

ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ОСЕМЕНЕНИЯ КОБЫЛ СПЕРМОЙ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ПО РОССИЙСКИМ И ЗАРУБЕЖНЫМ ТЕХНОЛОГИЯМ

Л.Ф. ЛЕБЕДЕВА, М.М. АТРОЩЕНКО, С.А. БУРМИСТРОВА

Метод искусственного осеменения (ИО) имеет следующие преимущества по сравнению с естественной случкой: быстрый селекционный эффект, удобство транспортировки и возможность широкого распространения ценного генетического материала, экономное расходование семени и рациональное половое использование производителей, предотвращение распространения инфекций, передающихся половым путем, резервирование спермы в криобанках. В числе факторов, оказывающих влияние на результат ИО в коневодстве, отмечены время, кратность и повторность осеменения, качество и количество используемого семени, глубина введения спермы в матку кобылы, соблюдение температурного режима и санитарных норм во время проведения процедуры ИО, состояние половой системы кобыл. Существуют два основных подхода к замораживанию семени жеребцов и, соответственно, две технологии ИО с соответствующими видами фасовки спермы и инструментарием для ее введения в полость матки кобылы. Первый подход, разработанный и распространенный в России, основан на шадящем режиме криоконсервации спермы в больших объемах, по 20-25 мл в дозе. Второй, получивший развитие за рубежом, предусматривает предварительную обработку спермы центрифугированием и максимальное удаление семенной плазмы. Есть также российские технологии криоконсервации спермы в малых объемах (5-6 мл) с этапом центрифугирования и удалением 50-60 % семенной плазмы и сгущения спермы с помощью диализа. В последние годы в Россию стала активно импортироваться замороженная сперма жеребцов из Европы и Америки. Несмотря на технологические различия, отечественные и зарубежные подходы к криоконсервации семени жеребцов обеспечивают схожие качественные характеристики спермы после оттаивания. Мы сравнили следующие наиболее значимые факторы, влияющие на зажеребляемость кобыл при осеменении спермой, которую замораживали по отечественным и зарубежным технологиям: фасовка спермы/технология криоконсервации, время осеменения, репродуктивная группа кобыл, их гинекологическое состояние и активность спермы. В опытах использовали кобыл различных пород (арабской, ахалтекинской, траккененской, ганноверской, русской верховой, американской стандартбредной, русской рысистой и орловской). Исследования проводили в 2012-2014 годах (Терский конный завод, частное хозяйство А.А. Казакова и экспериментальная конюшня Всероссийского НИИ коневодства). В обработку были включены данные по 106 половым циклам (53 кобылы), в которые проводилось искусственное осеменение криоконсервированной спермой отечественного (в гранулах и тубах по 5 и 15-25 мл) и зарубежного (в соломинах по 0,5 мл) производства. Всю использованную сперму в различных фасовках разделили на две группы: с активностью выше и ниже 1,5 балла (15 %). В рамках временного периода, рекомендованного для искусственного осеменения замороженным семенем, выделили три интервала (12 ч до овуляции, во время овуляции, 6 ч после овуляции). Исследовали три репродуктивные группы кобыл: холостые и молодые (впервые идущие в случку); подсосные (лактрующие); кобылы после позднего (6 мес жеребости и более) аборта. По гинекологическому состоянию кобыл делили на две группы — с патологиями (выделения из вульвы, жидкость и воздух в матке, посткоитальный эндометрит) и без патологий. Результат осеменения оценивали по степени зажеребляемости, благополучной выжеребки кобыл и числу абортотворений. Из пяти проанализированных факторов выделены два наиболее важных и с высокой достоверностью ($p < 0,001$) определяющих успех процедуры осеменения замороженным семенем. Это качество (активность не ниже 1,5 балла, или 15 %) спермы и исходное гинекологическое состояние кобыл (без патологий). Технология криоконсервации, виды фасовки спермы, а также принадлежность кобыл к различным репродуктивным группам имеют второстепенное значение. Установлено, что осеменение кобыл одной дозой спермы в течение 6 ч после овуляции обеспечивает такую же степень зажеребляемости (67,7 %), как и осеменение в 12-часовой период до овуляции (65,0 %) или непосредственно в момент выхода яйцеклетки из фолликула.

Ключевые слова: кобыла, сперма, искусственное осеменение, криоконсервация.

Попытки оплодотворить самку посредством перенесения в ее половые пути спермы самца предпринимали еще древние ассирийцы (1000 лет до н.э.). Однако масштаба зоотехнического производственного метода этот прием достиг в животноводстве только в начале прошлого века бла-

годаря И.И. Иванову (1). Вклад русских и советских ученых в мировую практику искусственного осеменения (ИО) сельскохозяйственных животных огромен. Имена В.К. Милованова, А.В. Квасницкого, И.И. Соколовской, И.В. Смирнова хорошо известны за рубежом. Научные труды и достижения сотрудников Всесоюзного (ныне Всероссийского) института коневодства (ВНИИ коневодства) по ИО и криоконсервации спермы жеребцов составляют золотой фонд отечественной науки, отмечены государственными наградами и входят в число мировых приоритетов. П.Н. Скаткиным и его ученицей Т.П. Ильинской в 1954 году впервые в мире получены жеребята от замороженного семени, работы В.Г. Паршутина и Е.С. Кружковой (1956 год), В.А. Румянцевой (1958 год), Е.М. Платова и С.Я. Ромбе (1967 год), А.И. Науменкова и Н.К. Романьковой (1969 год) были посвящены подбору состава разбавителей, криопротекторов, хладагентов, способов фасовки и режимов обработки для спермы жеребцов с целью обеспечить ее оплодотворяющую способность и максимальные сроки хранения (2, 3). В 1970-х годах во ВНИИ коневодства был создан криобанк, в котором в настоящее время хранится около 3000 доз семени выдающихся жеребцов-производителей 15 пород лошадей. Следует подчеркнуть, что в мировой практике еще не отмечены такие рекордные сроки хранения семени жеребцов. Периодические проверки оплодотворяющей способности и получение потомства от семени 16, 25, 30, 33, 35 и 38 лет хранения в жидком азоте доказывают, что разработанные русскими учеными технологии с успехом выдерживают испытание временем (4-6).

В настоящее время исследования в области искусственного осеменения лошадей в России и за рубежом проводят на принципиально новом уровне с использованием современных методов компьютерного анализа спермы, проточной цитометрии, трансмиссионной электронной микроскопии и др. Новые технические возможности позволили ученым углубиться в изучение внутриклеточных взаимодействий и ультраструктурных характеристик половых клеток в связи с криоустойчивостью и оплодотворяющей способностью сперматозоидов после замораживания-оттаивания (7-10).

Безусловные преимущества метода ИО по сравнению с естественной случкой — быстрый селекционный эффект, удобство транспортировки и возможность широкого распространения ценного генетического материала, экономное расходование семени и рациональное половое использование жеребцов, предотвращение распространения инфекций, передающихся половым путем, резервирование спермы выдающихся особей и представителей исчезающих пород с использованием криобанков.

Работа с замороженным семенем требует внимания и тщательности, поскольку качественные характеристики спермы в значительной степени ухудшаются в результате стрессового воздействия криоконсервации. Осеменение такой спермой приводит к снижению зажеребляемости по сравнению со свежим и охлажденным семенем. По данным зарубежных источников, зажеребляемость кобыл после осеменения замороженной спермой в среднем составляет 35-50 % с колебаниями по первому циклу от 31 до 73 % (11); в России эти показатели примерно такие же (12, 13).

В числе факторов, влияющих на результат ИО, в специальной литературе отмечают время, кратность и повторность осеменения, качество и количество используемого семени, глубину введения спермы в матку кобылы, а также соблюдение температурного режима и санитарных норм во время проведения процедуры ИО (14-18). Кроме того, специалисты уделяют серьезное внимание состоянию половой системы кобыл, в частности после выжеребки, абортот и при наличии признаков патологий (14, 15, 19,

20), имеющих прямое отношение к зажеребляемости. Немало работ за рубежом посвящено проблеме посткоитального эндометрита (11, 21, 22).

Основные требования, предъявляемые в настоящее время к качеству спермы после оттаивания, следующие: активность спермы — не менее 2,5 балла, или 25 %, по российским стандартам (23, 24) и 30 % по зарубежным (19, 25, 26); число сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (ППД) в дозе не должно быть ниже 200-300 млн (12, 19, 25); в отечественных технологиях криоконсервации к качественным показателям относят также выживаемость спермы — не менее 96 ч (23, 24).

В настоящее время существует два основных технологических подхода к замораживанию семени жеребцов и, соответственно, две технологии ИО с соответствующими видами фасовки спермы и инструментарием для ее введения в полость матки кобылы. Первый подход, разработанный и распространенный в России, основан на шадящем режиме криоконсервации спермы в больших объемах, по 20-25 мл в дозе (27). Второй, получивший развитие за рубежом, предусматривает предварительную обработку спермы центрифугированием и максимальное удаление семенной плазмы, то есть повышение содержания сперматозоидов и снижение объема дозы до 1-6 мл (28, 29). В рамках этого подхода так называемые малообъемные технологии за рубежом тоже различаются по составу разбавителей, криопротекторов и приемам подготовки спермы к замораживанию. Существуют также российские технологии криоконсервации спермы в малых объемах (5-6 мл) с этапом центрифугирования и удалением 50-60 % семенной плазмы (30) и сгущения спермы с помощью диализа (31). В 1970-х годах в СССР был разработан способ криоконсервации спермы (без центрифугирования) в гранулах (32), которые упаковывались в тубы из расчета конечного объема 20-25 мл в дозе.

В зависимости от технологии криоконсервации предусмотрены разные виды фасовки спермы: алюминиевые тубы по 5 и 15-25 мл (отечественные технологии) (27, 30, 31); пластиковые соломинки по 0,25; 0,5 и 5 мл (зарубежные технологии) (26, 29). При этом в первом варианте одна туба составляет 1 дозу для осеменения, во втором в дозе может быть от одной соломины по 5 мл до 2-12 и более соломин по 0,25 и 0,5 мл.

Следует подчеркнуть, что за рубежом существует очень жесткий отбор спермы жеребцов для криоконсервации, невзирая на племенную ценность или выдающуюся работоспособность производителей. Поэтому на международном рынке вся сперма в соломинах, как правило, имеет высокие качественные показатели. В России нет такого выбора жеребцов-производителей, поэтому наши специалисты по заказу коневладельцев иногда вынуждены работать с семенем более низкого качества, чтобы сохранить ценные линии в породах. Отечественная технология (27) это позволяет, поскольку в ней отсутствует этап центрифугирования, что снижает повреждающий эффект и сохраняет оплодотворяющую способность спермы на допустимом уровне.

Вопрос об оптимальном интервале между осеменением и овуляцией — это краеугольный камень любой технологии ИО. Отечественные и зарубежные рекомендации по использованию криоконсервированной спермы несколько различаются. Так, в России кобыл начинают осеменять заморожено-оттаянной спермой при 3-4-й степени зрелости фолликула с интервалом в 12-16 ч до установления овуляции. После овуляции отечественные специалисты осеменять кобылу не рекомендуют (14-17, 20, 24). За рубежом принято осеменять кобылу заморожено-оттаянной спермой (на основании ректальных и ультразвуковых признаков приближающей ову-

ляции) не ранее, чем за 12 ч до овуляции, и не позднее 6 ч после овуляции (11, 19, 25, 26, 33).

При сравнении отечественных и зарубежных подходов к криоконсервации спермы жеребцов и осеменению кобыл заморожено-оттаянным семенем стоит подчеркнуть их плюсы и минусы. Сгущение спермы методом центрифугирования и фасовка спермы в соломинки или тубы малого объема позволяет хранить и перевозить большее количество доз в сосудах Дьюара и экономит жидкий азот. Однако такой подход требует высокого качества исходного семенного материала, сопряжен с его потерей в процессе обработки (удаление надосадка после центрифугирования) и в результате — с увеличением расхода семени на дозу. Отечественная так называемая большеобъемная (15–25 мл) технология — более щадящая, поэтому позволяет работать со спермой менее высокого качества и использовать без потерь весь исходный объем. С точки зрения автоматизации, компьютеризации и полной обеспеченности технологического процесса специально разработанным инструментарием зарубежным технологиям, вероятно, можно отдать предпочтение. Вместе с тем стоимость таких технологических линий, зависимость от импортных сред и расходных материалов, а также необходимость создания определенных условий для работы ограничивают их использование рамками специализированных репродуктивных центров или крупных конных заводов. Отечественная технология, простая и недорогая, напротив, позволяет успешно замораживать семя жеребцов даже в мелких частных хозяйствах. Несмотря на отмеченные различия, оба подхода не уступают друг другу в качестве спермы после оттаивания и обеспечивают примерно одинаковую результативность при искусственном осеменении кобыл.

В России сперма жеребцов, криоконсервированная по зарубежной технологии, появилась сравнительно недавно. Высокая стоимость семени (от нескольких сотен до нескольких тысяч евро за одну дозу объемом 1,5–6 мл), дорогостоящий импортный инструментарий, недостаток отечественных специалистов с необходимой квалификацией — все эти факторы замедляли процесс активного внедрения зарубежной технологии в практику российского коневодства. Поэтому до последнего времени собрать убедительный материал по результативности ее применения в нашей стране не представлялось возможным.

Целью настоящей работы был анализ показателей воспроизводства кобыл после искусственного осеменения спермой, замороженной по разным технологиям, и выяснение того, какие факторы при этом оказываются определяющими.

Методика. Исследования проводили на Терском конном заводе (Ставропольский край), в частном хозяйстве А.А. Казакова (Рязанская обл.) и на экспериментальной конюшне Всероссийского НИИ коневодства в период с 2012 по 2014 годы. Условия содержания и кормления кобыл во всех хозяйствах соответствовали зоотехническим нормам. Для осеменения использовали криоконсервированную сперму жеребцов, замороженную по разным технологиям и с различными показателями активности, в том числе ниже рекомендуемых.

Кобыл верховых (арабская, ахалтекинская, тракененская, ганноверская, русская верховая) и рысистых (американская стандартbredная, русская рысистая и орловская рысистая) пород разделяли на группы с учетом следующих факторов: осеменение спермой в разной фасовке (гранулы, тубы, соломины), осеменение спермой с разной активностью, время осеменения относительно срока овуляции, репродуктивная группа кобыл (моло-

дые и холостые, подсосные, после позднего аборта), исходное гинекологическое состояние кобыл (без видимых признаков патологии, с видимыми признаками патологии).

Фасовка спермы подразумевает технологию ее криоконсервации. В опыты были включены дозы спермы, замороженные по трем отечественным технологиям, и сперма зарубежного производства (Германия, Франция, Италия, США). Для этого использовали хранящуюся в криобанке ВНИИ коневодства сперму, расфасованную в гранулах (по Е.М. Платову) (1-я группа), в тубах по 15-25 мл (по А.И. Науменкову и Н.К. Романьковой) (2-я группа), в тубах по 5 мл (по Е.Л. Фоминой) (3-я группа). Импортную сперму (4-я группа) в соломинах по 0,5 мл (от 3 до 8 соломин в дозе) получали от хозяйств и частных заказчиков для осеменения принадлежащих им кобыл.

Активность семени после оттаивания определяли стандартным методом в соответствии с рекомендациями (24). Всю использованную сперму (отечественного и зарубежного производства) в различных фасовках разделили на две группы: с активностью $\geq 1,5$ балла и $< 1,5$ балла. Образцы спермы с пониженной активностью, криоконсервированной по отечественной технологии, при сравнении с импортной спермой дополнительно объединили в две подгруппы — с активностью выше и ниже 2 баллов (20 %).

Зрелость фолликула контролировали методами ректальной и ультразвуковой диагностики (УЗИ) с интервалом 6 ч. Период, рекомендованный для искусственного осеменения замороженным семенем, разделили на три интервала (12 ч до овуляции, во время овуляции, 6 ч после овуляции) и оценили результаты осеменения по каждому из них. Кобыл осеменяли инструментами, соответствующими используемым технологиям. Результат осеменения определяли с помощью УЗИ (с 14-15-х сут после овуляции) и ректальным (с 18-20-х сут после овуляции) методом. По данным за год учитывали зажеребляемость (%) и благополучную выжеребку (%) не только от числа зажеребевших, но также от числа осемененных кобыл как итоговый показатель эффективности использования маточного поголовья. Дополнительно учитывали аборт (или случаи эмбриональной гибели).

По функциональному состоянию репродуктивной системы мы выделили три группы кобыл: I группа — холостые и молодые (впервые идущие в случку), II группа — подсосные (лактующие), III группа — кобылы после позднего (6 мес жеребости и более) аборта.

По гинекологическому состоянию кобыл объединили в две группы — с патологиями и без патологий. К видимым (то есть диагностированным при ректальном, ультразвуковом или вагиноскопическом исследовании) признакам патологии относили выделения из вульвы, жидкость или воздух в матке, посткоитальный эндометрит.

Данные обрабатывали по общепринятой методике расчета статистических характеристик, оценивая достоверность различий между группами с использованием критерия Стьюдента-Фишера (34).

Результаты. В обработку были включены данные за три случных сезона по 106 половым циклам (53 кобылы), в которые проводили искусственное осеменение дозами криоконсервированной спермы, приготовленными по российским и зарубежным технологиям.

Сравнение результативности осеменения спермой в разной фасовке показало, что зажеребляемость кобыл в 4-й группе (соломины по 0,5 мл) была сходна с аналогичным показателем в 1-й группе (гранулы), но достоверно ($p < 0,05$) превосходила таковую во 2-й группе (тубы по 15-25 мл) (табл. 1).

Поскольку активность импортной спермы не опускалась ниже 2-2,5 балла, в то время как во 2-й группе она в некоторых случаях не превышала 0,5 балла, мы разделили 2-ю группу на две подгруппы (с активностью спермы выше и ниже 2 баллов). В результате зажеребляемость в подгруппе с высоким качеством спермы выросла до 69,6 % и перестала достоверно отличаться от таковой в 4-й группе, тогда как в подгруппе с активностью ниже 2 баллов — упала до 43,5 %, однако различия между подгруппами были недостоверными.

1. Результаты искусственного осеменения (ИО) кобыл верховых и рысистых пород криоконсервированной спермой в разной фасовке и с неодинаковой активностью (Терский конный завод, частное хозяйство А.А. Казакова, Всероссийский НИИ коневодства, 2012-2014 годы)

Вариант	ИО, циклов	Зажеребевших		Аборты, гол.	Благополучная выжеребка ($M \pm m$), %	
		гол.	$M \pm m$, %		от числа зажеребевших	от числа осемененных
Гранулы (1-я группа, активность 1-1,5 балла)	7	5	71,4±17,10	1	80,0±17,90	57,1±18,70
Тубы по 15-25 мл (2-я группа):						
всего	46	26	56,5±7,31 ^a	5	80,8±7,70	45,7±8,00
в подгруппе с активностью ≥ 2 баллов	23	16	69,6±9,59	4	75,0±10,80	52,2±10,40
в подгруппе с активностью < 2 баллов	23	10	43,5±10,34	1	90,0±9,50	39,1±10,20 ^d
Тубы по 5 мл (3-я группа, активность ≥ 2 баллов)	3	2	66,7±27,15	1	50,0±35,40	33,3±27,20
Соломины по 0,5 мл (4-я группа, активность ≥ 2 баллов)	50	37	74,0±6,20 ^b	4	89,2±5,10	66,0±6,70 ^c

^{a, b} p < 0,05; ^{c, d} p < 0,05 (соответственно достоверность различий между группами с индексами а и б и между группами с индексами с и d).

Показатель благополучной выжеребки от числа осемененных кобыл имел некоторую тенденцию к повышению в 4-й группе. Достоверно (p < 0,05) он отличался лишь от такового в подгруппе с активностью спермы < 2 баллов. Однако если учитывать процент благополучной выжеребки по отношению к числу жеребых кобыл, разница нивелировалась. Во всех остальных случаях различия между группами оказались недостоверными.

В целом результативность осеменения кобыл спермой, замороженной по разным технологиям и упакованной в различные контейнеры (при условии квалифицированного проведения процедуры осеменения), колебалась в пределах 69-72 % и не имела достоверных различий.

2. Результаты искусственного осеменения (ИО) кобыл верховых и рысистых пород в зависимости от срока осеменения криоконсервированной спермой и ее активности (Терский конный завод, частное хозяйство А.А. Казакова, Всероссийский НИИ коневодства, 2012-2014 годы)

ИО, циклов	Зажеребевших		Аборты, гол.	Благополучная выжеребка ($M \pm m$), %	
	гол.	$M \pm m$, %		от числа зажеребевших	от числа осемененных
Срок осеменения					
12 ч до овуляции					
20	13	65,0±10,67	1	92,3±7,40	60,0±10,95
Во время овуляции					
21	11	52,4±10,90	2	81,8±11,56	42,9±10,80
6 ч после овуляции					
65	44	67,7±5,80	7	84,1±5,51	56,9±6,14
Активность спермы					
≥ 1,5 балла					
59	46	78,0±5,40 ^a	7	84,8±5,30	66,1±6,20 ^c
< 1,5 балла					
28	5	17,9±7,20 ^b	1	80,0±17,90	14,3±6,60 ^d

^{a, b} p < 0,001, ^{c, d} p < 0,001 (соответственно достоверность различий между группами с индексами а и б и между группами с индексами с и d).

При сравнении результативности в зависимости от срока осеменения (12 ч до овуляции, во время овуляции, 6 ч после овуляции) между вариантами не наблюдали достоверных различий по зажеребляемости (табл. 2), а средние значения показателя не выходили за пределы 52-68 %. По проценту благополучной выжеребки достоверные различия также отсутствовали (см. табл. 2). Между тем, хорошо известно, что время созревания фолликула и овуляции у кобыл во многих случаях (особенно в весенний переходный период) малопредсказуемы даже для специалистов, поэтому при попытках осеменения перед овуляцией всегда существует риск впустую потратить лишнюю дозу спермы ценой от 500-5000 евро и выше. Проведенные исследования подтверждают высокую зажеребляемость кобыл при осеменении их одной дозой спермы, замороженной как в тубах, так и в соломинах, в пределах 6 ч после овуляции.

Анализ зажеребляемости после осеменения кобыл спермой с активностью ниже и выше 1,5 балла (15 %), независимо от вида фасовки (см. табл. 2), выявил высокодостоверные различия между группами ($p < 0,001$). Это означает, что качество спермы кардинально влияет на исход всей процедуры. Достоверными оказались также различия по благополучной выжеребке от числа осемененных кобыл ($p < 0,001$). Однако в группах зажеребевших кобыл доля абортос была сходной.

Функциональное состояние репродуктивной системы кобылы к моменту осеменения имеет непосредственное отношение к условиям для выживания спермы и эмбриона в матке и гормональной регуляции половой функции, а следовательно, может влиять на зажеребляемость. Однако достоверных различий между тремя репродуктивными группами по зажеребляемости выявлено не было (табл. 3).

3. Результаты искусственного осеменения (ИО) кобыл верховых и рысистых пород в зависимости от репродуктивной группы и гинекологического состояния (Терский конный завод, частное хозяйство А.А. Казакова, Всероссийский НИИ коневодства, 2012-2014 годы)

ИО, циклов	Зажеребевших		Аборты, гол.	Благополучная выжеребка ($M \pm m$), %	
	гол.	$M \pm m$, %		от числа зажеребевших	от числа осемененных
Репродуктивная группа					
<i>I группа (молодые и холостые)</i>					
46	26	56,5±7,31	5	80,8±7,72	45,7±7,34
<i>II группа (подсосные)</i>					
25	13	52,0±10,00	1	92,3±7,40	48,0±10,00
<i>III группа (после позднего аборта)</i>					
6	5	83,3±15,23	2	60,0±21,90	50,0±20,40
Гинекологическое состояние					
<i>Без видимых отклонений</i>					
18	16	88,9±7,40 ^a	3	87,2±9,20	72,2±10,60 ^c
<i>Патологии (жидкость или воздух в матке, выделения из вульвы, посткоитальный эндометрит)</i>					
18	7	38,9±11,50 ^b	3	57,1±11,70	22,2±9,80 ^d

^{a, b} $p < 0,001$, ^{c, d} $p < 0,01$ (соответственно достоверность различий между группами с индексами а и b и между группами с индексами с и d).

Хотя зажеребляемость в III группе была выше этого показателя во II группе на 31,3 %, число кобыл в III группе, вероятно, недостаточно, чтобы считать такие различия достоверными.

Осеменение при наличии и отсутствии признаков патологий воспроизводительной системы кобыл выявило высокодостоверные различия в последующей зажеребляемости ($p < 0,001$) и благополучной выжеребке ($p < 0,01$) в пользу гинекологически здоровых животных. Однако повышение доли абортос у зажеребевших кобыл с патологиями достоверно не подтвердилось, несмотря на значительную разницу этого

показателя между здоровыми и проблемными кобылами.

Таким образом, из пяти проанализированных факторов можно выделить два наиболее важных и определяющих конечный результат процедуры осеменения замороженным семенем — качество спермы (активность не ниже 1,5 балла) и исходное гинекологическое состояние кобыл. Технология криоконсервации, виды фасовки спермы, а также принадлежность кобыл к различным репродуктивным группам при условии проведения осеменения на высоком профессиональном уровне имеют второстепенное значение. Установлено, что осеменение кобыл одной дозой спермы в течение 6 ч после овуляции обеспечивает такую же степень зажеребляемости, как осеменение в 12-часовой период до овуляции или непосредственно в момент выхода яйцеклетки из фолликула. Это означает, что ректальная и ультразвуковая диагностика яичника кобылы во время созревания фолликула может быть ограничена 6-часовым интервалом, и по факту овуляции следует незамедлительно проводить осеменение. Такой режим позволит сэкономить дозы дорогостоящего семени и обеспечить высокую зажеребляемость кобыл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов И.И. Искусственное осеменение у млекопитающих. СПб, 1907.
2. Науменкова В.А., Романькова Н.К. Памяти появления первого в мире жеребенка от замороженного семени. В сб. докладов науч.-практ. конф. и координационного совещания, посвященных 100-летию со дня рождения П.Н. Скаткина. Дивово, 2004.
3. Готлиб М.М., Калашников В.В. Разработка и использование метода искусственного осеменения в племенной работе в коневодстве. Коневодство и конный спорт, 2011, 6: 22-23.
4. Науменкова В.А., Атрошенко М.М., Лебедева Л.Ф., Халилов Р.А., Рябова Т.Н. Изучение длительности сроков хранения семени жеребцов в состоянии анабиоза. Коневодство и конный спорт, 2013, 5: 15-17.
5. Калашников В.В., Науменкова В.А., Адамковская М.В., Филимонова О.Л. Выявление максимально возможных сроков хранения глубоководнозамороженного семени жеребцов. Зоотехния, 2009, 2: 28-29.
6. Lebedeva L.F., Naumenkova V.A., Atroshchenko M.M. The scientific development in horse reproduction in Russia. Book of abstracts of the 64th annual meeting of the European Federation of animal science (EAAP). Nantes, France, 2013: 131.
7. Kavak A., Johannisson A., Lundheim N., Rodriguez-Martinez H., Aidnik M., Einarsson S. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. Animal Reproduction Science, 2003, 76: 205-216 (doi: 10.1016/S0378-4320(02)00247-6).
8. Pesch S., Bostedt H., Failing K., Bergmann M. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. Animal Reproduction Science, 2006, 91: 285-298 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.04.004).
9. Atroshchenko M.M., Bragina E.E. Change in the ultrastructure of stallion spermatozoa under the effect of cryopreservation. Russian Agricultural Sciences, 2011, 37(2): 175-178 (doi: 10.3103/S1068367411020029).
10. Elkina Yu.L., Atroshchenko M.M., Bragina E.E., Muronetz V.I., Schmalhausen E.V. Oxidation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase decreases sperm motility. Biochemistry (Moscow), 2011, 76(2): 268-272 (doi: 10.1134/S0006297911020143).
11. Knottenbelt D.C., Pascoe R.R., Leblanc M., Lopate Ch. Equine stud farm medicine and surgery. Elsevier Science Ltd., 2003.
12. Науменкова В.А. Современные проблемы метода искусственного осеменения кобыл криоконсервированной спермой. Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Роль и значение метода искусственного осеменения сельскохозяйственных животных в прогрессе животноводства 20-21 веков». Дубровицы, 2004: 100-102.
13. Науменкова В.А., Васильева О.В. Оплодотворяющая способность спермы жеребцов при использовании разных технологий криоконсервации. Зоотехния, 2007, 5: 30-32.
14. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. М., 1962: 581-615.
15. Ожин Ф.В., Родин И.И., Румянцев Н.В., Скаткин П.Н., Шергин Н.П. Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. М., 1961.

16. Животков Х.И. Глубокое введение спермы при искусственном осеменении лошадей. Коневодство, 1941, 2: 6.
17. Красников А.С. Коневодство. М., 1973.
18. Siemea H., Schaferb T., Stoutc T.A.E., Klugb E., Waberskid D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*, 2003, 60: 1153-1164 (doi: 10.1016/S0093-691X(03)00113-4).
19. Mottershead J. Frozen semen preparation and use. Part 1. «Canadian Morgan» Magazine, Nov/Dec 2000: 32-43.
20. Животков Х.И. Основы осеменения лошадей. М., 1952.
21. Русock J.F., Newcombe J.R. The relationship between intraluminal uterine fluid, endometritis and pregnancy rate in the mare. *Equine Practice*, 1996, 18: 19-22.
22. Troedsson M.H.T. Uterine response to semen deposition in the mare. Proc. Annual Meeting of the Society for Theriogenology. USA, Texas, San Antonio, 1995: 130-135.
23. Сперма жеребцов замороженная. ГОСТ 24168-80. М., 1980.
24. Инструкция по искусственному осеменению и трансплантации эмбрионов лошадей. Дивово, 2013: 28-29.
25. Squires E.L., Reger H.P., Maclellan L.J., Bruemmer J.E. Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. *Theriogenology*, 2002, 58: 655-658.
26. Loomis P.R. Storage, handling, and distribution of frozen equine semen. Proc. of the Annual Convention of the AAEP, San Diego, California, 2001, v. 47: 296.
27. Науменков А.И., Романькова Н.К. Лактозо-хелато-цитрато-желточный разбавитель спермы жеребца. Теория и практика совершенствования пород лошадей. Научные труды ВНИИК, 1971, т. XXV: 128-132.
28. Loomis P.R., Amann R.P., Squires E.L., Pickett B.W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *J. Anim. Sci.*, 1983, 56(3): 687-693.
29. Martin J.C. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil.*, 1979, 27: 47-51.
30. Фомина Е.Л. Новое в технологии криоконсервации спермы жеребца в малых объемах. Пути ускорения научно-технического прогресса в коневодстве. В сб. науч. тр. ВНИИК. Дивово, 1989: 65-66.
31. Науменкова В.А. Использование диализа для криоконсервации спермы жеребца. Канд. дис. Дивово, 1994.
32. Платов Е.М., Пустовая Е.С., Лялин А.Д., Котягина В.А. Длительное хранение спермы жеребца. Теория и практика совершенствования пород лошадей. Науч. труды ВНИИК, 1971, т. XXV: 123-127.
33. Avanzi B.R., Ramos R.S., Araujo G.H.M., Fioratti E.G., Trinca L.A., Dell'Aqua J.A. Jr., Meloe Ona C.M., Zahn F.S., Martin I., Alvarenga M.A., Papa F.O. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions? *Theriogenology*, 2015, 83(9): 1389-1393 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.007).
34. Меркурьева Е.К. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных. М., 1970: 226-237.

ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства,
391105 Россия, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Дивово,
e-mail: vniik08@mail.ru, Lebedeva-L18@yandex.ru

Поступила в редакцию
19 мая 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 4, pp. 476-485

MAIN FACTORS AFFECTING MARE INSEMINATION WITH CRYOPRESERVED DOMESTIC AND FOREIGN SPERM

L.F. Lebedeva, M.M. Atroshchenko, S.A. Burmistrova

All-Russian Research Institute for Horse Breeding, Divovo, Rybnoe Region, Ryazan Province, 391105 Russia,
e-mail vniik08@mail.ru, Lebedeva-L18@yandex.ru

Received May 19, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.476eng

Abstract

Artificial insemination (AI) has the following advantages over natural mating: fast selection effect, easy transportation, wide dissemination of valuable genetic material, economic use of semen and rational use of sires, preventing sexually transmitted infections, reserving sperm in cryobanks. Among the factors influencing the result of AI in horse breeding are time, frequency rate and insemination repetition, quality and quantity of semen, the depth of insertion of semen into the uterus

of a mare, the observance of temperature mode and sanitary regulations during AI procedure, the reproductive performance of mares. There are two main approaches to freezing of stallion sperm and thus two AI technologies for semen packaging and equipment for its introduction into the uterus of mares. The first approach worked out and used in Russia is based on a sparing mode of semen cryopreservation in large volumes, 20-25 ml per dose. The second method, developed abroad, provides pre-treatment of sperm by centrifugation and maximum removal of semen plasma. In another procedure currently used in Russia the small volumes (5-6 ml) of semen are cryopreserved after centrifugation, removal of 50-60 % of semen plasma and thickening semen by dialysis. In recent years frozen semen of stallions from Europe and America is being actively imported to Russia. Despite the technological differences, domestic and foreign approaches to the cryopreservation of stallion's semen provide its similar qualitative characteristics after thawing. The aim of our research was to identify the most significant factors affecting pregnancy rates in artificially inseminated mares when domestic and foreign protocols were used to freeze sperm. Herein, an impact of five such factors (i.e. sperm packing/cryopreservation technology, time of insemination, reproductive state and gynecological soundness of the mares, the activity of sperm) on the effectiveness of AI with frozen semen was estimated in mares of various breeds (Arabian, Akhal-Teke, Trakehner, Hanoverian, Russian Riding horse, American Standardbred, Russian Trotter and Orlov Trotter). Experiments were carried out in 2012 to 2014 at Tersk stud, at a private farm (Mr. A.A. Kazakov the owner) and at experimental stable of the All-Russian Research Institute for Horse Breeding. We compared the data on 106 estrus cycles of 53 mares, artificially inseminated with domestic (granules and tubes of 5 ml and 15-25 ml) and foreign frozen semen (0.5 ml in straws). All used sperm doses in various packages were divided into two groups with the activity above and below 1.5 points (15 %). The time recommended for AI with frozen semen was divided into three intervals (12 h before ovulation, during ovulation, 6 h after ovulation). The animals were conventionally grouped as barren and maiden mares, lactating mares, mares after late (6 or more months of pregnancy) abortion, and also with regard to absence or presence of gynecological pathologies such as vaginal discharge, fluid and air in the uterus, mating-induced endometritis. The effectiveness of artificial insemination was evaluated with regard to pregnancy rate, occurred abortions number and successful foaling. So, two of five factors analyzed were found out to determine reliably a successful AI with frozen semen at high significance level ($p < 0.001$). They were the sperm activity of ≥ 15 % and healthy mares with no pathology observed. Cryopreservation technology, the type of sperm doses' packaging and also the mare's reproductive status (i.e. barren, maiden, lactating or after late abortion) are of secondary importance. It is shown that mares' artificial insemination with one dose of semen during the 6-hour period after ovulation provides the same pregnancy rate (67.7 %) as insemination during the 12-hour period before ovulation (65.0 %) or insemination at the time when the ovum is released from a follicle.

Keywords: mare, sperm, cryopreservation, artificial insemination.



Научные собрания

АГРОРУСЬ 2015

МЕЖДУНАРОДНАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ
ВЫСТАВКА-ЯРМАРКА

Специализированные экспозиции. Деловая программа
(22-30 августа 2015 года, г. Москва)

Тематические разделы:

- Оборудование для переработки и хранения сельхозпродукции
- Научные разработки и технологии
- Сельскохозяйственная техника
- Продукты питания и напитки. Пищевые добавки
- Животноводство. Звероводство. Птицеводство
- Ветеринария. Зоотехния. Корма
- Удобрения. Семена. Рассада. Садово-огородный инвентарь. Теплицы
- Автономные энергетические и инженерные системы
- Поместно-усадебное домостроение, технологии и материалы
- АГРО/ЭКО туризм
- Развитие сельских территорий
- Оборудование для лесной промышленности
- Транспорт и логистика
- Образование в АПК

Контакты и информация: <http://agrorus.expoforum.ru>