

*На правах рукописи*

**Дубровская Анастасия Борисовна**

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОЙ  
ОЦЕНКИ РЕПРОДУКТИВНОГО СТАТУСА ПЛЕМЕННЫХ  
КОБЫЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ  
ПАРАМЕТРОВ ЭНДОМЕТРИЯ**

06.02.10- частная зоотехния, технология производства  
продуктов животноводства

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Дивово – 2022

Работа выполнена в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства»

Научный руководитель: доктор сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник  
**Лебедева Людмила Федоровна**

Официальные оппоненты:

**Иванов Реворий Васильевич,**

доктор сельскохозяйственных наук, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М. Г. Сафронова»

**Терёхина Анна Александровна,**

кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биологии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: **ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина».**

Защита состоится «31» мая 2022 года в 13:30 часов на заседании диссертационного совета Д 006.018.01 ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» по адресу: 391105, Рязанская область, Рыбновский район, пос. Дивово, п/о Институт коневодства

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» [http:// www. ruhorses.ru](http://www.ruhorses.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Зайцев А. М.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследований.** В отечественном племенном коневодстве одной из главных задач в новых экономических условиях является повышение уровня воспроизводства, основу которого составляют репродуктивные качества маточного поголовья. Это особенно важно, когда речь идет о племенных матках высокоценных заводских пород лошадей, дорогостоящее содержание которых оказывается нерентабельным, если кобыла ежегодно не приносит здорового жеребенка.

В современной практике размножения племенных лошадей заводских пород достигнуты определенные успехи, благодаря новым знаниям, развитию репродуктивных технологий и совершенствованию диагностических методов оценки воспроизводительных качеств кобыл. Разработаны способы оценки состояния половой системы маток, которые в комплексе позволяют определить их функциональный статус и выявить изменения в репродуктивных органах, снижающие показатели воспроизводства. Вместе с тем, в практике организации и проведения случных компаний в племенных хозяйствах страны встречаются высокоценные кобылы, у которых достоверно выявить причины нарушения функции воспроизводства известными методами ректальной, вагинальной, ультразвуковой диагностики, цитологическим и бактериологическим анализом не удастся. В таких случаях дополнительным, эффективным методом диагностики может служить гистологический анализ эндометрия кобыл. Этот метод занимает важное место в работе репродуктологов за рубежом, однако полностью отсутствует в практике отечественных специалистов. Анализ структурных изменений в эндометрии может указать на присутствие и степень деструктивных процессов в слизистой матки, что будет служить объяснением причин снижения плодовитости и основанием для прогноза дальнейшей репродуктивной карьеры кобылы.

В этой связи особую актуальность приобретает изучение возможностей использования гистоморфологического анализа эндометрия кобыл для уточнения оценки их репродуктивных качеств и разработка методики его применения в целях повышения уровня воспроизводства в отечественном племенном коневодстве.

**Степень научной разработанности проблемы.** Несмотря на некогда лидирующие позиции отечественных ученых в области размножения лошадей в начале и середине прошлого века (И. И. Иванов, 1910, К. И. Милованов, Х. И. Животков, 1938, 1960, А. Н. Буйко-Рогалевиц, 1960, Н. Н. Скаткин, Г. В. Паршутин, 1961, А. Ю. Тарасевич, 1924, Н. А. Флегматов, 1937, П. А. Волосков, 1936, 1939, М. А. Кедров, 1940, 1948, А. П. Студенцов, 1947, 1950, И. Т. Растяпин, 1936, Н. М. Рязанцева, 1936), вопросами комплексной репродуктивной оценки кобыл с привлечением различных диагностических методов впервые серьезно стали заниматься за рубежом (R. M. Kenney, 1975, D. Brook, 1985, O. J. Ginther, 1992, S. W. Ricketts, 1993, A. O. McKinnon, J. L. Voss, E. L. Squires, 1993; J. F. Pycock, 1996. D. R. Pascoe, 1996, E. M. Carnevale, 2000, M. M. LeBlanc, 2003, M. C. G. Davies Morel, 2003, S. P. Brinsko, 2011, J. Dascanio, 2014). Сегодня эта оценка (breeding soundness examination) включена в обязательный порядок подготовки кобылы к продаже, приему на случку, осеменение или трансплантацию эмбрионов, отбору в производящий состав, для определения причин и лечения субфертильности. Наряду с ректальной, вагинальной, ультразвуковой диагностикой, цитологическим и бактериологическим анализом, в нее входит также гистологическое исследование эндометрия. При необходимости комплексную экспертизу дополняют гистероскопией и гормональным анализом.

Возрастные изменения в слизистой матки кобыл расцениваются как наиболее существенная причина снижения плодовитости. За рубежом показаниями к биопсии эндометрия у кобыл служат: новообразования, заболевания, не поддающиеся стандартной терапии, субфертильность, стойкое бесплодие, привычный аборт, рождение нежизнеспособных и ослабленных жеребят. Изучением строения и функций эндометрия кобыл занимались многие зарубежные ученые – E. Seaborn 1925, P. A. Doig et al. (1981), R. M. Kenney 1975, S. W. Ricketts, 1975, A. Concha-Bermejillo, P.C. Kennedy 1982, D. Leishman, 1982; K. GÜVENÇ, 2007, D. H. Schlafer, 2007; C. C. Love, A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala, D. D. Varner (eds), 2011, T. Katila, 2016, J. Buczkowska, 2016, M. Herrera, 2018 и др.. Были выделены основные структурные элементы эндометриальной ткани – поверхностный и glandулярный эпителий, железы и сосуды эндометрия, строма. Особое внимание было уделено изменению клеточной структуры слизистой матки под

действием различных повреждающих факторов (родовых травм, гинекологических заболеваний, хронических инфекций и фиброзных процессов в эндометрии). В соответствии со степенью выраженности деструктивных процессов в матке, кобыл было предложено отнести к одной из трех категорий (R. M. Kenney, 1975), каждой из которых соответствовал прогностический уровень фертильности : I - 80%, II (a,b) -40-60%, III – менее 10%. Были описаны характерные признаки повреждения эндометрия (растяжение и гнездование желез, фиброз, лимфатические лакуны и др.). Для оценки степени тяжести нарушений в эндометрии были предложены морфометрические показатели – высота поверхностного и glandулярного эпителия, диаметр и плотность желез. Важным признаком, характеризующим тяжесть инфекционного поражения эндометрия, считается его инфильтрация нейтрофилами и лимфоцитами. Перечисленные показатели напрямую связаны с плодовитостью кобыл и, следовательно, с экономической стороной отрасли. Поэтому, чтобы избежать прохолостов и потерь жеребости, зарубежные коневладельцы предпочитают строить свой бизнес с учетом гистологических данных о состоянии матки и способности кобыл производить потомство.

В отечественной коневодческой практике предложена оценка репродуктивных качеств кобыл на основе пяти диагностических методов – ректального, вагинального, ультразвукового, цитологического и бактериологического (Л. Ф. Лебедева, 2017). Однако, несмотря на богатый зарубежный опыт, в нашей стране на сегодняшний день практика гистологической экспертизы эндометрия кобыл в племенном коневодстве полностью отсутствует. В отечественных научных источниках незаслуженно мало внимания уделяется информативной значимости этого метода исследования, тогда как слизистая матки играет определяющую роль в создании оптимальных условий для выживания спермы при осеменении и для нормального плодоношения. Поэтому включение гистологического метода в комплексную репродуктивную оценку кобыл в РФ, его развитие, прогностическая ценность и поиск новых маркеров нормы и патологии в структуре эндометрия является актуальной и насущной задачей.

Результаты, представленные в работе, были получены в рамках выполнения задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации ГЗ № АААА-А18-118051590082-4.

**Цели и задачи исследования.** Цель работы состоит в повышении эффективности воспроизводства в отечественном племенном коневодстве на основе введения гистологического анализа эндометрия в систему комплексной оценки репродуктивных качеств кобыл.

Для достижения поставленной цели были намечены следующие задачи:

1. Проанализировать уровень плодовитости племенных кобыл в конных заводах РФ.

2. Сравнить показатели воспроизводства племенных кобыл по возрастным периодам.

3. Изучить структуру эндометрия в связи с фазой полового цикла, возрастом, гормональным фоном и фертильностью кобыл.

4. Определить наиболее информативные показатели и методы выявления основных видов эндометриальных изменений.

5. Разработать цифровой показатель, характеризующий функциональную активность эндометрия, для оценки и прогноза воспроизводительных качеств кобыл.

6. Проанализировать информативность и значимость различных методов исследования в системе комплексной оценки воспроизводительных качеств кобыл.

**Научная новизна.** Впервые показана подробная сравнительная морфометрическая характеристика эндометрия кобыл в различные фазы полового цикла на фоне уровня основных гормонов, участвующих в эндокринной регуляции репродуктивной функции. Уточнены и выделены главные отличительные признаки нормального строения слизистой матки у гинекологически здоровых кобыл, а также нарушений, связанных со снижением фертильности. Впервые проведена сравнительная характеристика использования различных методов дифференциального окрашивания гистосрезов при выявлении основных видов деструктивных изменений в эндометрии и степени тяжести процесса. Впервые разработана система оценки функционального состояния эндометрия кобыл с помощью цифрового показателя на основе морфометрических параметров.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Комплексная оценка воспроизводительных качеств кобыл является основой для оптимизации технологии репродуктивного процесса в племенном коневодстве, как ключевого звена эффективной селекционно-племенной работы в отрасли с биологически малым коэффициентом размножения животных. Полученные данные существенно расширяют возможности и повышают эффективность диагностической базы при исследовании репродуктивной системы кобыл и могут быть предложены в качестве основных критериев отбора кобыл для использования в воспроизводстве.

Полученные новые научные данные позволяют выявить более глубокие причины субфертильности и бесплодия маток и на этой основе прогнозировать целесообразность дальнейшего использования кобылы в воспроизводстве. Определены основные критерии и характерные признаки наиболее часто встречаемых изменений в структуре эндометрия по гистологическим характеристикам эндометриальных желез и сосудов. Предложен новый подход к оценке функционального состояния эндометрия на основе вычисления эндометриального показателя с использованием морфометрических параметров.

Результаты работы представляют теоретическую значимость для углубления исследований функции эндометрия кобыл с учетом влияния различных факторов на его структуру в цикле воспроизводства, развивают классические положения о гормональной регуляции репродуктивной системы маток и являются приоритетными в разработке цифровых технологий оптимизации деятельности функциональных систем организма сельскохозяйственных животных. Полученные результаты исследований и методические приемы, использованные в работе, могут быть включены в программы обучения студентов профильных ВУЗов и для научно-исследовательской работы.

**Методология и методы исследования.** В качестве методологической основы исследований были использованы научные работы ведущих отечественных и зарубежных ученых и специалистов в области репродукции лошадей, а также общенаучные методы: сравнительный анализ, синтез, обобщение теоретических и экспериментальных данных. Для решения поставленных задач применялись зоотехнические, биологические математические методы с использованием современного

оборудования, инструментов и компьютерных программ (Microsoft Excel 2010, Statistica 10). Для оценки достоверности полученных данных использовали t-критерий Стьюдента и критерий Фишера, факторный анализ по методу главных компонент.

**Положения, выносимые на защиту:**

- Динамика показателей воспроизводства кобыл по возрастным периодам в российских конных заводах.

- Характеристика нормальной структуры эндометрия в различные фазы полового цикла и ее изменения в связи с возрастом кобыл.

- Основные виды деструктивных изменений в эндометрии и наиболее информативные способы их выявления гистологическим методом.

- Связь морфометрических параметров эндометрия с возрастом и фертильностью кобыл.

- Оценка состояния эндометрия кобыл на основе вычисления эндометриального показателя с использованием морфометрических параметров для прогноза плодовитости кобыл.

- Значимость морфометрического анализа эндометрия в системе оценки воспроизводительных качеств кобыл.

**Степень достоверности и апробация результатов исследования.** Полученные результаты были обработаны методами статистического и вариационного анализов с оценкой степени достоверности по критериям Стьюдента и Фишера. Цель и задачи, поставленные в диссертационной работе, выполнены в полном объеме. Результаты научных исследований по теме диссертационной работы доложены на международных научно-практических конференциях: «Современные достижения и актуальные проблемы в коневодстве» (ФГБНУ «ВНИИконеводства», РФ, 2019), «Проблемы и перспективы развития животноводства» (г. Витебск, Беларусь 2018), на научно-практической конференции «Достижения молодых ученых-зоотехнической науке и практике» (Дивово, ФГБНУ «ВНИИконеводства» 2018), представлены на XXXIII Всероссийской агропромышленной выставке «Золотая Осень – 2021» (бронзовая медаль).

**Публикации результатов исследований.** По результатам исследований опубликовано девять научных статей, в том числе шесть из них в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства

образования и науки РФ, одна на платформе Scopus и две в сборниках докладов научно-практических конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, предложений производству и списка использованной при написании диссертации литературы, включающего 280 источников, в том числе 147 на иностранных языках, содержит 152 страницы компьютерного текста, 36 рисунков, 12 таблиц.

## **2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **2.1 Материал и методы исследований**

Материалом для исследований послужили данные базы ИПС «Кони-3» (ВНИИ коневодства), эхограммы УЗИ матки и яичников кобыл, образцы цервикальной и эндометриальной слизи и маточных мазков/смывов для цитологического и бактериологического исследования, а также пробы биоптата эндометрия, полученные от кобыл в период эструса и диэструса. Показатели воспроизводства высчитывали на основании данных о числе кобыл в случке (плодовых лет), зажеребевших и благополучно ожеребившихся кобыл, аборт, слабо и мертворожденных жеребят. Экспериментальную работу проводили в течение 2018-2021 гг. на опытной конюшне ФГБНУ «ВНИИ коневодства», в ООО «Старожиловский конный завод», КСК «МариАрт» и в репродуктивном центре «Хартли Хорс Хаус». В исследованиях были задействованы 43 кобылы русской рысистой, буденновской, тракененской, русской верховой, голштинской, вестфальской и русской тяжеловозной пород в возрасте от 3 до 20 лет. Схема исследований представлена на рисунке 1. На основании результатов ректального, ультразвукового, вагинального, цитологического и бактериологического исследований кобыл относили к условно гинекологически здоровым, либо к кобылам с признаками функциональных нарушений работы полового тракта.

По возрасту кобыл разделили на две группы: 1) до 10 лет и 2) 10 лет и старше. УЗИ проводили с помощью ультразвуковых сканеров EXAGO (Франция) и Mindrey DP50 Vet (Китай).

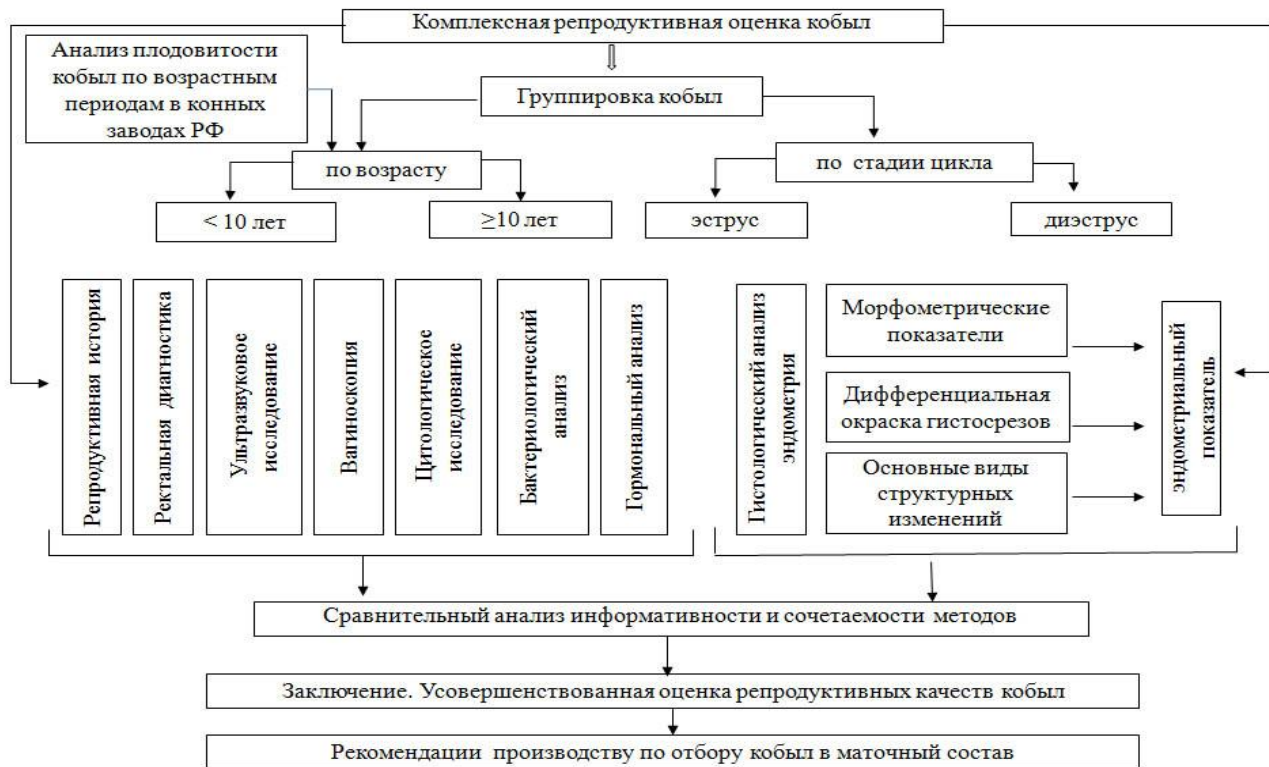


Рисунок 1 – Схема исследований

Цитологические образцы окрашивали красителем Май Грюнвальда, учитывали количество нормальных и с признаками дегенерации эпителиальных клеток, нейтрофильных лейкоцитов (PMN-клеток) и лимфоцитов в среднем по 6 полям зрения (ед.п.з.). Анализ микрофлоры в эндометриальной и цервикальной слизи делали в ГБУ РО «Рязанская областная ветеринарная лаборатория», ФГБУ «Тульская межобластная ветеринарная лаборатория». Биопсию проводили посредством биопсийных щипцов (Jackson Uterine Biopsy Forceps, США).

Пробы фиксировали в 10% формалине. Гистологические срезы толщиной 5-10 мкм готовили в патологоанатомической лаборатории при городской клинической больнице №11 (г. Рязань) по методике обезвоживания и заливки гистологического материала в парафин с применением изопропилового спирта. Для окраски гистосрезов использовали общую методику окрашивания гематоксилин – эозином и дополнительно – по Ван Гизону и по Массону с анилиновым синим. Для микроскопирования стекол с гистосрезами использовали бинокулярные микроскопы «Nicon. Eclipse 50i» диапазон увеличений: x100–1500. И «Optitech XSP -128-30» с диапазоном увеличений x40-1000. Оценивали 4 морфометрических показателя: высоту поверхностного и glandулярного эпителия, диаметр и плотность желез, отдельно в компактном (SC – Stratum Compactum) и губчатом (SS – Stratum Spongiosum) слоях эндометрия. Средние показатели подсчитывали по десяти полям зрения, для измерения использовали микрометрический окуляр WF10X DIN/18 мм. Учитывали также выраженность структурных изменений в эндометрии.

Статистическую обработку данных проводили методом биометрического анализа с помощью программ Microsoft Excel 2010, Statistica 10 («StatSoft, Inc.», США) с оценкой достоверности по t-критерию Стьюдента и критерию Фишера, факторного анализа по методу главных компонент, считая различия статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## **2. 2 Результаты исследований и их обсуждение**

### **2. 2. 1 Анализ плодовитости племенных кобыл в конных заводах РФ**

Анализ показателей воспроизводства кобыл в 4 конных заводах РФ орловского рысистого направления за период 1996-2020 гг.

(Таблица 1) выявил, что средние показатели в этих хозяйствах довольно ровные как по зажеребляемости кобыл, так и по числу полученных живых жеребят (благополучная выжеребка). В среднем они составили, соответственно, 76,8 и 74,4% и не имели достоверных различий между конными заводами.

Таблица 1- Показатели воспроизводства племенных кобыл

Конный завод (число кобыл)	Показатели воспроизводства кобыл				
	всего в случае (плодовых лет)	зажеребело	аборты, с/р, м/р*	благополуч. выжеребка	
Чесменский (145)	n	1711	1320	47	1273
	%	100	77,1±1,0	3,6±0,5	74,4±1,1
Алтайский (95)	n	562	432	12	420
	%	100	76,7±1,8	2,3±0,7	74,7±1,8
Орловский Фаворит (56)	n	182	137	3	134
	%	100	75,3±3,2	2,3±1,3	73,6±3,3
Новотомниково (55)	n	189	141	3	138
	%	100	74,6±3,2	2,1±1,2	73,0±3,2
<b>Всего</b> (351)	n	2644	2030	63	1967
	%	100	76,8±0,8	3,1±0,4	74,4±0,8

Примечание: с/р – слаборожденные, м/р – мертворожденные (от зажеребевших кобыл)

Однако при разделении кобыл на возрастные группы выяснилось, что у маток до 10 лет показатели воспроизводства, в среднем, выше, чем в последующий период плодовой деятельности (Таблица 2).

Таблица 2 – Плодовитость племенных кобыл в разном возрасте

Возраст кобыл	Число плодовых лет, n/%	Показатели воспроизводства кобыл			
		всего в случке	зажеребело	аборты, с/р, м/р*	благополуч. выжеребка
<b>&lt;10 лет,</b> в т.ч.:	n	1031	866	74	792
	%	100	84,0±1,14	8,5±0,94	76,8±1,32
≤ 5 лет	n	96	70	5	65
	%	100	72,9±4,48 <sup>a</sup>	7,1±3,03	67,7±4,77 <sup>c</sup>
6-9 лет	n	935	796	69	727
	%	100	85,1±1,17 <sup>b</sup>	8,7±0,99	77,8±1,36 <sup>d</sup>
<b>≥10 лет</b>	n	1118	919	83	836
	%	100	82,2±1,14	9,0±0,92	74,8±1,30

Примечание <sup>a,b</sup> p<0,01, <sup>c,d</sup> p<0,05, с/р – слаборожденные, м/р – мертворожденные (от зажеребевших кобыл)

Кроме того, молодые (как правило, пришедшие с ипподромных испытаний) кобылы в первые 1-2 года имеют достоверно более низкий процент зажеребляемости и выхода жеребят, чем кобылы в более старшем возрасте ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ , соответственно), что подтверждает более ранние наблюдения специалистов (Е. Б. Дубровская, 1984; В. В. Калашников, Е. Л. Фомина, 1999).

Учитывая, что часть кобыл в конных заводах поступает в воспроизводство позже 5 лет, проходя испытания на ипподромах, либо продается или выранжируется из племенного состава, не достигая 10-летнего возраста, мы выбрали только тех кобыл, которые непрерывно использовались в 4 исследуемых хозяйствах более 10 лет, начиная с 3-4-летнего возраста (Рисунок 2).

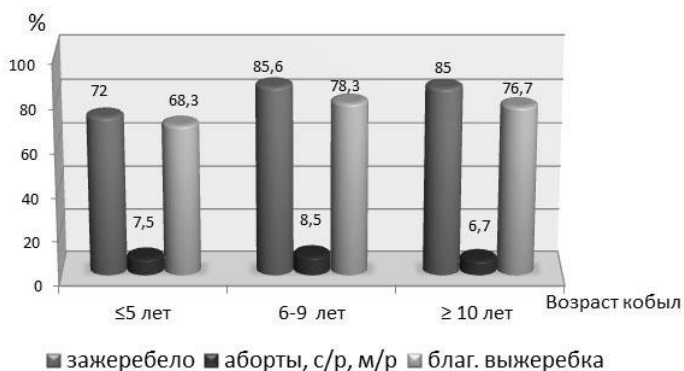


Рисунок 2 – Показатели воспроизводства кобыл, продуцирующих в хозяйствах более 10 лет, по возрастным периодам

Анализ данных показал схожую динамику, но с менее заметным снижением плодовитости маток-долгожительниц после 10 лет. Вероятно, причина в том, что в двух конных заводах из четырех в маточном составе не оказалось кобыл старше 12 лет, в одном – старше 15, и лишь в Чесменском заводе кобылы продуцировали до 20 лет и старше. Поэтому именно в данном хозяйстве более заметно снижение показателей после 10-летнего возраста (Таблица 3). И даже несмотря на высокую зажеребляемость у старых (16-20 лет) маток (85,9%), живых жеребят от них получено меньше, чем в двух предыдущих возрастных группах (79,6 и 78,0%, соответственно), вследствие повышения уровня потерь во время жеребости и выжеребки (9,1% против 7,5-8,3%, соответственно).

Таким образом, по нашим данным, наиболее продуктивным периодом использования является возраст с 6 до 9 лет, после чего

показатели воспроизводства начинают снижаться. Однако нами замечено, что высокие показатели воспроизводства у кобыл сохраняются, по крайней мере, до 12-13-летнего возраста.

Таблица 3 – Плодовитость кобыл-долгожительниц маточного состава (n=79) Чесменского конного завода по возрастным периодам

Показатели воспроизводства	Возраст кобыл							
	≤5 лет		6-9 лет		10-15 лет		16-20лет	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Кобыл в случке (плодовых лет)	46	100	266	100	410	100	269	100
Зажеребело	35	76,1±6,3	230	86,5±2,1	345	84,1±1,8	231	85,9±2,1
Аборты, с/р, м/р	3	8,6±4,7	19	8,3±1,8	26	7,5±1,4	21	9,1±1,9
Благ. выжеребка	32	69,6±6,8	211	79,3±2,5	320	78,0±2,0	200	74,3±2,7

Кроме того, специалистам хорошо известно, что в маточном составе остаются до старости лишь кобылы, исправно приносящие жеребят. Субфертильных кобыл, как правило, продают или выбраковывают, а с ценными матками работают более тщательно и результативно, затрачивая на них больше внимания, сил и средств. Вероятно, по этой причине тенденция снижения средних показателей воспроизводства у кобыл после 10 лет в наших исследованиях не подтвердилась достоверно.

### **2. 2. 2 Сравнительная характеристика эндометрия у молодых и возрастных кобыл в эструсе и диэструсе на основе морфометрических параметров**

Были проанализированы гистосрезы образцов эндометрия от молодых (n=8) и возрастных (n=13) кобыл в эструсе и диэструсе, в том числе у 14 кобыл - в одном половом цикле. Подробно описаны признаки, характерные для каждой фазы цикла. В норме отмечено разрыхление стромы и рассредоточение желез в эструсе, повышение плотности желез, многорядность ядер и вакуолизация цитоплазмы в клетках в диэструсе. У кобыл старшего возраста, имеющих проблемы с зажеребляемостью и вынашиванием плода, на гистосрезе стромы имела дольчатую структуру, железистый рисунок был более скудным в обеих фазах цикла, присутствовали растянутые железы, часто окруженные одним или несколькими слоями фиброзных волокон.

Гистоморфометрические показатели (высота поверхностного и glandулярного эпителия, диаметр и плотность желез), полученные при исследовании гистосрезов, выявили существенные и

достоверные различия в 2 возрастных группах кобыл по фазам цикла (Таблица 4).

Таблица 4 - Гистоморфометрические показатели в компактном (SC) и губчатом (SS) слоях эндометрия у молодых и возрастных кобыл в эструсе и диэструсе

Возраст кобыл, лет	Высота поверхн. эпителия, мкм	Высота glandулярного эпителия, мкм		Диаметр желез, мкм		Плотность желез, ед.п.з.	
		SC	SS	SC	SS	SC	SS
<b>Эструс (n=17)</b>							
<10	12,2±0,2	12,7±0,73	12,1±0,9	18,9±2,8	21,7±2,4 <sup>1</sup>	15,2±0,0 <sup>3</sup>	10,0±0,7 <sup>9</sup>
≥10	16,2±1,0	14,3±0,8	16,4±1,8	30,9±4,6	54,0±8,3 <sup>2</sup>	11,3±1,5 <sup>4</sup>	10,7±0,8
<b>Диэструс (n=21)</b>							
<10	16,1±1,8	14,4±0,4	14,4±0,8	22,7±3,9	20,9±2,1 <sup>5</sup>	16,1±2,2	16,9±1,1 <sup>7</sup>
≥10	15,0±1,08	15,5±0,9	16,2±1,1	36,4±4,8	61,3±7,4 <sup>6</sup>	10,7±0,9	10,9±0,9 <sup>8</sup>

Примечание: <sup>1,2</sup>p<0,001; <sup>3,4</sup>p<0,05; <sup>5,6</sup>p<0,001; <sup>7,8</sup>p<0,001; <sup>7,9</sup>p<0,001

У молодых кобыл в эструсе, по сравнению с диэструсом, снижается высота поверхностного (16,1-12,2 мкм) и glandулярного эпителия в компактном (14,4-12,7 мкм) и в губчатом (14,4-12,1 мкм) слоях, что свидетельствует о секреторной функции эпителия. У кобыл старшего возраста эти изменения менее выражены.

У возрастных и молодых кобыл в одинаковых фазах полового цикла диаметр и плотность желез в разных слоях эндометрия заметно различались. При этом более существенные различия наблюдались в губчатом (SS) слое эндометрия. У кобыл старшего возраста диаметр желез эндометрия как в эструсе, так и в диэструсе был в два-три раза больше (54,0-61,3 мкм), чем у молодых кобыл (21,7-20,9 мкм) (p<0,001). Плотность желез в диэструсе у молодых кобыл достоверно увеличивалась с 10,0 до 16,9 ед.п.з. в губчатом слое (p<0,001), тогда как у возрастных кобыл эта разница нивелировалась (10,7-10,9 мкм), что говорит о снижении эластичности эндометриальной ткани и клиренса матки. Двойная биопсия в одном половом цикле не оказала негативного влияния на фертильность кобыл.

### **2. 2. 3 Определение различных деструктивных изменений в эндометрии с помощью трех методов окрашивания гистосрезов**

Всего было исследовано 98 гистосрезов, собрана коллекция из 892 фотоснимков. В группе кобыл старше 10 лет был выявлен и систематизирован ряд структурных изменений в эндометрии (присутствие воспалительных (PMN) клеток в поверхностном слое,

утолщение стенок сосудов, перигландулярный (ПГФ) и периваскулярный (ПВФ) фиброз, гнездование и растяжение желез, лимфатические лакуны, железисто-фиброзный полип).

Были проанализированы результаты дифференциального окрашивания гистосрезов (n=98) тремя красителями (гематоксилин и эозин, по Ван Гизону и по Массону с анилиновым синим) с целью выявления различных эндометриальных нарушений.

Установлено, что стандартная окраска гистологических срезов гематоксилином и эозином применима для морфометрической оценки и определения основных структурных изменений в эндометрии кобыл. Однако для диагностики фиброзного перерождения ткани необходимо использовать специальные красители. Методы окраски по Ван Гизону и трихромным красителем по Массону хорошо выделяют на гистосрезе фибрин, окрашивая его, соответственно, в розово-пурпурный и синий цвет, и могут применяться для оценки степени тяжести фиброзного процесса в эндометрии кобыл.

#### **2. 2. 4 Влияние гормонального фона на структуру эндометрия в разные фазы полового цикла**

Анализ морфометрических показателей эндометрия выявил непосредственную связь между уровнем половых гормонов в крови кобыл и гистологической структурой эндометрия (Таблица 5), а именно параллельное с ростом уровня прогестерона, достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение плотности желез в губчатом слое в фазе диэструса, по сравнению с эструсом ( $9,57 \pm 1,20$  и  $13,80 \pm 1,74$  ед. в поле зрения, соответственно). Это можно объяснить физиологическим «высушивающим» действием прогестерона на эндометрий в диэструсе, когда фаза пролиферации, контролируемая эстрадиолом в период эструса (отек эндометрия), сменяется фазой секреции, подготавливающей матку к восприятию и питанию эмбриона.

Анализ корреляционных связей по методу Спирмена выявил обратную зависимость между уровнем прогестерона и эстрадиола (-0,78). Положительная корреляция (0,69) прослеживается между уровнем прогестерона и плотностью желез. Соответственно, наблюдается обратная зависимость (-0,65) между уровнем эстрадиола и плотностью желез.

Таблица 5 - Влияние половых гормонов на структуру эндометрия кобыл

Фаза полового цикла	n	Концентрация гормона		Морфометрические показатели эндометрия			
		прогестерон, нг/мл	17β эстрадиол, пг/мл	диаметр желез, мкм		плотность желез, ед.п.з	
				SC*	SS**	SC	SS
Эструс	10	1,03 ±0,32 <sup>a</sup>	200,93 ±80,09	22,62 ±2,39	42,54 ±9,03	14,33 ±1,99	9,57 ±1,20 <sup>c</sup>
Диэструс	10	7,45 ±3,09 <sup>b</sup>	69,63 ±17,02	30,53 ±5,04	47,78 ±10,38	14,60 ±1,84	13,80 ±1,74 <sup>d</sup>

Примечание: <sup>a,b</sup>p <0,05, <sup>c,d</sup>p<0,05; \*SC – компактный слой (Stratum Compactum), \*\* SS – губчатый слой (Stratum Spongiosum)

Однако анализ диаметра желез в эндометриальных слоях не обнаружил связи с уровнем половых гормонов, что, по-видимому, имеет отношение к возрастным изменениям в матке кобыл, поскольку в наших исследованиях между диаметром желез и возрастом кобыл, имеется высокая положительная корреляция (0,91).

### 2. 2. 5 Эндометриальный показатель

Как показал анализ 4 морфометрических показателей эндометрия (Таблица 2), наиболее информативными из них оказались диаметр и плотность желез, которые имеют достоверные различия в эструсе и диэструсе, а также у молодых и возрастных кобыл. Было показано, что у молодых здоровых кобыл диаметр желез должен быть небольшим и практически не должен существенно меняться в двух фазах цикла, что отражает интенсивный дренаж слизистой матки. В то же время, при нормальном функционировании эндометрия плотность желез в диэструсе должна возрастать. Напротив, у кобыл с деструктивными процессами и повреждениями эндометриальной ткани железы могут растягиваться и плохо сокращаться в диэструсе, поэтому в совокупности их средний диаметр будет увеличенным, а плотность - более низкой, чем у здоровых кобыл.

На основании сделанного заключения нами предложен цифровой показатель, характеризующий функциональное состояние эндометрия по его морфометрическим параметрам, который

выражается отношением среднего диаметра желез к их средней плотности в диэструсе:

$$\text{ЭП} = \text{Дд} : \text{Пд}, \quad \text{где}$$

ЭП–эндометриальный показатель, мкм/ед.п.з. (микрометров/единиц в поле зрения)

Дд– средний диаметр желез в диэструсе в губчатом слое, мкм

Пд – средняя плотность желез в диэструсе в губчатом слое, ед.п.з.

Для выяснения референтных значений эндометриального показателя нами были прослежены результаты случки/осеменения кобыл (ожеребилась или прохолостела/абортировала) в текущем и следующем году после гистологического исследования эндометрия. Факторный анализ плодовитости и возраста кобыл (n=21) показал ее тесную связь с эндометриальным показателем (ЭП). Он был существенно выше у кобыл с пониженной плодовитостью ( $p=0,0328$ ) и у кобыл старше 10 лет ( $p=0,0052$ ), в сравнении с молодыми гинекологически здоровыми матками (Рисунок 4).

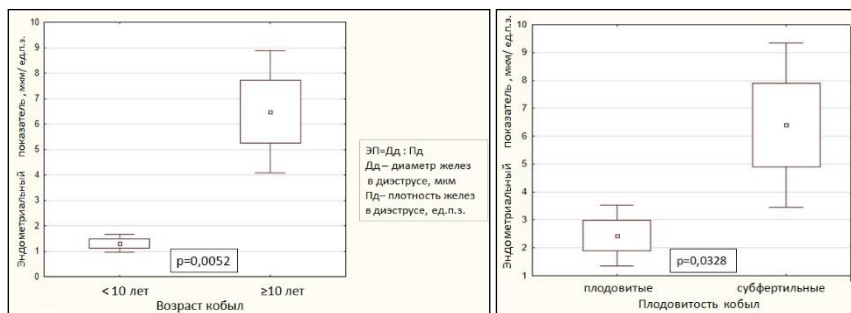


Рисунок 4 - Связь эндометриального показателя (ЭП) с возрастом и плодовитостью кобыл

У возрастных кобыл, по нашим наблюдениям, эндометриальный показатель может достигать 9 мкм/ед.п.з. и, в среднем, на 5 единиц превосходит соответствующий показатель у молодых кобыл (6,50 и 1,31 мкм/ед.п.з., соответственно).

Следует уточнить, что возраст кобыл не напрямую связан с плодовитостью. В группе молодых кобыл могут оказаться субфертильные животные с хроническими заболеваниями полового тракта, равно как и среди кобыл старшего возраста встречаются матки, ежегодно приносящие здоровых жеребят. Тем не менее,

общая, физиологически обоснованная тенденция снижения фертильности у кобыл с возрастом подтверждается на гистологическом уровне.

Проанализировав доверительные интервалы по группам кобыл, разделенных по признакам ( $\pm 0,95$  CI), можно заключить, что в норме эндометриальный показатель «ЭП=Дд : Пд» не должен превышать 2-3 мкм/ед.п.з.

### **2. 2. 6 Сравнительный анализ информативности методов комплексной репродуктивной оценки кобыл**

На основании результатов наружного осмотра, ректального, вагинального и ультразвукового исследования из 20 кобыл в группу условно гинекологически здоровых было отобрано 13 гол., а в группу с признаками воспаления полового тракта – 7 гол. Однако после проведения цитологического, бактериологического и гистологического анализа были внесены уточнения. Среди «условно здоровых» по числу и локализации воспалительных клеток было дополнительно выявлено 2 кобылы со скрытой формой и 1 кобыла с хронической формой эндометрита. При этом бактериологический анализ образцов маточных смывов/мазков оказался положительным только у трех кобыл с признаками воспаления полового тракта. При ультразвуковом исследовании кобыл на момент забора образцов признаки эндометрита были очевидными лишь в 7 случаях из 10. Ректальная диагностика выявила репродуктивные проблемы только у 2 кобыл.

При гистологическом исследовании здорового эндометрия PMN-клетки в образцах отсутствовали. Анализ гистосрезов эндометрия в разные фазы воспаления показал, что при хронической форме PMN-клетки проникают в строму глубже, чем в острой фазе воспалительного процесса. В компактном слое наблюдали кистозно-растянутые железы, в некоторых случаях окруженные одним или более слоями фибрина. Сосуды в подслизистом слое имели утолщенные стенки, местами наблюдалось геморрагическое пропитывание стромы.

Проведенное исследование показало, что ректальное, ультразвуковое, цитологическое и бактериологическое исследование не полностью отражает истинную картину состояния эндометрия, и в отдельных случаях (скрытая или хроническая форма эндометрита) заболевание может быть не выявлено в отсутствие дополнительного,

более глубокого морфологического анализа слизистой матки. Поэтому комплексная оценка репродуктивных качеств кобыл должна быть дополнена гистологическим анализом образцов эндометрия с использованием морфометрических параметров для выявления истинных причин субфертильности и бесплодия кобыл.

### **3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

#### **3.1 Выводы**

1. При анализе показателей воспроизводства поголовья лошадей в конных заводах Российской Федерации, проведенном на статистическом материале из актуальных информационных источников и первичных данных зоотехнической отчетности племенных хозяйств, выявлены тенденции снижения показателей по зажеребляемости и благополучной выжеребке на фоне увеличения доли абортос, слаборожденного и мертворожденного приплода в группе кобыл старше 10 лет, в сравнении с матками 6-9 летнего возраста.

2. На примере орловской рысистой породы подтверждено, что молодые ( $\leq 5$  лет) кобылы после ипподромных испытаний, имеют достоверно более низкий процент зажеребляемости ( $p < 0,01$ ) и благополучной выжеребки ( $p < 0,05$ ), чем кобылы в более старшем возрасте.

3. Отсутствие достоверной разности у кобыл 6-9 летнего возраста и маток старше 10 лет в уровне зажеребляемости (85,1 – 82,2%) и благополучной выжеребки (77,8 – 74,8%) объясняется тем, что в маточном составе хозяйств остаются либо наиболее плодовитые кобылы, регулярно приносящие здоровых жеребят, либо наиболее ценные с селекционной точки зрения матки, к которым проявляется больше внимания.

4. Тенденция снижения плодовитости с возрастом у кобыл подтверждается на уровне структурных изменений в эндометрии. По результатам морфометрического анализа образцов эндометрия кобыл из двух возрастных групп ( $< 10$  и  $\geq 10$  лет) было показано, что у кобыл старше 10 лет на гистосрезках чаще наблюдаются деструктивные изменения. Выявлено, что основными видами нарушений в эндометрии у маток являются: растянутость желез и их гнездование, образование кист, фиброзное перерождение эндометриальной ткани, лимфатические лакуны, полипы.

5. Наиболее существенные различия в структуре эндометрия наблюдаются в его губчатом слое, а наиболее информативными морфометрическими показателями могут служить диаметр и плотность желез. В норме плотность желез в губчатом слое в период диэструса достоверно увеличивается по сравнению с эструсом ( $p < 0,001$ ), что свидетельствует об уплотнении эндометрия за счет отсутствия эстрального отека. Растяжение стенок и застой секрета в просвете желез у кобыл старше 10 лет вызывает существенное ( $p < 0,001$ ) увеличение их диаметра как в эструсе (54,0 мкм), так и в диэструсе (61,3 мкм), по сравнению с молодыми кобылами (21,7 мкм и 20,9 мкм, соответственно).

6. Снижение фертильности кобыл с возрастом объясняется физиологическим старением матки на фоне снижения и потери эластичности эндометриальной ткани, которая выражается в существенном уменьшении плотности желез в диэструсе ( $p < 0,001$ ), а также в отсутствии достоверной разности в плотности желез в диэструсе и в эструсе у кобыл старше 10 лет, по сравнению с более молодыми кобылами ( $p < 0,001$ ).

7. Предложенный эндометриальный показатель (ЭП), рассчитанный, как отношение среднего диаметра к средней плотности желез в губчатом слое эндометрия в диэструсе ( $D_d : P_d$ ), имеет высокую достоверную связь с плодовитостью ( $p = 0,0328$ ) и возрастом ( $p = 0,0052$ ) кобыл и может использоваться для оценки и прогноза их воспроизводительных качеств. В норме эндометриальный показатель не должен превышать 2-3 мкм/ед.п.з. (единиц в поле зрения).

8. Присутствие нейтрофилов и лимфоцитов на гистосреззах эндометрия является признаком воспалительного процесса в матке кобылы.

9. Циклические изменения в структуре эндометрия тесно связаны с гормональным фоном у кобыл. Эстрадиол и прогестерон оказывают противоположное действие на состояние эндометрия ( $r = -0,78$ ). Установлена положительная корреляция ( $r = 0,69$ ) между уровнем прогестерона и плотностью желез эндометрия, что отражает характер доминирующего действия прогестерона в диэструсе. Также показано, что уровень прогестерона не связан с диаметром эндометриальных желез в конкретной фазе цикла, поскольку этот показатель в большей степени зависит от возрастных изменений в слизистой матки кобыл.

10. Большинство выявленных эндометриальных изменений достаточно хорошо визуализируется и дифференцируется с помощью окрашивания классическим красителем гематоксилин и эозин. Однако в сравнительном исследовании установлено, что для диагностики фиброзных изменений в эндометрии необходимо использовать специальные красители по Ван Гизону и трихромный краситель по Массону с анилиновым синим, которые в одинаковой степени хорошо прокрашивают фиброзные волокна.

### **3. 2 Практические предложения**

При оценке состояния воспроизводительной функции у племенных кобыл с гинекологическими проблемами и пониженной фертильностью перед началом случной компании рекомендуется проводить гистологический анализ эндометрия матки, позволяющий объективно оценить перспективы их использования в воспроизводстве. Данный метод является более информативным в сравнении с традиционными исследованиями половых органов у маток, в особенности в отношении кобыл старше 10 лет, с нарушениями полового цикла и жеребости. Предложенный нами эндометриальный показатель (ЭП) может быть использован для определения состояния эндометрия в комплексной системе оценки воспроизводительных качеств кобыл.

Для выявления степени фиброзных изменений в эндометрии кобыл рекомендуется использовать методики окрашивания гистологических препаратов по Ван Гизону и трихромным красителем по Массону с анилиновым синим.

### **3. 3 Перспективы дальнейших исследований**

В дальнейшем основным направлением исследований будет использование гистохимических методов для углубленного изучения причин и предпосылок возникновения различных морфологических изменений в эндометрии у кобыл.

### **Публикации по теме диссертации**

#### **Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:**

1. Дубровская А. Б. Современные методы исследования репродуктивных органов кобыл в племенном коневодстве /А. Б. Дубровская //Главный зоотехник. – 2022. - №1.- С 65-74.

2. Дубровская А. Б. Совершенствование оценки воспроизводительных качеств кобыл в племенном коневодстве/Л. Ф. Лебедева, А. Б. Дубровская//Зоотехния. – 2022.-№2. С.30-33

3. Дубровская А.Б. Морфометрические критерии здорового эндометрия у кобыл /Дубровская А. Б., Лебедева Л. Ф., Устьянцева А. В.// Коневодство и конный спорт.- 2021.- №5.- С.10-12.

4. Дубровская, А. Б. Связь гистологической структуры эндометрия с уровнем стероидных гормонов в крови у кобыл в различные фазы полового цикла/ А. Б. Дубровская, Л. Ф. Лебедева// Коневодство и конный спорт.- 2021.- № 1.- С. 8-11.

5. Дубровская, А. Б. Расширенная комплексная оценка репродуктивных качеств кобыл /Дубровская А.Б., Лебедева Л.Ф.// Коневодство и конный спорт.- 2020.- № 1.- С. 30-33.

6. Дубровская, А. Б. Возрастные изменения в эндометрии у кобыл/ А. Б. Дубровская//Коневодство и конный спорт.- 2020.- № 2. -С. 31-33.

7. Dubrovskaya, A. B. Comparative histomorphological characteristics of the endometrium of young and old mares with oestrus and diestrus/ A. B. Dubrovskaya, L.F. Lebedeva, K.A. Schukis // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. - 2019- Vol. 341. – P.012067. (SCOPUS)

#### **В других изданиях:**

8. Дубровская, А. Б. О пользе гистологического метода исследования эндометрия у кобыл/ А. Б. Дубровская//Сборник докладов научно-практической конференции «Достижения молодых ученых – зоотехнической науке и практике». - Дивово -2018. -С. 102-106.

9. Дубровская А. Б. Комплексная оценка репродуктивного статуса кобыл/ Лебедева Л. Ф., Дубровская А. Б.//Международная научно-практ конференция «Проблемы и перспективы развития животноводства, Витебск. Респ. Беларусь, 2018. - С.136.

Подписано в печать 30.03.22. Формат 60x84 1/16  
Усл. печ. л. 1,4. Тираж 80 экз. Заказ № 392

---

Участок печати ФГБНУ «ВНИИ коневодства»  
Рыбновский район, Рязанская область  
Тел./факс 8 (4912) 24-02-65; 24-05-39  
E-mail: vniik08@mail.ru