiosis. The conclusion is that diselementosis, oxidative stress and endogenous intoxication, endocrine and immune insufficiency are determinant pathophysiological fac-

tors in multiple-factor etiology of early embryonic mortality.

Keywords: cows, embryonic mortality, diselementosis, oxidative stress, endogenous intoxication, endocrine and immune insufficiency.

REFERENCES

1. Milovanov V.K., Sokolovskaya I.I. V knige: *Teoriya i praktika vosproizvedeniya zhivotnykh* [In: Theoretical and practical aspects of animal reproduction]. Moscow, 1984: 47-68 (in Russ.).
2. Humblot P., Camons S., Martal J., Charlery J., Jeanguyot N., Thibier M., Sasser R.G. Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Fertil.*, 1988, 83: 215-223 (doi: 10.1530/jrf.0.0830215).
3. Romano J.E., Tompson J.A., Kraemer D.C., Westhusin M.E., Forrest D.W., Tomaszewski M.A. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology*, 2007, 67: 486-493 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.08.011).
4. Chaudhary A.K., Purohit G.N. Ultrasonographic detection of early pregnancy loss in dairy cows. *J. Anim. Sci. Adv.*, 2012, 2(8): 706-710.
5. Dyul'ger G.P. *Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh*, 2012, 11: 30-35 (in Russ.).
6. Yanchukov I., Panferov V., Moroz T. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo*, 2011, 8: 2-4 (in Russ.).
7. Chomaev A., Mityashova O. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2013, 9: 41-42. Available <http://www.zzr.ru/?q=node/3274>. No date (in Russ.).
8. Belik S.V. *Razrabotka sposobov povysheniya oplodotvoryaemosti korov v usloviyakh molochnykh kompleksov. Avtoreferat kandidatskoj dissertatsii* [Ways to increase fertility in cows on dairy farms. PhD Thesis]. Saratov, 2016 (in Russ.).
9. Butler W.R. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81: 2533-2539 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)70146-8).
10. Yaniz J., Lopez-Gatius F., Bech-Sabat G., Garcia-Jspuerto J., Serrano B., Santolaria P. Relationships between milk production, ovarian function and fertility in high producing dairy herds in north-eastern Spain. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008, 43: 38-43 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01227.x).
11. Seifi H.A., Mohri M., Farzaneh N., Nemati H., Nejhad S.V. Effect of anionic salts supplementation on blood pH and mineral, energy metabolism, reproduction and production in transition dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, 2010, 89: 72-79 (doi: 10.1016/j.rvsc.2010.01.013).
12. Crowe M.A., Williams E.J. Triennial lactation symposium: effects of stress on postpartum reproduction in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 2012, 90: 1722-1727 (doi: 10.2527/jas.2011-4674).
13. Nezhdanov A.G., Mikhalev V.I., Lozovaya E.G., Dyul'ger G.P. *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii*, 2014, 3: 120-124 (in Russ.).
14. Retskii M.I., Shakhov A.G., Shushlebin V.I., Samotin A.M., Misailov V.D., Chusova G.G., Zolotarev A.I., Degtyarev D.V., Ermolova T.G., Chudnenko O.V., Bliznetsova G.N., Savina E.A., Dolgopolo V.N., Belyaev V.I., Meshcheryakov N.P., Filatov N.V., Samokhin V.T., Dzhamaludinova I.N., Mamaev N.Kh., Donnik I.M., Tatarchuk A.T., Malygina A.A., Leont'ev L.B., Ivanov G.I., Grigor'eva T.E., Argunov M.N., Kuznetsov N.I., Fedjuk V.I., Derezhina T.N., Ovcharov V.V., Kalyuzhnyi I.I., Ryzhkova G.F., Shkuratova I.A., Artem'eva S.S., Kaverin N.N. *Metodicheskie rekomendatsii po diagnostike, terapii i profilaktike narushenii obmena veshchestv u produktivnykh zhivotnykh* [Recommendations on diagnostics, therapy and prevention of metabolic disorders in productive animals]. Voronezh, 2005 (in Russ.).
15. Shakhov A.G., Mas'yanov Yu.V., Retskii M.I., Brigadirov Yu.N., Anufriev A.I., Biryukov M.V., Pershina S.I., Kardashov A.M., Petrova M.G., Batishcheva E.A., Belyaev V.I., Zolotarev A.I., Bliznetsova G.N., Buzlama V.S., Suleimanov S.M., Fedorov YU.N., Borzenko E.V., Khanis A.Yu., Borzenko T.V., Artemov B.T., Efanova L.I., Manzhurina O.A., Panin A.N., Makarov Yu.A., Donnik I.M., Tatarchuk A.T., Balakirev N.A., Maiorov A.I., Emel'yanenko P.A., Kirillov A.K., Maiorov M.A., Goryachev A.A., Evdokimov V.V., Voronin E.S., Sisyagin P.N., Isaev V.V., Redzhepova G.R., Gorbunov A.P., Boyarintsev L.E., Klimenko V.V., Kaverin N.N., Artem'eva S.S., Topuriya G.M., Topuriya L.Yu., Zhukov A.P., Kalyuzhnyi I.I., Mamaev N.Kh., Dzhamaludshova I.N. *Metodicheskie rekomendatsii po otsenke immunnogo statusa zhivotnykh* [Recommendations for assessing the immune status of animals]. Voronezh, 2005 (in Russ.).
16. Dobrokhotova Yu.E., Gonkovskaya L.V., Bakhereva I.V., Svitich O.A.,

- Malushenko S.V. *Akusherstvo i ginekologiya*, 2016, 7: 5-8 (doi: 10.18565/aig.2016.7.5-10) (in Russ.).
17. Nesyayeva E.V. *Akusherstvo i ginekologiya*, 2005, 2: 3-7 (in Russ.).
 18. Shirshhev S.V. *Mekhanizmy immunoendokrinnogo kontrolya protsessov reproduksii. Tom 1* [Mechanisms of immunoendocrine control of reproduction. V. 1]. Ekaterinburg, 2002 (in Russ.).
 19. Miyamoto A., Shirasuna K., Shimizu T., Matsui M. Impact of angiogenic and innate immune systems on the corpus luteum function during its formation and maintenance in ruminants. *Reprod. Biol.*, 2013, 13(4): 272-278 (doi: 10.1016/j.repbio.2013.09.006).
 20. Wiltbank M.C., Souza A.H., Carvalho P.D., Cunha A.P., Giordano J.O., Fricke P.M., Baes G.M., Diskin M.G. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal*, 2014, 8(1): 78-81 (doi: 10.1017/S1751731114000585).
 21. Beletskaya E.N., Onul N.M. *Mikroelementy v meditsine*, 2014, 15(2): 22-28 (in Russ.).
 22. Skal'nyi A.V., Zalavina S.V., Efimov S.V. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2006, 2: 78-81 (in Russ.).
 23. Fav'e M., Khinindzher-Fav'e I. *Mikroelementy v meditsine*, 2002, 3(4): 2-6 (in Russ.).
 24. Neve J. Clinical implications of trace elements in endocrinology. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1992, 32: 173-185 (doi: 10.1007/BF02784602).
 25. Chen Y.H., Zhao M., Chen X., Zhang Y., Wang H., Huang Y.Y., Wang Z., Zhang Z.H., Zhang C., Xu D.X. Zinc supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced fetal growth restriction and demise through its anti-inflammatory effect. *J. Immunol.*, 2015, 30: 454-463 (doi: 10.4049/jimmunol.1103579).
 26. Moiseenok A.G., Pityuk E.V., Moiseenok E.A. V sbornike: *Pitanie i obmen veshchestv* [In: Nutrition and metabolism]. Grodno, 2002: 70-98 (in Russ.).
 27. Arthur J.R., Bermano G., Mitchell J.H., Hesketh J.E. Regulation of selenoprotein gene expression and thyroid hormone metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24: 384-388 (doi: 10.1042/bst0240384).
 28. Berry M.J., Banu L., Larsen P.R. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*, 1991, 349: 438-440 (doi: 10.1038/349438a0).
 29. Kamada H., Hodate K. Effect of dietary selenium supplementation on the plasma progesterone concentration in cows. *J. Vet. Med. Sci.*, 1998, 60(1): 133-135.
 30. Samokhin V.T. *Profilaktika narushenii mikroelementov u zhivotnykh* [Prevention of microelement metabolism disorders in animals]. Voronezh, 2003 (in Russ.).
 31. Ufer C., Wang C.C. The roles glutathione peroxidases during embryo development. *Front. Mol. Neurosci.*, 2011, 4: 12 (doi: 10.3389/fnmol.2011.00012).
 32. Schefers J. Fetal and perinatal mortalities associated with manganese deficiency. *Proc. Minnesota Dairy Health Conference*. St. Paul, Minnesota, USA, 2011: 70-74.
 33. Hostetler C., Kincaid R., Miranda M. The role essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *Vet. J.*, 2003, 166(2): 125-139 (doi: 10.1016/S1090-0233(02)00310-6).
 34. Skal'nyi A.V. *Khimicheskie elementy v fiziologii i ekologii cheloveka* [Chemical elements in human physiology and ecology]. Moscow, 2004 (in Russ.).
 35. Tsallagova E.V. *Farmateka*, 2013, 20: 84-87 (in Russ.).
 36. Sales J.N.S., Pereira R.V.V., Bicalho R.C., Baruselli P.S. Effect of injectable copper, selenium, zinc and manganese on the pregnancy rate of crossbred heifers (*Bos indicus* × *Bos taurus*) synchronized for timed embryo transfer. *Livestock Sci.*, 2011, 142: 59-62.
 37. Mundell L.R., Jaeger J.R., Waggoner J.W., Stevenson J.S., Grieger D.M., Pacheco L.A., Bolte J.W., Aubel N.A., Eckerle G.J., Macek M.J., Ensley S.M., Havenga L.J., Olson K.C. Effects of prepartum and postpartum bolus injections of trace minerals on performance of beef cows and calves grazing native range. *The Professional Animal Scientist*, 2012, 28: 82-88 (doi: 10.15232/S1080-7446(15)30318-1).
 38. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shikova E.B. *Okislitel'nyi stress: biokhimicheskii i patofiziologicheskie aspekty* [Oxidative stress: biochemical and pathophysiological aspects]. Moscow, 2001 (in Russ.).
 39. Kuznetsova I.V. *Akusherstvo i ginekologiya*, 2016, 3: 116-121 (doi: 10.18565/aig.2016.3.116-121) (in Russ.).
 40. Krasnozhenov E.P., Akhremenko Ya.A. *Kolonizatsionnaya rezistentnost' organizma cheloveka v norme i pri patologii* [Colonization resistance of the human body in normal and pathological conditions]. Kirov, 2013. Available <http://books.eee-science.ru/downloads/kolonizatsionnaya-rezistentnost-orga>. No date (in Russ.).
 41. Chernova N.I., Perlotutrov Yu.N. *Akusherstvo i ginekologiya*, 2013, 10: 104-108. Available <http://www.aig-journal.ru/ru/archive/article/12348>. No date (in Russ.).