

ФГБОУ ВО МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ –  
МВА ИМ. К.И. СКРЯБИНА

На правах рукописи

СУРОГИН МИХАИЛ ВИТАЛЬЕВИЧ

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСКУССТВЕННОГО  
ОСЕМЕНЕНИЯ СОБАК СВЕЖЕПОЛУЧЕННОЙ И  
ОХЛАЖДЕННОЙ СПЕРМОЙ**

Специальность 06.02.06. – Ветеринарное акушерство и  
биотехника репродукции животных

**ДИССЕРТАЦИЯ**

На соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук,

профессор ФЕДОТОВ С.В.

Москва, 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1. Особенности полового цикла у сук .....	10
1.2. Биологическая характеристика спермы собак и взаимодействие сперматозоидов с половым трактом сук .....	14
1.3. Методы выявления эструса у сук и оптимального времени оплодотворения .....	19
1.4. Искусственное осеменение собак свежеполученной и охлажденной спермой .....	26
1.5. Способы искусственного осеменения собак .....	34
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ .....	39
2.1. Изучение показателей качества свежеполученных эякулятов у кобелей немецкой овчарки .....	40
2.2. Анализ действия различных разбавителей на биологическую полноценность сперматозоидов, сохраняемых при 5°C .....	41
2.3. Изучение действия антибактериального препарата «Полиген» на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C .....	43
2.4. Анализ выживаемости сперматозоидов собак при добавлении в разбавитель гиалуроновой кислоты .....	43
2.5. Выяснения влияния на выживаемость сперматозоидов собак различных высокомолекулярных соединений в составе разбавителя спермы .....	44
2.6. Анализ протективного действия на охлажденную сперму собак антиоксидантных препаратов .....	46
2.7. Изучение протективного действия на сперму собак регуляторных пептидов .....	47
2.8. Изучение криозащитного влияния на сперматозоиды собак сухого соевого лецитина и желтка куриных яиц .....	48
2.9. Анализ подвижности и выживаемости сперматозоидов собак при хранении в различных средах при + 17°C .....	48
2.10. Изучение результативности искусственного осеменения собак свежеполученной и охлажденной спермой .....	49
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	51

3.1. Показатели качества свежеполученных эякулятов у кобелей немецкой овчарки.....	51
3.2. Изучение влияния различных разбавителей на биологическую полноценность сперматозоидов собак, сохраняемых при 5°C .....	53
3.3. Влияние различных веществ на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C .....	56
3.3.1. Анализ влияния антибактериального препарата «Полиген» на выживаемость сперматозоидов собак при 5°C .....	56
3.3.2. Выживаемость сперматозоидов собак при добавлении в состав среды гиалуроновой кислоты .....	58
3.3.3. Влияние на выживаемость сперматозоидов собак различных загустителей среды .....	60
3.3.4. Выяснение защитного действия на охлажденную сперму собак антиоксидантных препаратов.....	63
3.3.5 Влияние регуляторных пептидов на подвижность и выживаемость охлажденной спермы собак.....	68
3.3.6 Сравнительное изучение защитного действия на охлажденную сперму собак желтка куриного яйца и сухого соевого лецитина.....	71
3.4 Подвижность и выживаемость сперматозоидов собак в различных средах при 17°C .....	73
3.5 Результативность искусственного осеменения собак свежеполученной и охлажденной спермой.....	76
3.5.1. Эффективность искусственного осеменения собак свежеполученной спермой в связи с местом ее введения .....	76
3.5.2. Изучение оплодотворяемости сук охлажденной спермой при выявлении овуляции с помощью прогестеронового теста .....	79
3.5.3. Оплодотворяемость сук при вагинальном введении свежеполученного семени с помощью различных катетеров .....	80
4.ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	82
5.ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	91
6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	93
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	94

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Искусственное осеменение широко применяется в животноводстве для улучшения породных и продуктивных показателей и ускорения генетического прогресса в разводимых стадах.

Но данный метод еще недостаточно широко применяется в племенной работе в собаководстве, хотя в последние годы интерес к этой проблеме проявляется во многих странах мира. С помощью метода искусственного осеменения возможно предотвращать возникновение многих заболеваний, передающихся половым путем, так как в состав разбавителей спермы вводятся антибактериальные вещества.

Искусственное осеменение собак свежеполученным семенем может применяться в случае невозможности естественного осеменения в связи с различными физическими или поведенческими причинами. В последние годы все большей популярностью пользуется искусственное осеменение в кинологии с помощью охлажденного до 2-5 °C семени.

При этом появляется возможность проводить селекционную работу с использованием импортного семени без необходимости перевозки животных. Однако, при хранении охлаждённой спермы собак при данной температуре, удовлетворительные результаты осеменения достигаются при краткосрочном хранении спермы в течение 24-48 часов. Это связано с недостаточно высокими защитными свойствами синтетических разбавителей для хранения охлажденной спермы собак. Кроме того, на результативность осеменения влияют сроки осеменения собак по отношению к овуляции и место введения семени в половые пути самки. В связи с этим, необходимы дальнейшие исследования по совершенствованию

синтетических разбавителей для хранения спермы собак в охлажденном состоянии и усовершенствованию способов искусственного осеменения сук, а также определения оптимального времени их осеменения в течение эстрального периода.

**Цель и задачи исследований.** Целью данной работы является повышение защитных свойств синтетических разбавителей для хранения охлажденной спермы собак и улучшения результативности искусственного осеменения сук свежеполученной и сохраняемой при 5°C спермой.

Для достижения данной цели в диссертации были поставлены следующие задачи:

- определить биологические показатели эякулятов у кобелей породы «немецкой овчарки»;

- изучить влияние различных разбавителей на биологическую полноценность сперматозоидов собак, сохраняемых в охлажденном до 5°C состоянии;

- выяснить защитное влияние некоторых биологически активных веществ на выживаемость сперматозоидов при 5°C;

- провести сравнительный анализ влияния сухого соевого лецитина и желтка куриных яиц на выживаемость охлажденной спермы собак;

- исследовать выживаемость сперматозоидов собак при 17°C в различных разбавителях;

- определить эффективность искусственного осеменения собак свежеполученной и охлажденной спермой при ее влагалищном или внутриматочном введении;

-оценить эффективность искусственного осеменения сук при использовании различных катетеров;

- выяснить результативность осеменения сук в зависимости от срока осеменения по отношению к овуляции.

**Научная новизна исследований.** Впервые проведено сравнительное изучение хранения охлажденной спермы кобелей при 5°C в трис-фруктозо-лимоннокислом и молочном разбавителях. Изучены показатели качества полноценных эякулятов у кобелей немецкой овчарки. Проведены комплексные исследования по изучению влияния ряда антиоксидантов и других биологически активных веществ на устойчивость сперматозоидов собак к хранению при 5°C. Выявлено защитное влияние сухого соевого лецитина при хранении охлажденной спермы собак. Изучена эффективность хранения спермы собак при 17°C. Выяснена результативность искусственного осеменения собак свежеполученной и охлажденной спермой при ее влагалищном и внутриматочном введении. Проанализирована эффективность искусственного осеменения собак при влагалищном введении семени с помощью различных катетеров и в связи с периодом овуляции.

**Практическая значимость.** Введение в состав трис-фруктозо-лимоннокислой среды 0,08 мг/мл цистеина способствует значительному повышению подвижности и выживаемости сперматозоидов собак, сохраняемых при 5°C. Добавление в состав разбавителя 4-5% сухого соевого лецитина способствует улучшению подвижности и выживаемости охлажденной спермы собак и позволяет исключить использование желтка куриных яиц в составе синтетической среды. Внутриматочное введение свежеполученного и охлажденного семени с помощью норвежского катетера позволяет повысить результативность осеменения собак. Использование

прогестеронового теста для выявления овуляции у сук способствует улучшению их оплодотворяемости при влагалищном осеменении.

**Методология и методы исследования.** Методология исследований базировалась на результатах, полученных отечественными и зарубежными учеными в области совершенствования методов искусственного осеменения собак и повышения их эффективности. В ходе работы использовались общие и специальные методы научного познания. Из общих методов применялись эмпирические методы:

- моделирование, наблюдение, сравнение, измерение, эксперимент;
- инструментальные методы и др.

Биометрическая обработка статистических данных проводилась статистическими и математическими методами, представленными в пакете «Анализ данных» MSOfficeExel.

### **Положения, выносимые на защиту**

- трис-фруктозо-лимоннокислый разбавитель способствует лучшей защите биологической полноценности сперматозоидов собак по сравнению с молочным разбавителем при хранении спермы в охлажденном до 5°C состоянии;
- сухой соевый лецитин в концентрации 4-5% обладает высокими защитными свойствами при хранении спермы собак в охлажденном состоянии;
- добавление цистеина в состав разбавителя в оптимальной концентрации повышает подвижность и выживаемость спермы;

- внутриматочное осеменение собак свежеполученной и охлажденной спермой повышает результативность искусственного осеменения и многоплодия сук.

### **Публикации по результатам исследования**

По теме диссертации опубликовано 5 статей, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, результатов, обсуждения выводов, практических предложений и списка литературы.

Работа изложена на 111 страницах машинописного текста, включает 19 таблиц. Список литературы включает 163 источника, из них 112 иностранных.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность экспериментальных данных подтверждена биометрической обработкой. Основные результаты и положения диссертации доложены на:

- международной научно-практической конференции «Инновационные внедрения в области сельскохозяйственных наук», Федеральный центр науки и образования «Эвенсис», 25.01.2017г.
- VIII международной научно-практической конференции «Повышение конкурентоспособности племенного животноводства и



кормопроизводства в современной России», Тверская государственная сельскохозяйственная академия, 14 - 16 февраля 20017 г;

- международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития современной репродуктивной криобиологии, и ее роль в развитии животноводства», ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 25 – 27 апреля 2017 г.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Особенности полового цикла у сук

Собаки являются моно-эстричными животными, у которых овуляция происходит спонтанно во время эструса, который наступает с интервалом в 5-12 месяцев. Поэтому суки обычно щенятся 1-2 раза в год (Дюльгер Г.П., 2002; Федотов С.В. и др., 2014; Stabendeldt G.H., Shille V.M., 1977). У сук отмечается продолжительный анэструс на протяжении 3-8 месяцев, после чего наступает фолликулярная фаза полового цикла, продолжающаяся в течение 1 - 3-х недель. В это время повышается секреция яичниками эстрогенов, которые способствуют увеличению размеров матки и кровотечению из вульвы. Эта стадия полового цикла называется проэструсом и продолжается в течение 1-2 недель. Максимальное повышение концентрации эстрадиола и увеличение уровня прогестерона в крови происходит вследствие лютеинизации предовуляторных фолликулов (Concannon P.W., 1998). Все это способствует началу эструса у сук, который продолжается в среднем 7-8 дней. После этой фазы наступает метаэструс.

Как и у других видов животных, эструс является периодом, во время которого сука допускает садку самца и овуляция у них наблюдается через 1-2 дня после начала поведенческих реакций, характеризующих наступление эструса (Holst P.A., Phemister R.D., 1971).

По данным Smith M.S. и MacDonald L.E. (1971), овуляция у собак в большинстве случаев наступает через 24 часа после максимального увеличения в крови концентрации лютеинизирующего гормона.

Исследования с помощью ультразвукового сканирования показали, что через 24-72 часа после пика лютеинизирующего гормона в крови, овулировало 77% фолликулов, а через 96 часов отмечалась овуляция почти 94% фолликулов (Wildt D.E., 1978; England G.C., Yeager A.E., 1993).

В исследованиях Concannon P. (1971) было показано, что овуляция у собак наступала через 38-44 часа после пика ЛГ в крови.

Биологической особенностью полового цикла собак является то, что в отличие от других видов животных, у которых созревание ооцитов происходит до овуляции, у сук овулируют не дозревшие фолликулы и затем в течение 2-3 дней отмечается первое мейотическое деление, а в течение 3-5 последующих дней - наступает второе мейотическое деление. И только после этого ооциты становятся готовыми к оплодотворению (Holst P.A., Phemister R.D., 1971).

Овулировавшие яйцеклетки могут сохранять биологическую полноценность в половых путях сук в течение 7-9 дней (England G.C., 1989; Tsutsui T.L., 1989).

Концентрация прогестерона за 24 часа до овуляции увеличивается в крови самок до 2 нг/мл (Yeager A.E., Concannon P., 1990).

В течении лютеальной фазы отмечается нарастание концентрации прогестерона в крови до 15-25 дня цикла и затем отмечается постепенное снижение уровня гормона до 55-65 дня, когда происходит регрессия желтого тела (Concannon P., 1986). После снижения концентрации прогестерона менее 1 нг/мл, происходит окончание фазы метэструса и начинается фаза анэструса.

В отличии от других видов домашних животных, у сук продолжительность лютеиновой фазы практически одинакова как у беременных, так и не беременных самок (Siegel E.T., 1982).

Продолжительность беременности у сук составляет 62-66 дней. Бластоцисты поступают из яйцеводов в матку на 9-12-й день после оплодотворения и имплантация заканчивается к 20-21-му дню беременности (Thatcher M.E., 1994).

Желтые тела являются главными источниками секреции прогестерона в течении беременности собак и прогестерон является лютеотропным фактором у этого вида животных (Дюльгер Г.П., 2002; Concannon P., 1993).

Эмбрионы могут мигрировать из одного рога в другой (Noden D., Delahunta A., 1984). Клинически беременность у сук может быть диагностирована с помощью пальпации между 20 и 35 днями беременности. А с помощью ультразвука выявляется после 25 дня, когда отмечается начало сердцебиения у плода.

Лютеиновая фаза у собак во время беременности характеризуется первоначальным пиком концентрации циркулирующего прогестерона, который отмечается между 15 и 25 днями беременности. Вторичное увеличение концентрации прогестерона отмечается между 25 и 40 днями беременности. В течении 24 часов до родов, концентрация прогестерона в крови резко снижается до 2 нг/мл. Начиная с 30-35 дня беременности, в крови сук повышается концентрация пролактина, а с 40-50 дня – увеличивается уровень релаксина (Steinetz B.C., e.a., 1996; Shille V., 1989).

Для поддержки нормального функционирования желтого тела во время беременности необходима соответствующая концентрация лютеинизирующего гормона и пролактина в крови (Concannon P., 1993).

Продолжительность родовой деятельности у сук в среднем составляет 4-12 часов (Concannon P., Verstegen J., 1999).

Средняя неонатальная смертность молодняка у собак может достигать 15-25% (Vander Weyden G.I.e.a., 1989).

В настоящее время факторы, регулирующие продолжительность анэструса у сук, выяснены в недостаточной степени (Linde-Forsberg C., Wallen A., 1992).

Одним из биологических регуляторов половой цикличности у собак является фотопериод (Concannon P., 1993).

Изменения уровня активности различных гормонов в крови также влияет на продолжительность анэструса.

Важным фактором является и концентрация в крови гормона пролактина. Также во время анэструса у сук в крови выявляются низкие концентрации фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Увеличение частоты пульсаций в крови ЛГ регулируется секрецией гонадотропного релизинг-гормона в гипоталамусе и при этом отмечается стимуляция активности яичников (Verstegen J., 1997).

Во время анэструса не выявляется наличие эстрадиола в крови у сук (Jeffcoate J.A., 1993).

Фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны играют ключевую роль в индукции фолликулогенеза и овуляции у животных. Главным регулятором секреции ФСГ и ЛГ является гонадотропный релизинг-гормон, секретируемый в супрахиазматическом ядре гипоталамуса (Лысов В.Ф. и др., 2008).

В период позднего анэструса у сук увеличивается секреция и выделение гонадотропного релизинг-гормона из гипоталамуса, а в ответ усиливается секреция и выделение гонадотропных гормонов из гипофиза (Tani H. e.a., 1996).

Увеличение в циркулирующей крови концентрации ФСГ является важнейшим моментом для фолликулогенеза в яичниках, особенно на ранней стадии фолликулогенеза, а увеличение концентрации ЛГ играет значительную регулирующую роль в

развитии фолликулов на более поздней стадии полового цикла (Moyle W.R., Campbell R.K., 1995; Monniaux D.I., e.a., 1997).

По данным Monniaux D.I., e.a. (1997) одним из главных эффектов ФСГ является его стимулирующее влияние на синтез ЛГ-рецепторов в клетках гранулезы. Хотя пульсация ФСГ в крови у сук происходит в соответствии с пульсацией ЛГ на протяжении эстрального цикла и анэструса, имеются и различающиеся регулирующие механизмы секреции этих гормонов в период овуляции и оплодотворения (Kooistra H.S. e.a., 1999).

Различия в секреции ФСГ и ЛГ могут регулироваться под действием частоты и амплитуды выделения гонадотропного релизинг-гормона из гипоталамуса (Vizcarra J.A. e.a., 1997).

В дополнение к увеличению секреции Гн-РГ и повышению концентрации ФСГ в крови сук, также и другие факторы оказывают влияние на индукцию фолликулогенеза и окончание анэстральной фазы. Так, у некоторых сук отмечается усиление пульсообразного выброса ЛГ в кровь из гипофиза перед началом проэструса (Beijerink N.J., e.a., 2004).

Концентрация эстрадиола обычно очень низкая в крови у сук в течении анэструса и не отмечается увеличения концентрации этого гормона до начала увеличения секреции ЛГ. Также не изменяется экспрессия рецепторов ФСГ в течении анэструса у собак (McBride M.W. e.a., 2001).

## **1.2. Биологическая характеристика спермы собак и взаимодействие сперматозоидов с половым трактом сук**

Как известно, эякулят у собак состоит из трех фракций (Linde – Forsberg C., 1995; Ерохин А.С., Квичко И.Л., 1998; Дюльгер Г.П.,

2002). В состав первой фракции входят секреты уретральных желез и продолжительность ее составляет 0,5 – 1 минута, а объем составляет 1-5 мл, в зависимости от размера собак. Вторая фракция по объему составляет 1-3 мл и состоит в основном из сперматозоидов. Продолжительность этой фазы составляет 1-2 минуты. Объем третьей фракции может достигать 10-30 мл иона состоит из секретов предстательной железы. Эта фаза по длительности колеблется от 5 до 30 минут.

Средний объём эякулята у собак массой 10-34 кг составляет 2,4 мл; 35-39 кг – 3,9 мл и у собак с массой 60-84 кг – 5,4 мл (Amann R.P., 1986). При этом средняя концентрация сперматозоидов в эякуляте достигает, соответственно, 209; 359 и 228 млн/мл.

По результатам исследований других авторов средний объем эякулята у кобелей находится в пределах 5-10 мл, а концентрация сперматозоидов – 62-300 млн/мл (Stockner P.K. e.a., 1991; Weitze K.F., 1991).

По данным Милованова В.К. (1962) размеры сперматозоидов у собак составляют: длина головки – 6,5 микрон, ширина головки – 4 микрона, общая длина со жгутиком – 55-65 микрон.

Нормальная подвижность сперматозоидов в эякуляте собак колеблется в пределах 75-85%, а число морфологически полноценных клеток достигает 80-90% (Boucher J.H. e.a., 1991; Rota A.E. e.a., 1995).

Количество сперматозоидов с морфологическими нарушениями в среднем составляет 10-35% (Stochner P.K. e.a., 1991).

Удельный вес спермы кобелей составляет 1,1, а pH – 6,7 – 6,8 (Милованов В.К., 1962).

Осмолярность семени собак находится в пределах 320 мосм (Rota A. e.a., 1995).

По сравнению с другими видами сельскохозяйственных животных, в эякуляте собак содержится наибольшее количество воды (97,6%) и наименьшее сухого вещества – 2,4 % (Mann T., 1964).

У кобелей в сперме практически отсутствует фруктоза, лимонная кислота и сорбитол, что согласуется с данными об отсутствии семенных пузырьков у этого вида животных (King T.E., Mann T., 1959). Так, в сперме собак уровень фруктозы составляет менее 1 мг/100 мл, а у баранов и быков содержится, соответственно, 150 и 120 мг фруктозы на 100 мл.

В сперме собак обнаружен повышенный уровень кальция по сравнению со спермой быков и баранов (Tash J.S., Means A.R., 1983).

Но сперма собак способна к расщеплению и усвоению фруктозы (Bartlett D., 1962). Например, процент увеличения уровня дыхания при добавлении глюкозы к отмытым от плазмы сперматозоидам составлял – 119%, а при добавлении фруктозы – 206%.

У кобелей имеется хорошо развитая простата и ее секрет содержит высокий уровень протеолитических ферментов, таких, как фосфатазы и глюкоронидазы (Mann T., 1964).

В сперме собак также выявлена повышенная активность альфаманнозидазы и бета-ацетилглюкозаминидазы (Conchile J., Mann T., 1957).

Кроме того, в сперме кобелей присутствует липолитический фермент – монобутираза, а также ферменты фенолоксидаза, пероксидаза и каталаза (Иванов И.И., Андреев Н.Н., 1916).

В отличие от спермы баранов и быков, в сперме собак практически отсутствует глицерофосфорил-холин (Mann T., 1964).

По данным Ерохина А.С. (2004) в сперме собак отсутствует один из антиоксидантных ферментов – глутатионредуктаза. И главным антиокислительным ферментом в сперме этого вида животных является супероксиддисмутаза.



Исследования Darin – Bennet A. e.a. (1973) показали, что в фосфолипидной фракции сперматозоидов собак содержится большое количество фосфатидил-этаноламина, сфингомиелина и этаноламинплазмалогена. Среди жирных кислот преобладают пальмитиновая и докозапентаеновая кислоты.

У сперматозоидов собак, в отличие от других видов сельскохозяйственных животных, не наблюдается инфлюкс ионов кальция внутрь половых клеток после криовоздействия (Quinn P.J., White I.G., 1966).

Сперматозоиды собак имеют более высокую подвижность и скорость движения по сравнению с другими видами животных (England G.C., Allen W.E., 1992).

Половые клетки собак характеризуются повышенной способностью к гиперактивации подвижности, что очень важно для успешного их проникновения к месту оплодотворения и связывания с зоной пеллюцида яйцеклетки (Suarez S.S., 1996).

Сперматозоиды собак способны к длительной выживаемости в половом тракте суки (Doak R.L. e.a., 1967). Так, подвижные сперматозоиды обнаруживаются в матке и яйцеводах у сук через 4-6 дней после спаривания.

В настоящее время имеется ограниченное число исследований, посвященных транспорту сперматозоидов в половых путях сук. Имеются данные, что сперматозоиды собак после коитуса быстро проникают к месту оплодотворения.

Эксперименты с фистулой в матке показали, что сперматозоиды были обнаружены в матке уже через 11-20 минут после спаривания (Amantea G., 1924; Whitney L.F., 1927).

Особенностью сук является длинное влагалище по сравнению с другими домашними животными. Пенис кобеля не может проникнуть через цервикальный канал суки (Pineda M. e.a., 1973).

Цервикальный канал у сук открывается уже через 3 дня после начала проэструса и находится в таком состоянии до 14-го дня эстрального цикла (Allen W.E., France C., 1985).

В более поздних исследованиях процесс раскрытия шейки у сук изучали с помощью инфузии контрастной среды (Silva L.D. e.a., 1995). Этими авторами установлено, что открытие цервикального канала происходит приблизительно за 2 дня до пика лютеинизирующего гормона в крови сук и он закрывается примерно через 7 дней после пика этого гормона. Причем, у всех этих сук был выявлен эструс согласно цитологическим исследованиям, когда цервикальный канал был уже закрыт. В дальнейшем было показано, что хирургическое внутриматочное осеменение сук уже после того, как цервикальный канал закрыт, способствовало наступлению оплодотворяемости. Это подтверждает, что овоциты остаются еще способными к оплодотворению после закрытия шейки матки.

В опытах японских исследователей было установлено отсутствие транспорта сперматозоидов в матку сук в позднюю стадию эструса, что подтверждает данные о закрытии шейки матки в этот период (Tsutsui T. e.a., 1989).

Имеются данные, что у сук специальные железы в матке могут являться своеобразным резервуаром для хранения сперматозоидов, из которого они медленно выделяются в течении определенного периода времени (Doak R.L. e.a., 1969).

Также резервуаром для хранения сперматозоидов является маточно-яйцеводное сочленение, где сперматозоиды связываются с эпителиальными клетками и в таком виде хранятся в матке сук определенное время (Ellington J.E. e.a., 1995).

В механизме капацитации сперматозоидов в половом тракте суки большую роль играют изменения внутриклеточного уровня

ионов кальция (Hewitt D.A., England G. C., 1997). Также большое значение при этом имеет повышение концентрации бикарбоната.

Процесс капацитации индуцируется при взаимодействии сперматозоидов собак с эпителиальными клетками в половом тракте самки (Harrison R.A., 1996).

Это подтверждается тем, что у сперматозоидов собак процесс капацитации ускорялся при добавлении в среду инкубации жидкости, полученной из яйцеводов (Kawakami E. e.a., 1998).

Также данная реакция активируется при добавлении зоны пеллюцида в инкубационную среду (Kawakami E. e.a., 1993).

### **1.3. Методы выявления эструса у сук и оптимального времени оплодотворения**

Получение хороших результатов оплодотворяемости сук при естественном и искусственном осеменении в большой мере зависит от правильного выбора времени осеменения. Хотя имеется много исследований по выяснению взаимосвязи между поведенческими реакциями, гормональными и физиологическими изменениями у сук, до сих пор продолжаются исследования в области выяснения оптимального времени их осеменения. Суки имеют довольно продолжительную фолликулярную фазу цикла и значительные вариации в поведенческих реакциях относительно периода эструса, что затрудняет определение точного времени предовуляторного выброса ЛГ в кровь и начало процесса овуляции (Linde – Forsberg C., 1991). Кроме того, у сук происходит овуляция незрелых ооцитов (первичных ооцитов) и дальнейшее их созревание в яйцеводах происходит в течении 96-108 часов (Tsutsui T. e.a., 2009). После этого

созревания ооциты сохраняют способность к оплодотворению в течении 24-48 часов (Tsutsui T., 1989).

Поэтому очень трудно выбрать время оптимального оплодотворения сук в связи с овуляцией.

Наиболее распространенным методом выявления эструса и овуляции у сук является анализ вагинальной цитологии и определение концентрации прогестерона в крови (Linde – Forsberg C., 1991). Также, в последнее время применяется вагиноскопия, вагинальная эндоскопия и ультразвуковое сканирование (Hewitt D, England G, 2000; Fontbonne A., Malandain E., 2006; Levy X., 2007).

Эта оценка должна проводиться с 2-3-х дневным интервалом. При вагинальной цитологии анализируют в мазке изменение формы эпителиальных клеток влагалища, обусловленное воздействием эстрогенов и их превращение из маленьких круглых, с ясно видимой цитоплазмой, в большие ороговевшие угловатой формы клетки с маленьким пикнотическим ядром в период начала эструса. Как известно, проэструс у сук начинается с набухания вульвы и появления кровянистых выделений. В мазке при этом преобладают эритроциты и не ороговевшие вагинальные эпителиальные клетки, а также встречаются в поле зрения лейкоциты (Hooper B.E, e.a., 1961). По мере развития проэструса, эпителиальные клетки все больше карнифицируются. В период продолжения эструса в мазке отмечается увеличение таких клеток и индекс карнификации достигает более 70 %. В этот период начинают брать кровь у сук для определения концентрации прогестерона и выявления его пика свыше 2-3 нг/мл. Этот показатель концентрации прогестерона коррелирует положительно с предовуляторным увеличением в крови лютеинизирующего гормона, после чего овуляция наблюдается через 48 часов. На день овуляции (день “0” полового цикла) концентрация прогестерона может варьировать от 4 до 10 нг/мл. Резкое увеличение в

мазке количества округлых клеток и появление между ними нейтрофилов свидетельствует о начале диэструса (Fontbonne A., Malandain E, 2006).

Вагинальная цитология позволяет более правильно выбрать время при естественном осеменении, но не при искусственном осеменении.

Эструс обычно оканчивается через 36-48 часов после появления нейтрофилов в мазке.

Уровень прогестерона начинают определять в крови через 4-6 дней после начала проэструса (Мохон Р. е.а, 2010). Если концентрация этого гормона в крови менее 2 нг/мл, то забор крови продолжают еще с интервалом 3-4 дня до тех пор, пока не обнаружится увеличение уровня прогестерона.

По данным Holst P.A. и Premister R.D. (1971) нормальная оплодотворяемость сук отмечалась при естественной случке у собак породы бигль между 3 и 10 днем начала диэструса, выявленного с помощью вагинальной цитологии.

По мнению ряда исследователей, пока не установлена прямая зависимость между изменениями вагинальной цитологии и концентрацией прогестерона у сук во время эструса, но они индуцируются эстрогенами и связаны по времени (Farstad W., 1984).

Концентрация предовуляторного пика ЛГ в крови сук составляет 8-15 нг/мл и может варьировать в пределах 15-90 нг/мл (Nett T.M. е.а., 1975; Concannon P.W., 2000). Этот пик обычно наблюдается через 1-3 дня после пика концентрации эстрадиола в крови. Предовуляторная концентрация ЛГ в крови обычно в 10-100 раз больше, чем в период анэструса. Начало эстрального поведения сук часто совпадает с пиком лютеинизирующего гормона в крови, но может начинаться позднее этого на 1-4 дня и в некоторых случаях даже не проявляется, несмотря на нормальный гормональный фон и

последующую овуляцию. По данным этих авторов, овуляция у сук наблюдается через 48-60 часов после преовуляторного выброса лютеинизирующего гормона. Данное увеличение ЛГ в крови индуцирует увеличение синтеза прогестерона в фолликулах и является сигналом для начала созревания ооцитов и их овуляции.

Эти результаты подтверждаются и другими исследователями (Phemister R.D. e.a., 1973). По их данным овуляция происходила через 2 дня после пика ЛГ в крови сук. У большинства собак овуляция наблюдалась на 2-й и 3-й день от начала эструса.

По мнению Greene G.M. (2004), концентрация прогестерона в начале эструса остается на низком уровне (0-2 нг/мл), затем возрастает до концентрации 2,0 – 2,9 нг/мл во время выброса предовуляторного пика лютеинизирующего гормона, и увеличивается до 4-8 нг/мл в день наступления овуляции. Через 48 часов после выброса ЛГ и после овуляции показатель прогестерона может быть выше 25нг/мл. Поэтому этот автор считает, что оптимальным сроком осеменения сук свежим и охлажденным семенем является первичное осеменение через 2 дня после овуляции и повторное осеменение следует проводить на 3-4-й день после овуляции.

В опытах голландских исследователей было подтверждено, что оплодотворяемость сук заметно повышается при их естественном осеменении, после определения оптимальной концентрации прогестерона в крови (Van Naaften B. e.a., 1989). Причем, оптимальное время осеменения сук они выбирали путем 3-х кратного определения концентрации прогестерона в течении недели, после выявления кровянистых выделений из вульвы. При однократной вязке беременность наступила у 84% самок, а при 2-х кратной - у 88% сук.

Интересные эксперименты по определению времени овуляции у сук породы бигль в связи с периодом начала проэструса были проведены японскими исследователями (Nogi T. e.a., 2012). При этом

было установлено, что у 7,7% сук (30 собак) овуляция отмечалась на 3-7 день после начала проэструса (начало кровянистых выделений), у 82,8% самок (323 суки) – на 8-14 день и у 9,5% животных (37 сук) – овуляция отмечалась на 15-31 день от начала проэструса. Средний промежуток от начала проэструса до овуляции составил 11,1 дня с вариациями от 3 до 31 дня.

Полуколичественный иммуноферментный метод определения прогестерона довольно часто используется в клинической практике, но его недостатком является не очень высокая точность (Мохон Р. е.а., 2010). При использовании этого метода концентрация прогестерона определяется по цветовой шкале с довольно широким разбросом показателя. Нередко в этом случае показатель концентрации прогестерона завышается по сравнению с радиоиммунологическим методом определения и осеменение может проводиться гораздо раньше оптимального периода.

Более точным методом выявления овуляции является определение прогестерона в крови сук с помощью количественного радио - или хемилюминисцентного анализа в специальной лаборатории.

Несмотря на то, что ультразвуковое исследование широко применяется у разных видов сельскохозяйственных животных с целью определения овуляции, у сук определенная часть жира аккумулируется в яичниковой бурсе и закрывает яичник, что затрудняет ультразвуковое их исследование. Кроме того, фолликулы в яичниках сук слабо различаются между собой в пред-и после овуляторный период (Wallis S.S. е.а.,1992). Поэтому данный метод пока используется в экспериментальных исследованиях. Кроме того, данный способ затруднен при использовании у крупных пород собак и ожиревших животных.

Также в кинологии может применяться вагинальная эндоскопия для определения оптимального времени осеменения, но при этом методе нельзя точно определить время овуляции и кроме того, он требует дорогостоящего оборудования. Физиологические изменения концентрации в крови у самок эстрогенов и прогестерона приводят к специфическим морфологическим изменениям влагалищной слизи. Анализ этих изменений позволяет определить стадию эстрального цикла и определить оптимальное время для осеменения (Goodman M., 2001; Lindsay F.E., 1983; Jeffcoate I.A., Lindsay F.E., 1989;). В этом случае исследуется краниальный участок влагалища. Для вагиноскопии используется ригидный эндоскоп 3-4 мм в диаметре и длиной 30-33 см. Исследования проводятся на животном в стоячем положении без предварительного использования седативных препаратов. В течении проэструса в крови сук увеличивается концентрация эстрогенов и в результате образуется вагинальная слизь. Эта слизь имеет розовый цвет и гладкую поверхность. Нормальные кровяные выделения также видимы при данном анализе. Просвет вагины узкий. В последний день проэструса и в начале эструса снижается концентрация эстрогенов и увеличивается уровень прогестерона в крови. В результате этого уменьшается вагинальная складчатость. Формирующаяся слизь становится морщинистой и дряблой. Вагинальный просвет еще более уменьшается. Максимальная дряблость вагинальной слизи наблюдается между 3 и 8-м днями эструса. В это время уменьшается выделение жидкости из вагинальной слизи. Во время диэструса вагинальный просвет имеет ровную поверхность и слизь имеет красный оттенок.

Другим методом оценки стадии эстрального цикла у сук является анализ влагалищной жидкости, полученной из краниального участка (England G.C., Allen W.E., 1989). Для этого стерильной осеменительной пипеткой с помощью шприца получают жидкость из



краниального участка влагалища. После чего приготавливают мазок и анализируют кристаллизацию под микроскопом. У сук выявлены особенности кристаллизации этой жидкости в период проэструса и эструса, сходные с изменениями цервикальной слизи у жвачных животных. Но данный метод анализа лучше сочетать с изучением вагинальной цитологии. Также изучались особенности кристаллизации слюны у собак в различные периоды полового цикла (Pardo – Carmona B. e.a., 2010). Но при этом не было обнаружено взаимосвязи каких-то особенностей кристаллизации с периодом овуляции у собак.

Не было выявлено достоверных корреляционных связей и между электрическим сопротивлением слизистой влагалища у сук и овуляцией.

В кинологии очень важно более точно осеменять сук по отношению к периоду овуляции при искусственном осеменении как свежей, так и охлаждённой и криоконсервированной спермой. Это важно в связи с тем, что выживаемость охлажденной и замороженно-оттаянной спермы гораздо ниже, чем при использовании свежеполученной спермы.

При использовании свежей или охлажденной спермы осеменение должно проводиться в день овуляции и осеменение повторяется через 2 дня (Linde-Forsberg C., 1991; Ерохин А.С., Квичко И.Л., 1998; Дюльгер Г.П., 2002)

При осеменении сук двукратно в течении эструса на 3 и 5 день после предовуляторного выброса ЛГ, с использованием свежего семени оценилось 78% сук (Nizanskiw, Klimowicz M., 2005).

#### **1.4. Искусственное осеменение собак свежеполученной и охлажденной спермой**

Искусственное осеменение в кинологии вызывает большой интерес во многих странах мира.

Широкое распространение оно нашло в Швеции, Америке, Дании, Канаде, Англии и ряде других стран (Дюльгер Г.П., 2002; Brian B., 1986; Christianses J., 1990; Brown R., 1992; Jalkanen J., 1994; Linde – Forsberg C., 1995).

Использование охлажденной и замороженной спермы позволяет перевозить ее на большие расстояния и облегчает проведение селекционно-племенной работы в собаководстве.

С помощью искусственного осеменения становится возможным снизить уровень распространения различных заболеваний, передающихся половым путем, так как в состав спермы при этом добавляются различные антибактериальные препараты (Morton D.B., 1986).

Искусственное осеменение может оказаться полезным в случае не возможности естественного спаривания собак в результате ряда причин: заболевание конечностей, агрессивное поведение, различия в размере собак и т.д. (Brown R., 1992).

Эстральный период у сук гораздо длительнее, чем у животных других видов и поэтому требуется более тщательный выбор времени осеменения, когда оплодотворяемость ооцитов может быть более высокой.

Как известно, половой цикл у сук подразделяется на несколько стадий: проэструс, эструс, метэструс или диэструс и анэструс (Olson P.N. e.a., 1986).

Продолжительность проэструса в среднем достигает 9 дней. В этот период у сук отмечаются кровянистые выделения из вульвы. Они проявляют интерес к кобелю на этой стадии, но не допускают вязки. Период эструса в среднем продолжается в течении девяти дней, и в этот период суки допускают вязку с кобелем (Inaba T. e.a., 1984). Длительность диэструса составляет 2 месяца, а анэструса – 2-9 месяцев.

Так как выживаемость сперматозоидов собак, сохраняемых в охлажденном до 2-4°C состоянии снижается в половых путях самки по сравнению со свежеполученной спермой, то проводить искусственное осеменение сук необходимо в период оптимальной для оплодотворения ооцитов (Morton D.V., Bruce S.G., 1989).

С целью более надежного выбора срока осеменения сук предлагается определять время овуляции по содержанию лютеинизирующего гормона в плазме крови (Jeffcoate J.A., Lindsay F.E., 1989). У большинства сук овуляция наступает через 24-72 часа после предовуляторного пика ЛГ в крови.

По мнению других исследователей, вместо пика ЛГ можно определять сроки овуляции у сук по изменению концентрации прогестерона в плазме крови. При этом, повышение концентрации прогестерона в крови до 8 нг/мл совпадает с овуляторным пиком ЛГ в крови (Concannon P.W. e.a., 1989).

С целью дальнейшего совершенствования методов искусственного осеменения сук охлажденной спермой необходимо более глубокое изучение причин и механизмов повреждений сперматозоидов при хранении в охлажденном до плюсовых температур состоянии.

Ранее было установлено, что при быстром охлаждении сперматозоидов животных от температуры тела до 2-4°C происходит

температурный шок или холодовой удар (Милованов В.К., 1962; Осташко Ф.И., 1978).

Этот факт был обнаружен при охлаждении сперматозоидов различных видов животных (Кузнецова Н.А., 1932; Скаткин П.Н., 1940). При холодовом ударе нарушается подвижность сперматозоидов и появляются морфологические повреждения в жгутиках и мембранах сперматозоидов.

Согласно теории, предложенной Миловановым В.К. (1962), повреждения в сперматозоидах при холодовом шоке происходят в результате затвердевания фосфолипидного компонента плазматических мембран – плазмологена.

По мнению Осташко Ф.И. (1978), холодовой шок является причиной нарушения осмотических процессов в клетке. В процессе охлаждения спермы, половые клетки имеют более высокую температуру по сравнению с окружающей средой. Это приводит к более высокому внутриклеточному осмотическому давлению по сравнению с внешней средой. В сперматозоидах при этом могут наблюдаться деструктивные изменения в клеточных мембранах под действием гипотонии.

Кроме того, быстрое охлаждение вызывает разобщение дыхания и фосфорилирования в клетках, а также усиливает катионную проницаемость мембран (Ленинджер А., 1966; Белоус А.М. и др., 1987).

Хранение спермы в охлажденном состоянии может также способствовать утечке из клеток ряда важных внутриклеточных ферментов (Курбатов А.Д. и др., 1988).

В частности, отмечен выход в инкубационную среду внутриклеточных антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы при хранении охлажденной спермы разных видов животных (Ерохин А.С. и др., 1995; Ерохин А.С. и др., 1996).

Переход липидов клеточной мембраны из жидкокристаллического состояния в гелевую фазу является начальным механизмом всех остальных биоповреждений клеток при охлаждении (Белоус А.М. и др., 1978).

Доказано, что

липидов, температура фазового перехода понижается, что позволяет мембране функционировать в области пониженных температур (Пушкарь Н.С. и др., 1984).

Сравнительное изучение липидного состава сперматозоидов собак показало, что они содержат повышенный уровень фосфатидилэтаноламина и полиненасыщенной докозаэнтаеновой кислоты, что способствует большей устойчивости их половых клеток холодовому шоку (Darin – Bennet A. e.a., 1977).

Также в сперматозоидах собак, в отличие от других видов животных, не отмечается инфлюкс ионов кальция внутрь клеток после криовоздействия (White I.G., 1993). Этот факт также способствует большей устойчивости сперматозоидов собак к холодовому шоку.

Изучение концентрации АТФ в сперматозоидах собак до и после холодового шока, показало их довольно высокую устойчивость к низкотемпературному шоку (Ерохин А.С. и др., 1999).

Как известно эякулят у собак состоит из трех фракций (Linde – Forsberg C., 1995). Сперму у собак получают с помощью искусственной вагины или мануального массажа. При этом обычно получают только первую и вторую фракцию эякулята, содержащую высокую концентрацию сперматозоидов.

Средний объем эякулята у собак составляет 5-10 мл, а концентрация сперматозоидов колеблется от 50 до 350 млн/мл (Amann R.P., 1986; Stockner P.K. e.a., 1990).

В полноценных эякулятах собак подвижность сперматозоидов составляет 70-85%, а количество морфологически нормальных сперматозоидов достигает 80-90% (Stockner P.K. e.a., 1991).

Сперму в половые пути суки вводят с помощью одноразового шприца, к которому присоединяется полистироловая пипетка для искусственного осеменения коров и телок или с помощью специальных катетеров (Linde – Forsberg C.e.a., 1989). При этом сперматозоиды уже через несколько минут попадают в яйцеводы.

Результативность искусственного осеменения собак свежей и охлаждённой спермой зависит от количества сперматозоидов в дозе для осеменения (Olar T.T. e.a., 1989; Linde – Forsberg C., 1995).

По данным японских исследователей, при влагалищном введении сукам свежеполученной спермы с концентрацией в дозе 200; 100; 50 или 25 млн сперматозоидов оплодотворяемость составила: 89; 33; 46 и 0%, соответственно (Tsutsui T. e.a., 1989).

По мнению ряда исследователей оптимальным является содержания в дозе для осеменения 150 млн живых сперматозоидов (Gill H.P., 1970; Seager S.W. e.a., 1975; Brown R., 1992).

При осеменении собак свежеполученной спермой оплодотворяемость составила 65% против 78% при естественной случке (Seager S.W. e.a., 1975).

В опытах других исследователей оценилось 75% сук после искусственного осеменения свежеполученной спермой (Gill H.P. e.a., 1970).

В исследованиях ряда авторов была получена более низкая оплодотворяемость при искусственном осеменении собак свежеполученной спермой, которая не превышала 56% (Hendrikse J., 1962; Schutte A.P., 1965).

Для хранения спермы собак в охлажденном до 2-5°C состоянии, эякулят сразу после получения разбавляют синтетической средой и сохраняют в охлажденном состоянии в течении 1-3 суток. Для предотвращения бактериальной контаминации в ее состав добавляют антибиотики дигидрострептомицин и бензилпенициллин.

В качестве разбавителя для спермы собак ранее было предложено использовать пастеризованное коровье молоко (Hartor A.E., 1954). Позднее предложили молочный разбавитель для спермы собак, в состав которого входили: 4 мл 12% гомогенизированных сливок; 1 мл куриного желтка; 1000000 ед. дигидрострептомицина и 1000 ИЕ бензилпенициллина на 1 мл разбавителя (Linde – Forsberg C., 1991). К одной части эякулята добавляют 3-5 частей разбавителя. Доза для осеменения должна составлять по объему 5-10 мл в зависимости от размера собаки.

Также предложена цитратно-глицин-глюкозо-желточная среда для хранения спермы собак при 5°C, в состав которой входит 20 мл желтка куриных яиц на 100 мл среды (Foote R.H., 1964).

В экспериментах американских ученых сперму собак разбавляли 1:1 средой, содержащей: 72,2 мл дистиллированной воды; 2,4 г трис-(гидроксиметил)-аминометана; 1 г фруктозы; 1,3 г лимонной кислоты; 20 мл желтка куриного яйца (Gill H.P. e.a., 1970). При этом сравнивали результативность осеменения свежеразбавленной спермой и спермой, сохраняемой 24 часа при 5°C. Оценилось 75% и 80% сук, соответственно по группам.

Имеются сообщения, что сперма собак может храниться в цитратно-желточном разбавителе в течении 96 часов при 4°C и сохранять при этом высокую оплодотворяющую способность (Bendorf R., Chung N.Y., 1958).

В опытах Province C.A. e.a. (1984) изучалось влияние четырех различных разбавителей на выживаемость сперматозоидов собак при 5°C. Сравнивалось влияние молочного разбавителя, трис-яично-желточного, корнельского и капрогенового разбавителя. Было установлено, что наилучшая выживаемость в течении 3-х дней была отмечена в капрогеновом разбавителе, что может быть обусловлено содержанием в ней фермента каталазы.

Сообщается, что при хранении спермы собак при 4°C, молочно-глюкозный разбавитель оказал более заметное защитное действие на половые клетки по сравнению с молочно-цитратной средой (Bouchard G.F. e.a., 1990).

При сравнительном хранении спермы собак при 4°C в молочно-глюкозном или молочном разбавителе оказалось, что после искусственного осеменения оценилось в обеих группах по 50% самок (Muller A., 1993).

Эксперименты показали, что выживаемость сперматозоидов собак при 4°C была гораздо выше, чем при 22 или 37 °C (Bouchard G.F. e.a., 1990).

По данным Goodman M.F. и Cain J.L. (1993) при осеменении 139 собак охлажденной спермой, сохраняемой 24 часа при 2°C, оценилось 36% сук.

Имеется данные, что сперматозоиды собак менее чувствительны к холодовому шоку по сравнению со сперматозоидами других видов сельскохозяйственных животных (Watson P.F., 1981).

Изучение плазматических мембран сперматозоидов собак с помощью флюоресцентных зондов показало, что хранение половых клеток в трисовом разбавителе при 4°C в течении 24 часов не приводило к их повреждению (Kumi – Diara J., Badtram G., 1994).

В опытах шведских ученых (Rota A. e.a., 1995) изучалось действие трех разбавителей на биологическую полноценность сперматозоидов собак, сохраняемых при температуре 4°C. Было установлено, что подвижность сперматозоидов через 96 часов хранения было выше в трисовом разбавителе по сравнению с яично-молочным разбавителем на основе молочных сливок и желтка. Половые клетки, сохраняемые в яично-трисовом разбавителе, имели более высокую скорость движения, но не было установлено различий по уровню повреждений плазматических мембран и акросом



сперматозоидов в различных разбавителях. Также в этих опытах было показано, что семенная плазма оказывает повреждающее действия на мембранные структуры сперматозоидов, сохраняемых при 4°C. Отрицательное влияние семенной плазмы на мембране структуры сперматозоидов, сохраняемых в охлажденном состоянии, было установлено в опытах и других исследователей (England G.C., Allen W.E., 1992).

В экспериментах Morton D.B. е.а. (1989) было выяснено, что скорость движения сперматозоидов, сохраняемых при 4°C в трисовом разбавителе, оставалась на высоком уровне на протяжении 5 дней исследований.

По мнению ряда исследователей, лучшие результаты использования охлажденной спермы собак достигаются, если сперма сохраняется при 4-5°C не более 24 часов. При этом оплодотворяемость может достигать 70-80% (Farstad W., 1984).

Известно, что для нормального оплодотворения сперматозоиды должны пройти фазу дозревания или капацитации в половых путях самки.

В связи с пониженной выживаемостью и фертильностью охлажденных сперматозоидов собак были предприняты эксперименты по изучению влияния криовоздействия на их капацитацию (Kawakami E. е.а., 1993; Rota A. е.а., 1998).

В свежем семени собак акросомная реакция и капацитация наступают через 7 часов инкубации сперматозоидов вне организма (Nahi S.A. е.а., 1978).

Процессы сохранения спермы собак в охлажденном состоянии ускоряют капацитацию сперматозоидов, что может негативно влиять на ее фертильность (Rota A. е.а., 1998).

По данным Oettle E.E. (1986), хранение спермы собак в охлажденном до 5°C состоянии, приводит к увеличению числа

сперматозоидов с повреждениями акросомальной мембраны на 20% по сравнению со свежеполученными клетками.

В опытах по оплодотворению яйцеклеток собак вне организма было установлено, что быстрое охлаждение сперматозоидов собак до 0°C, приводило к снижению числа сперматозоидов, связанных с зоной пеллюцида ооцитов (Нау М. е.а., 1997).

В опытах Ерохина А.С. с сотрудниками (1999) было установлено, что при хранении спермы собак в охлажденном до 4°C состоянии в течении 24, 48 и 72-х часов, концентрация АТФ в сперматозоидах снизилась по сравнению с начальным уровнем на 7%; 11,4% и 20,6%, соответственно. А уровень АТФ в сперматозоидах животных оказывает большое влияние на их подвижность и фертильность (Ерохин А.С., Лехмус И.А., 1996; Aalbers J.G. е.а., 1985).

### **1.5. Способы искусственного осеменения собак**

Во время натурального осеменения сук основная порция эякулята попадает через цервикальный канал внутриматочно (England G. е.а., 2006).

Нормальные результаты по оплодотворяемости сук можно получить при глубоком влагалищном введении свежеполученной спермы (Thomassen R., Farstad W., 2009).

Но при использовании охлажденной или замороженной спермы лучшие результаты получаются при внутриматочном введении спермы. Как и у других видов сельскохозяйственных животных на эффективность искусственного осеменения собак влияет ряд факторов, таких как: период эстрального цикла, метод введения спермы (влагалищный или внутриматочный), используемый

разбавитель, качество спермы и индивидуальные особенности (Rijsselaere T e.a., 2004).

Для вагинального введения спермы используется простой пластиковый катетер для осеменения крупного рогатого скота определенной длины, который присоединяется с помощью переходника к одноразовому шприцу. Также для этого вида осеменения может применяться выпускаемый промышленностью гибкий латексный катетер с надуваемым баллончиком на конце (Osiris катетер). При его использовании, после его введение во влагалище, шприцом надувается баллончик на конце, что способствует имитации естественного осеменения и предотвращается вытеканием спермы из влагалища (Farstad W., 2010).

Перед осеменением сука помещается в стоячем положении на столе или на полу в зависимости от размера. Осеменительный катетер осторожно вводится во влагалище суки, чтобы не попасть в мочевой пузырь, сначала под углом, а затем – в горизонтальной позиции (Linde – Forsberg C. e.a., 1999). Желательно, чтобы конец катетера располагался в парацервикальном участке влагалища. Затем осторожно медленным нажимом на поршень шприца во влагалище вводится сперма. После осеменения желательно, чтобы сука находилась в стоячем положении в течении 10-20 мин. Хотя имеются данные, что даже выдержка суки в течении только 1-й минуты в стоячем положении после осеменения не оказывало негативного влияние на его результативность (Pinto C.R. e.a., 1998).

Внутриматочное осеменение сук может проводиться и путем не хирургической транцервикальной катетеризации (Linde – Forsberg C., 1991), а также при хирургическом внутриматочном введении семени путем лапаротомии (Brittain D. e.a., 1995) или лапароскопии (Silva L.D. e.a., 1995).

Метод не хирургического трансцервикального введения сукам спермы с помощью специального катетера был впервые предложен в Норвегии (Andersen K., 1975). При этом данная технология искусственного осеменения сначала была разработана для искусственного осеменения лисиц. Специальный норвежский катетер состоит из наружного пластикового катетера и внутреннего металлического катетера. Имеется три типа катетеров различного размера для осеменения мелких, средних и крупных пород собак. Осеменение собак с помощью этого катетера проводят в стоячем положении. Обычно не требуется применение седативных веществ при осеменении, но иногда они применяются для лучшего расслабления брюшных мышц. После введения катетера до упора во влагалище, с помощью пальпации находят конец катетера и шейку матки. Шейку матки удерживают в горизонтальном положении двумя пальцами и осторожно вводят через цервикальный канал металлический катетер внутриматочно. После этого вводится из шприца доза семени. Данная технология искусственного осеменения требует определенной тренировки и навыков. Иногда бывает невозможно ввести катетер внутриматочно у ожиревших, нервных или очень крупных пород собак.

При этом способе осеменения охлажденной или замороженной спермой оплодотворяемость сук и их многоплодие достоверно повышается по сравнению с вагинальным введением спермы (Ferguson J. M. e.a., 1989; Gunzel – Apel A.R., 1994).

По данным Rota A. e.a. (1999), оплодотворяемость сук от замороженного семени при внутриматочном введении спермы была на 25% выше, чем при вагинальном введении.

Метод внутриматочного осеменения сук при визуальном контроле с помощью эндоскопического оборудования впервые был предложен Wilson M.C. (1993). Он предложил использовать гибкий

эндоскоп-цистоуретроскоп длиной 29 см. Процедура осеменения собак также проводится в стоячем положении. Эндоскоп вводится в краниальную часть влагалища, гибкий катетер вводится в наружную часть цервикального канала под визуальным контролем через эндоскоп. При этом не требуется применение седативных средств.

Сравнительное влагалищное или внутриматочное осеменением сук замороженным семенем с использованием эндоскопа показало, что оплодотворяемость составила соответственно, 27,8% и 68,7% (Nizanski W., Klimowich M., 2005).

В настоящее время промышленностью выпускается большое количество разных видов эндоскопов. Обычно используются эндоскопы длиной 30-35 см и диаметром в 3 мм. Некоторые компании выпускают специальные катетеры для осеменения собак. Но эндоскопический метод может быть затруднительным при осеменении очень маленьких или очень крупных пород собак. Также в настоящее время у сук может применяться вагиноскопический метод внутриматочного осеменения. При этом также требуется специальное оборудование (Thomassen R., Farstad W., 2009).

Внутриматочное хирургическое осеменение с помощью лапароскопии или лапаротомии применяется в некоторых странах для искусственного осеменения сук замороженным семенем (Farstad W., 2010). При этом осеменение проводится только однократно. В некоторых странах запрещено использовать данный метод осеменения собак. Хирургический метод – это инвазивный метод и он применяется гораздо реже по сравнению с использованием интрацервикального внутриматочного введения семени.

При лапароскопическом внутриматочном осеменении собак лапороскоп вводят через небольшой разрез брюшной стенки и под его контролем через катетер внутриматочно вводят сперму (Silva D. E.a., 1995).

В случае хирургического внутриматочного осеменения, суку анестезируют и производят небольшой каудальный разрез брюшной стенки по средней линии (Hutchison R.V., 1993; Fontbonne A. e.a., 1993). Затем через разрез извлекают матку и вводят сперму в рога матки. После чего зашивают разрез.

Результативность искусственного осеменения сук свежем семенем при влагалищном осеменении составляет в среднем 80% и 97% - при трансцервикальном и хирургическом внутриматочным введением семени (England G.C.W., Milar K.M., 2008). Процент оплодотворяемости сук при использовании охлажденного семени при вагинальном осеменении составляет около 47%, а при внутриматочном осеменении – 81%.

## 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Все исследования проводились согласно прилагаемой схеме опытов (рисунок 1).

Рисунок №1 СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЙ



## **2.1. Изучение показателей качества свежеполученных эякулятов у кобелей немецкой овчарки**

Сперму от кобелей немецкой овчарки в возрасте 2-3 лет получали с помощью искусственной вагины или мануальным способом.

В свежеполученном эякуляте определяли объём спермы, концентрацию половых клеток, подвижность сперматозоидов, pH спермы, анализировали процент нормальных и морфологически изменённых сперматозоидов, а также анализировали количество половых клеток с неповреждённой акросомой и плазматической мембраной.

Объём спермы определяли с помощью мерных пипеток. Мы для изучения брали только первую и вторую фракцию семени без получения третьей фракции.

Подвижность сперматозоидов оценивали с помощью автоматической компьютерной программы «Сперм Вижион», Германия на микроскопе «Олимпус» при увеличении в 200 раз. Оценку подвижности выражали в процентах.

Концентрацию сперматозоидов определяли с помощью программы «Сперм Вижион» и уточняли с помощью счетной камеры Горяева и меланжера.

Анализ pH спермы проводили с помощью pH-метра – pH - 121.

Процент нормальных сперматозоидов и половых клеток с морфологическими нарушениями определяли микроскопически при увеличении в 400 раз. Количество половых клеток с неповрежденной плазматической мембраной, определяли с помощью гипоосмотического (HOS-теста), для этого использовали раствор фруктозы с осмотическим давлением 60мОСМ. При этом к 1мл



раствора фруктозы добавляли 0,1 мл спермы и инкубировали эту смесь в течение 45 мин при 37°C.

После инкубации одну каплю спермы помещали на предметное стекло, закрывали покровным стеклом и проверяли под микроскопом. Анализировали процент сперматозоидов с изогнутыми жгутиками (с неповрежденной плазматической мембраной) и с неизмененными жгутиками (клетки с повреждённой мембраной) (Kumi – Diaka J. e.a., 1994).

Для определения состояния акросомной мембраны использовали окраску мазков спермы красителем «Spermас». Учитывали клетки с не поврежденной акросомой и с набухшей, или отсутствующей мембраной.

## **2.2. Анализ действия различных разбавителей на биологическую полноценность сперматозоидов, сохраняемых при 5°C**

Сперму получали от четырех кобелей немецкой овчарки в возрасте 2-3 лет с помощью искусственной вагины или мануальным способом. Получали для экспериментов только первую и вторую фракцию. После оценки эякулятов проводили их разбавление двумя средами. В качестве первого разбавителя использовали трис-фруктозо-лимоннокислую среду, состоящую из следующих компонентов: трис-(гидросиметил) – аминотан – 3,25 г; лимонная кислота-1,27г; фруктоза-1,25г; желток куриного яйца -20мл; вода дистиллированная – до 100мл; в качестве антибактериального вещества добавляли 30 мг препарата «Полиген».

Вторым разбавителем являлся молочно-яичный разбавитель, состоящий из пастеризованного молока (0,5 % жира), в состав

которого добавляли 20 % желтка куриного яйца и 30 мг «Полигена» на 100 мл.

Свежеполученную сперму разбавляли теплой средой (температура + 30°C) до получения концентрации сперматозоидов– 100 млн/мл.

Затем помещали разбавленную сперму для хранения в холодильнике при температуре + 5°C.

Через определённые интервалы времени проводили анализ биологических показателей спермы.

Подвижность сперматозоидов оценивали с помощью автоматической системы «Сперм-Вижион». Процент морфологически поврежденных клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении в 400 раз. Целостность акросом определяли с помощью окраски мазков красителем «Спермак».

Состояние плазматических мембран оценивали с помощью гипоосмотического теста по методу Goericke S. (2013). Для этого 100 мкл гипоосмотического раствора (в 100 мл дистиллированной воды растворяли 0,74г цитрата натрия и 1,35г фруктозы) добавляли 10мкл спермы и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении в 400 раз подсчитывали процент клеток с закрученными жгутиками и без закручивания (с поврежденной плазматической мембраной). Всего подсчитывали 200 половых клеток.

### **2.3. Изучение действия антибактериального препарата «Полиген» на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C**

Эксперименты проводились с использованием спермы, полученной от кобелей породы немецкая овчарка и доберман. Сперму получали на искусственную вагину и после оценки по подвижности и концентрации разбавляли в соотношении 1:4 трис-фруктозо-лимоннокислой средой. Для разбавления использовались эякуляты с подвижностью 70-75%.

Для изучения влияние различных концентраций «Полигена», свежеполученную сперму разбавляли средой следующего состава: дистиллированная вода 100 мл; трис-(гидроксиметил) – аминомета3,025г; лимонная кислота – 1,7 г; яичный желток - 20 мл. При этом в состав разбавленной спермы вводили также различные концентрации изучаемого антибактериального препарата «Полиген».

После этого сперму помещали на хранение в холодильник при температуре 5°C. Затем ежедневно на протяжении нескольких дней определяли подвижность сперматозоидов в различных группах.

### **2.4. Анализ выживаемости сперматозоидов собак при добавлении в разбавитель гиалуроновой кислоты**

Как известно, гиалуроновая кислота, получаемая из стекловидного тела глаза и других тканей организма, обладает мембранотропным действием (Rodriguez – Martinez H. e.a., 1992).

Поэтому в задачу наших исследований входило изучение добавления различных концентраций этого вещества в состав разбавителя на выживаемость сперматозоидов собак, сохраняемых в охлаждённом до 5°C состоянии.

В эксперименте использовали сперму, полученную от трех кобелей немецкой овчарки, с подвижностью не менее 75%.

После получения первой и второй фракций спермы, ее разбавляли 1:3 трис-фруктозо-лимоннокислой средой, содержащей различные концентрации гиалуроновой кислоты. В контроле сперму разбавляли аналогичной средой, но без добавления гиалуроновой кислоты.

## **2.5. Выяснения влияния на выживаемость сперматозоидов собак различных высокомолекулярных соединений в составе разбавителя спермы**

Рядом исследователей установлено положительное влияние различных высокомолекулярных соединений на подвижность и выживаемость сперматозоидов различных видов сельскохозяйственных животных в охлажденном состоянии (Yaniz J. e.a., 2005; Nayk B.A., 1992).

Поэтому мы поставили своей задачей выяснить влияние добавления ряда загустителей среды (высокомолекулярных соединений) на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак, сохраняемых в условиях холодильника при 5 °C.

Для эксперимента использовали сперму пяти кобелей немецкой овчарки, лабрадора и ризеншнауцера. В экспериментальных исследованиях проводилось изучение влияния различных соединений: поливинилпирролидона K-25 (Aldrich, ФРГ); желатина G – 2625 (Sigma, США); гуммиарабика (Merck, Германия); кукурузного декстрина и декстрана с молекулярным весом, равным 10000 (Sigma, США).

Свежеполученную сперму с подвижностью 75-80% разбавляли 1:4 трис-фруктозо-лимоннокислой средой, содержащей различные концентрации изучаемых веществ. Контрольные образцы спермы разбавляли этой же средой, но без добавления изучаемых соединений.

Затем помещали разбавленную сперму для хранения в холодильник при 5°C. Через определенные интервалы времени определяли подвижность сперматозоидов. После гибели сперматозоидов во всех образцах спермы определяла абсолютный показатель выживаемости сперматозоидов по методу Милованова В.К. (1962).

Абсолютный показатель выживаемости ( $S_a$ ) определяли по следующей формуле:

$$S_a = \sum a * t = \sum a_1 * t_1 + a_2 * t_2 + a_n * t_n,$$

Где:  $S_a$  - абсолютный показатель выживаемости;

$a_1, a_2, a_3$  и т.д. — последовательные оценки подвижности сперматозоидов;

$t_1, t_2, t_3$  и т.д. — последовательные отрезки времени, на которые интерполируется соответствующая подвижность, а  $t_n$  вычисляется по следующей формуле:

$$t_n = (T_{n+1} - T_{n-1}) : 2,$$

где:  $T_{n+1}$  - время, прошедшее от начала опыта до момента наблюдения, следующего за данным;

$T_{n-1}$  - время, прошедшее от начала опыта до момента наблюдения предшествующего данному.

Для первого наблюдения ( $t_1$ ) формула несколько упрощается:

$$t_1 = \frac{T_2}{2}$$

## **2.6. Анализ протективного действия на охлажденную сперму собак антиоксидантных препаратов**

Ранее было установлено защитное влияние некоторых антиоксидантов на сперматозоиды домашних животных, сохраняемые в охлаждённом состоянии (Ерохин А.С., 2001; Pratt W.D. e.a., 1980; Michael A.J. e.a., 2009).

Поэтому мы решили изучить влияние некоторых антиоксидантов на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при температуре хранения 5°C.

В первом эксперименте мы изучали влияние введения в состав среды трех селеновых соединений на выживаемость сперматозоидов собак.

Для хранения спермы в охлажденном до 5°C состоянии, свежеполученные эякуляты кобелей с подвижностью не менее 70%, разбавляли 1:4 трис-фруктозо-лимоннокислой средой, с добавлением в нее различных концентраций трех селеносодержащих препаратов: селенита натрия, селикора (диметилпиразолилселенит) и ДАФС-25 (диацетофенонилселенид). Контрольные образцы спермы разбавляли этой же средой без добавления в ее в состав изучаемых препаратов.

После разбавления сперму хранили в холодильнике при +5°C. Через каждые 24 часа оценивали подвижность сперматозоидов в образцах и определяли абсолютный показатель их выживаемости.

Во втором эксперименте с антиоксидантами мы выясняли защитное влияние различных концентраций восстановленного глутатиона на выживаемость охлажденной спермы собак. Сперму кобелей после оценки, разбавляли 1:4 трис-фруктозо-лимоннокислой средой с добавлением различных дозировок глутатиона. Контрольные образцы спермы разбавляли аналогичной средой без добавления

изучаемого препарата. После разбавления, сперму помещали в холодильник при температуре 5°C. Через определенные интервалы времени определяли подвижность сперматозоидов.

В третьем опыте с антиоксидантами мы изучали влияние добавления в состав разбавленной спермы кобелей различных дозировок серосодержащей аминокислоты цистеина на выживаемость половых клеток при 5°C. Свежеполученные эякуляты также разбавляли 1:4 трис-фруктозо-лимоннокислой средой содержащей различные концентрации цистеина.

В контроле сперму разбавляли аналогичной средой, но без добавления в ее состав изучаемого препарата. Затем сперму хранили в холодильнике при температуре 5°C и ежедневно определяли подвижность половых клеток.

## **2.7. Изучение протективного действия на сперму собак регуляторных пептидов**

В последние годы появились научные данные о влиянии некоторых пептидов на выживаемость сперматозоидов (Brudel Re.a., 2012; Евдокимов В.В. и др., 2016).

Поэтому в задачу наших исследований входило выяснения защитного действия регуляторных пептидов селанк, семакс и проглипро на подвижность и выживаемость сперматозоидов кобелей при хранении в охлажденном состоянии.

Данные пептиды были синтезированы в Институте молекулярной биологии гена, г. Москва.

Свежеполученную сперму собак после ее оценки разбавляли 1:4 трис-фруктозо-лимоннокислой средой с добавлением различных дозировок изучаемых веществ. После этого сперму помещали на

хранение в холодильник при температуре 5°C. Через каждые 24 часа хранения проводили анализ подвижности сперматозоидов.

## **2.8. Изучение криозащитного влияния на сперматозоиды собак сухого соевого лецитина и желтка куриных яиц**

В своих исследованиях мы также изучали возможность замены желтка куриного яйца в составе среды для хранения спермы собак при 5°C на сухой соевых лецитин.

Сухой соевый лецитин – это желтый порошок содержащий в своем составе 97% фосфолипидов и 1% воды.

В наших экспериментах изучалось криозащитное действие сухого лецитина под торговой маркой «Центролекс Ф».

Для проведения экспериментов свежеполученную сперму кобелей разбавляли 1:4 трис-фруктозо-лимоннокислой средой, содержащей различные концентрации сухого соевого лецитина. В контрольной группе сперму разбавляли этой же средой, но содержащей в своем составе 20% желтка куриного яйца.

После этого сперму помещали на хранение в холодильник и через каждые 24 часа анализировали подвижность сперматозоидов.

## **2.9. Анализ подвижности и выживаемости сперматозоидов собак при хранении в различных средах при + 17°C**

Имеются данные, что сперму некоторых видов сельскохозяйственных животных можно хранить в разбавленном и охлажденном до (+15°C) – (17 °C) состоянии (Прокопцев В.М., 1981; Хабибуллин И.Х., 1965).



Поэтому мы решили выяснить возможность хранения разбавленной спермы собак при температуре +17°C.

Сперму собак разбавляли 1:4 двумя сравниваемыми средами: трис-фруктозо-лимоннокислой, содержащей 3% куриного яйца и молочной средой, в которую также добавляли 3% желтка куриного яйца.

После разбавления сперму помещали на хранение в термобокс при +17°C. Затем через каждые 24 часа анализировали подвижность сперматозоидов и их выживаемость.

## **2.10. Изучение результативности искусственного осеменения собак свежеполученной и охлажденной спермой**

В последние годы в кинологии все большей популярностью пользуется искусственное осеменение сук свежеполученной или охлажденной до 2-5°C спермой.

Поэтому целью наших исследований было выяснение эффективности искусственного осеменения собак свежеполученной или охлажденной спермой при различных методах ее введения в половые пути самки.

Сперму получали у кобелей различных пород с помощью искусственной вагины или мануальным способом. При осеменении свежеполученным семенем собак мелких и средних пород, предварительно получали смесь первой и второй фракции эякулята, а при осеменении сук крупных пород, дополнительно к этим двум фракциям получали и часть третьей фракции. При этом объем вводимой дозы спермы в первом случае составлял в среднем (2-5 мл), а при осеменении самок крупных пород 8-10 мл.

Мы изучали эффективность вагинального введения семени с помощью укороченной пластиковой пипетки (до 20 см) для искусственного осеменения крупного рогатого скота, соединенной переходником с одноразовым пластиковым шприцем. Также проводили сравнительные исследования по эффективности влагалищного введения семени с помощью катетера Osiris (Франция).

Для изучения внутриматочного осеменения собак использовали интрацервикальное внутриматочное введение семени с помощью норвежского катетера, имеющего три разных размера и позволяющего вводить сперму внутриматочно мелким, средним и крупным породам сук.

При осеменении свежеполученным неразбавленным семенем, предварительно полученный эякулят оценивали по подвижности сперматозоидов и их концентрации. Искусственное осеменение проводили через 10-20 мин после получения семени. Самок осеменяли два раза в течение эструса с интервалом в 24 часа. Признаки эструса определяли с помощью вагинальной цитологии или с помощью определения концентрации прогестерона в крови.

При осеменении собак охлажденной спермой получали смесь первой и второй фракций эякулята. Затем центрифугировали образец при 700 g в течение 8 минут и удаляли супернатант. Оставшийся осадок сперматозоидов разбавляли трис-фруктозо-лимонокислотой средой, с добавлением в ее состав 20 мл желтка куриного яйца и 30 мг антибактериального препарата «Полиген» на 100 мл разбавителя. Сперму разбавляли с таким расчетом, чтобы в дозе для осеменения содержалось не менее 300 млн сперматозоидов. Осеменяли сук также дважды в течение эструса с интервалом в 24 часа в краниальный участок влагалища или внутриматочно через цервикальный канал.

Результативность осеменения учитывали по количеству оценившихся самок и их многоплодию.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Показатели качества свежеполученных эякулятов у кобелей немецкой овчарки

Существуют значительные видовые особенности в морфологических и физиологических показателях качества спермы у разных видов домашних животных (Осташко Ф.И., 1978; Квасницкий А.В., 1985; Купляускас Е.С., 1999; 2000; Farstad W., 1984). Это обусловлено размерами и живой массой животного, а также особенностями половой системы самок.

Также существуют и значительные межпородные различия у собак по отдельным качественным характеристикам спермы. Поэтому необходимо более тщательное изучение особенностей сперматологических показателей у разных пород собак с целью улучшения воспроизводства в кинологии.

Целью этого раздела нашей диссертации являлось изучение биологических характеристик спермы у собак породы немецкая овчарка.

Сперму получали у кобелей с помощью искусственной вагины и анализировали показатели в смеси первой и второй фракции.

Результаты этих исследований суммированы в таблице № 1.

Таблица № 1. Биологические параметры свежеполученной спермы у кобелей немецкой овчарки

Изучаемые показатели	Средние данные по 10 эякулятам	Интервал
Объем эякулята (1 и 2 фракции), мл	$3,4 \pm 0,2$	1-5,2

Концентрация, млн/мл	$250 \pm 14,1$	130-420
Подвижность, %	$83,0 \pm 6,6$	72-92
Нормальных сперматозоидов, %	$87,0 \pm 5,3$	76-90
Сперматозоидов с морфологическими повреждениями, %	$9,5 \pm 0,6$	13,6-36
Сперматозоидов с интактной мембраной, %	$94 \pm 3,4$	90-98
Сперматозоидов с поврежденной акросомой,	$1,5 \pm 0,1$	0,5-2,5
Значение pH	$6,4 \pm 0,3$	6,2-6,8

Как видно из таблицы №1, у собак немецкой овчарки, которые относятся к средним породам собак, имеются определенные биологические характеристики свежеполученных эякулятов.

Результаты наших исследований согласуются с данными, полученными ранее на других породах собак.

Например, по данным немецких исследователей (Goericke – Persch S, Failing K., 2013), средний объем второй фракции у собак средних пород составил 1,7мл, концентрация сперматозоидов – 300 млн/мл, а процент живых сперматозоидов – 87%.

В опытах Weitze K. (1991), средний объем эякулята у крупных пород собак составил 6 мл, концентрация сперматозоидов – 300 млн/мл, а число сперматозоидов с морфологическими нарушениями достигало 20%.

В экспериментах на мелких породах собак (Amann R.P., 1986) было показано, что средний объем их эякулята равнялся 2,4 мл, а концентрация сперматозоидов – 20 млн/мл.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что в эякуляте у здоровых собак немецкой овчарки отмечается высокая подвижность и концентрация сперматозоидов. Количество сперматозоидов в таких эякулятах с морфологическими повреждениями находится на низком уровне и не превышает 9,5%. Значение рН спермы в эякулятах собак этой породы составило 6,4.

### **3.2. Изучение влияния различных разбавителей на биологическую полноценность сперматозоидов собак, сохраняемых при 5°C**

В кинологии в настоящее время более часто используют для искусственного осеменения сперму сохраняемую в охлажденном до 2-5°C состоянии (Квичко И.Л., 1998). Изучено действие нескольких разбавителей на сохранение подвижности сперматозоидов собак при этих температурах (Bouchard С.А. et al., 1984). В состав этих разбавителей входят цитрат натрия; трисовый, фосфатный или глициновый буфер; цельное или сухое молоко; различные сахара, яичный желток куриных яиц и антибиотики. Охлажденная сперма собак может сохранять свою высокую фертильность в течении 24 часов хранения, хотя ряд исследователей получили нормальную оплодотворяемость и после двух - трех суточного хранения спермы при 5°C. В этой связи во многих странах проводятся исследования по совершенствованию синтетических сред для хранения спермы собак в охлажденном состоянии с целью увеличения сроков ее хранения при данной температуре (Квичко И.Л., 1998).

Для оценки биологической полноценности сперматозоидов собак, сохраняемых в охлажденном состоянии, предлагается оценивать не только подвижность и выживаемость половых клеток, но

и сохранность акросом и структурную целостность их плазматической мембраны (Квичко И.Л., 1998).

В связи с вышеизложенным, целью наших исследований было выяснение биологической полноценности сперматозоидов собак при хранении спермы в двух сравниваемых разбавителях при 5°C. Мы изучали выживаемость сперматозоидов собак в трис-фруктозо-лимоннокислом разбавителе и в молочном разбавителе.

Результаты изучения подвижности сперматозоидов собак с первого по четвертый дни хранения в охлажденном состоянии в этих двух средах представлены в таблице № 2.

Таблица № 2 Подвижность сперматозоидов собак в зависимости от сроков хранения при 5°C (n=6)

Состав разбавителя	Сроки хранения, часов				
	0	24	48	72	96
Трис-фруктозо-лимоннокислый	74,8±9,2	71,6±10,4	64,2±5,8	60±8,3	51±6,1
Молочный	75,2±8,1	70,2±9,6	61,3±7,8	52 ±6,7*	41±8,0*

\* -  $P < 0,05$

Как видно из таблицы №2, выживаемость разбавленной спермы собак была выше в трис-фруктозо-лимоннокислом разбавителе. Подвижность сперматозоидов в молочном разбавителе через 72 часа хранения была ниже на 13,4 %, а через 96 часов хранения – на 19,7 % по сравнению с трис-фруктозо-лимоннокислом разбавителем ( $P < 0,05$ ).

Анализ сохранности акросом в сперматозоидах собак в течении 96 часов хранения при 5°C приведен в таблице № 3.

Таблица № 3. Сохранность акросом в сперматозоидах собак в зависимости от состава среды (n=6)

Состав разбавителя	Сперматозоидов с повреждённой акросомой, %				
	Сроки хранения спермы при 5°C, часов				
	0	24	48	72	96
Трис-фруктозо-лимоннокислый	86,3±7,1	81,4±5,3	80,1±6,7	75,4±5,3*	68,5±4,7*
Молочный	85,6±4,8	77,3±6,1	73,5±5,8	65,1±7,2	52,4±3,9

\* -  $P < 0,05$

Результаты этого опыта показали, что в молочном разбавителе количество сперматозоидов с неповрежденной акросомой в зависимости от увеличения срока хранения при 5°C, снижалось более быстрыми темпами, по сравнению с половыми клетками, разбавленными трис-фруктозо-лимоннокислой средой. Например, через 72 часа хранения число сперматозоидов с интактной акросомой в молочном разбавителе было на 12,6 %, а через 96 часов – на 13,6% ниже, чем в трис-фруктозо-лимоннокислом разбавителе ( $P < 0,05$ ).

Показатели целостности плазматической мембраны сперматозоидов собак при хранении в охлажденном состоянии, определённые с помощью гипоосмотического теста, показаны в таблице № 4.

Таблица №4. Процент сперматозоидов с неповрежденной плазматической мембраной в зависимости от срока хранения при 5°C

Состав разбавителя	Сперматозоидов с интактной плазматической мембраной, %				
	Сроки хранения при 5°C				
	0	24	48	72	96
Трис-фруктозо-лимоннокислый	87,4±5,1	86,1±4,3	83,2±3,8	80,1±5,0	75,4±4,5

Молочный	88,1±4,2	85,3±5,6	82,4±4,1	78,5±3,4	76,1±5,3
----------	----------	----------	----------	----------	----------

Как видно из таблицы № 4, процент сперматозоидов с неповрежденной плазматической мембраной не различался достоверно при хранении половых клеток в сравниваемых разбавителях во все периоды хранения. Более заметное снижение числа сперматозоидов с интактной плазматической мембраной отмечалось через 72 и 96 часов хранения спермы в молочном разбавителе.

Например, через 72 часа и 96 часов хранения спермы в этом разбавителе, сперматозоидов с интактной плазматической мембраной было меньше на 11 % и 13,6 % соответственно, по сравнению с начальным уровнем. А при хранении спермы собак в трис-фруктозо-лимоннокислом разбавителе в эти периоды сперматозоидов с неповрежденной плазматической мембраной было соответственно ниже на 8,4 и 13,8 % по сравнению с первым днем хранения.

### **3.3. Влияние различных веществ на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C**

#### **3.3.1. Анализ влияния антибактериального препарата «Полиген» на выживаемость сперматозоидов собак при 5°C**

Как известно, при хранении спермы различных видов животных в охлажденном или замороженном состоянии для снижения бактериальной загрязненности применяются антибактериальные препараты (Козло Н.Е. и др., 1987; Мингазов Т.А., 1988; Советкин С.В. и др., 1998).



Например, при хранении спермы собак в состав разбавителя добавляют 1 мг/мл дигидрострептомицина и 10 ИЕ/мл бензпенициллина (Farstad W., 1984; Province C.A. e.a., 1984; Linde – Forsberg C., 1995).

В этой связи мы решили выяснить влияние различных дозировок антибактериального препарата «Полиген» на выживаемость сперматозоидов собак, сохраняемых в охлажденном состоянии при температуре 5°C. Данные этого эксперимента приведены в таблице № 5.

Таблица №5. Влияние антибактериального препарата «Полиген» на выживаемость сперматозоидов собак при 5°C (n=7)

Концентрация препарата в среде, мг/мл	Подвижность сперматозоидов, %					
	Сроки хранения спермы, часов					
	0	24	48	72	96	120
0,1	75,4 ± 8,1	73,2 ± 6,1	65,1 ± 4,3	57,3 ± 3,1	48,6 ± 2,7*	41,2 ± 3,1**
0,2	76,1 ± 6,3	74,0 ± 3,6	64,8 ± 5,1	56,8 ± 4,8	47,3 ± 3,9*	40,4 ± 4,8**
0,3	75,0 ± 4,8	72,5 ± 4,8	65,2 ± 3,7	57,1 ± 5,7	47,6 ± 4,1*	42,1 ± 5,1**
0,4	74,3 ± 5,3	72,3 ± 5,6	64,2 ± 2,9	54,3 ± 3,2	45,2 ± 2,9*	40,5 ± 3,7**
0,5	74,6 ± 3,2	71,3 ± 7,6	63,8 ± 4,8	53,8 ± 4,4*	46,1 ± 3,7**	39,8 ± 2,7**
0,6	75,2 ± 3,8	73,2 ± 5,9	63,5 ± 4,1	54,7 ± 5,3*	45,3 ± 5,1**	40,7 ± 2,4**
0,7	74,8 ± 4,5	70,5 ± 3,2	57,4 ± 5,2	46,0 ± 4,2*	40,4 ± 3,6*	32,6 ± 2,6*
Контроль (без полигена)	75,2 ± 6,4	68,4 ± 4,6	51,4 ± 3,7	33,0 ± 2,4**	26,2 ± 1,8**	21,8 ± 1,4**

\* - P < 0,05

\*\* - P < 0,01

Из данных этого опыта видно, что использование антибактериального препарата в дозах 0,1-0,5 мг/мл не оказало отрицательного влияния на подвижность и выживаемость спермы собак при 5°C. Увеличение дозы до 0,6-0,7 мг/мл привело к определенному снижению выживаемости сперматозоидов.

Хранение разбавленной спермы собак при 5°C без добавления антибактериального препарата, привело к значительному снижению подвижности сперматозоидов уже через 48 часов хранения. При этом, подвижность сперматозоидов в этой группе была через 72; 96 и 120 часов хранения ниже, чем в первый день хранения, соответственно, на 64%, 65,2% и 71,1% ( $P < 0,01$ ).

Так, при использовании 0,6 и 0,7 мг/мл среды полигена, подвижность сперматозоидов в этих группах через 120 часов хранения была ниже на 45,9% и 56,5% по сравнению с первым днем хранения ( $P < 0,01$ ). При использовании дозировок полигена 0,1; 0,2; 0,3 и 0,4 мг/мл, подвижность сперматозоидов через 120 дней хранения была ниже начального уровня, соответственно, на 41,1%; 47% 43,9% и 45,5%.

Поэтому, в случае использования для искусственного осеменения собак спермы, полученной от здоровых производителей, желательно использовать дозировку данного препарата в пределах 0,3 – 0,4 мг/мл среды.

### **3.3.2. Выживаемость сперматозоидов собак при добавлении в состав среды гиалуроновой кислоты**

В настоящее время проводятся исследования по совершенствованию синтетических разбавителей для хранения

спермы собак в охлажденном состоянии путем введения в их состав различных биологически активных веществ (England G.C., Millar K., 2008; Michael A.J. e.a., 2009).

В литературе имеются данные о мембранотропном действии на сперматозоиды животных такого природного полисахарида, как гиалуроновая кислота (Rodriguez – Martinez H. e.a., 1992). Показано, что гиалуроновая кислота влияет на акросомную реакцию и капацитационные процессы в сперматозоидах (Handrow R.P. e.a., 1982). Гиалуроновую кислоту получают из стекловидного тела глаза, кожи, синовиальной жидкости. В растворе она создает дополнительную вязкость и может положительно влиять на структурно-функциональное состояние мембран сперматозоидов.

Поэтому, в задачу наших исследований входило изучение защитного влияния гиалуроновой кислоты на сперму собак, сохраняемую в охлажденном до 5°C состоянии.

В лабораторных экспериментах мы изучали влияние различных концентраций гиалуроновой кислоты в составе трис-фруктозо-лимоннокислой среды на выживаемость сперматозоидов собак при 5°C. Сперму разбавляли средой до концентрации 200 млн/мл, с добавлением определенных концентраций гиалуроновой кислоты. В контроле сперму разбавляли аналогичной средой, но без добавления изучаемого вещества. Затем через каждые 24 часа определяли подвижность сперматозоидов.

Анализ влияния гиалуроновой кислоты на выживаемость сперматозоидов представлен в таблице № 6.

**Таблица №6. Выживаемость сперматозоидов собак при 5°C в  
среде с гиалуроновой кислотой**

Концентрация гиалуроновой кислоты, %	Подвижность сперматозоидов, %					
	Сроки хранения спермы, часов					
	0	24	48	72	96	120
0,1	80	75,1±6,1	68,4±3,7	61,3±4,1	52,3±3,2	37,2±2,8
0,2	80	74,6±3,6	67,3±2,9	59,8±3,7	50,4±4,0	36,5±3,2
0,3	80	77,2±4,8	67,8±4,1	58,4±5,2	49,2±2,2	38,4±4,1
0,4	80	78,1±5,7	66,5±5,3	56,8±4,1	51,6±3,6	37,8±3,5
0,5	80	76,3±3,7	69,3±3,7	58,2±2,6	50,9±4,4	35,3±4,6
0,6	80	77,6±4,3	66,5±4,6	59,1±3,9	49,9±5,3	40,1±1,9
0,7	80	75,8±3,8	68,1±4,4	57,7±6,1	47,2±2,2	38,4±2,7
0,8	80	76,6±4,9	65,4±5,2	59,7±5,3	48,4±3,7	36,2±3,3
0,9	80	77,1±5,6	67,4±5,7	58,4±4,4	51,3±3,9	39,3±4,6
1,0	80	75,8±4,4	68,2±3,6	60,8±3,5	46,8±2,7	36,4±2,9
Контроль	80	76,2±3,3	67,9±3,9	59,2±4,1	48,4±2,1	37,7±1,8

Как видно из таблицы № 6, добавление гиалуроновой кислоты в состав синтетической среды не оказало положительного влияния на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак, сохраняемых при 5°C. Возможно, использование более высоких дозировок этого препарата может оказать положительное влияние.

### **3.3.3. Влияние на выживаемость сперматозоидов собак различных загустителей среды**

В литературе имеются сообщения о положительном влиянии ряда высокомолекулярных соединений на устойчивость сперматозоидов животных при криоконорвации. Например,

установлено положительное влияние полисахарида инулина, поливинилпирролидона, декстрана и других соединений (Наук В.А. 1992; Курбатов А.Д. и др., 1988; Милованов В.К., Соколовская И.И., 1984)).

Механизм их защитного действия на сперматозоиды животных окончательно не выяснен, но ряд ученых считает, что при хранении спермы в охлажденном состоянии наблюдается седиментация сперматозоидов, что приводит к значительной флуктуации значений рН и увеличению концентрации продуктов метаболизма в слое осевших на дно сперматозоидов. Поэтому введение различных загустителей в состав среды может замедлять и уменьшать седиментацию половых клеток при хранении, что может способствовать улучшению их биологической полноценности (Yaniz Je.a., 2005).

В связи с тем, что влияние данных веществ не изучалось ранее при хранении охлажденной спермы собак, мы решили проверить защитное влияние некоторых высокомолекулярных веществ в составе среды для хранения спермы при 5°C.

Результаты использования различных загустителей суммированы в таблице № 7.

Из таблицы № 7 видно, что все испытанные соединения при различных концентрациях не оказали положительного влияния на выживаемость и подвижность охлажденной спермы собак.

Причем, введение в состав разбавителя гуммиарабика в концентрации 6-12 мг/мл, способствовало снижению абсолютного показателя выживаемости собак на 26,3% и 31,4% при 5°C по сравнению с контролем. Другие испытанные соединения не оказывали заметного отрицательного влияния на выживаемость сперматозоидов собак по сравнению с контролем.

Возможно, использование других высокомолекулярных соединений может способствовать повышению выживаемости сперматозоидов собак при 5°C.

Таблица №7. Влияние высокомолекулярных соединений на выживаемость сперматозоидов собак при 5°C

Концентрация изучаемых веществ в среде, мг/мл	Абсолютный показатель выживаемости сперматозоидов, условные единицы (n=6)				
	Изучаемые вещества				
	Желатин	Декстран	Декстрин кукурузный	Гуммиарабик	Поливинил-пирролидон
12	659±5,9	702±10,3	650±6,6	520±4,1**	615±3,8
6	628±10,5	685±8,1	621±7,1*	560±3,8**	637±6,9
3	644±8,1	690±5,9	630±8,1	585±6,1**	620±7,4
1,5	651±4,3	678±6,7	634±5,9*	620±5,3*	675±8,1
0,75	681±5,9	681±4,4	621±4,6	685±4,7*	681±5,1
0,38	639±10,8	653±5,1*	705±7,1	703±6,1	701±3,9
0,19	640±12,1	689±4,4	680±3,8	726±5,5	694±4,2
0,1	625±5,4*	701±7,8	692±4,4	738±4,0	710±6,6
0,05	642±4,3	709±6,7	674±5,6	710±3,2	708±5,9
Контроль	695±4,7	725±7,9	710±6,2	758±6,9	778±4,7

\* - $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$

### **3.3.4. Выяснение защитного действия на охлажденную сперму собак антиоксидантных препаратов**

При хранении спермы животных, в том числе и собак в охлажденном состоянии, происходит снижение функциональной полноценности половых клеток в результате ряда биологических реакций.

Одной из причин понижения биологической полноценности охлажденной спермы животных является активация реакции перекисного окисления липидов (Коновов В.Г., Нарижный А.Г., 1985; Ерохин А.С., 1994).

Для снижения процессов пероксидации липидов в криоконсервированной сперме было предложено вводить в состав разбавителей семени различные натуральные и синтетические антиоксиданты (Ерохин А.С. и др., 2001; Michael A.J. e.a., 2009). Селен является одним из природных антиоксидантов. Имеются данные, что введение селена в состав разбавителя для семени быков улучшало их подвижность и выживаемость (Pratt W.D. e.a., 1980; Siegal R.B. e.a., 1980). Поэтому мы решили изучить влияние добавления в состав разбавителя спермы для собак различных соединений селена на выживаемость половых клеток при 5°C.

Для хранения спермы собак, свежеполученные эякуляты разбавляли трис-фруктозо-лимоннокислым разбавителем до получения концентрации 200 млн сперматозоидов в 1 мл. В состав разбавителя предварительно вводили определенные дозировки селеносодержащих препаратов. После этого разбавленную сперму помещали на хранение в холодильник при 5°C и ежедневно оценивали их подвижность, а затем вычисляли абсолютный показатель их выживаемости. Результаты этих опытов суммированы в таблице № 8.

Таблица № 8. Влияние препаратов селена на выживаемость  
сперматозоидов собак при 5°C

Доза препаратов в среде, мг/мл	Абсолютный показатель выживаемости сперматозоидов при 5°C, усл. ед.		
	Препарат селена		
	Селенит натрия (n=6)	Селекор (n=6)	ДАФС-25 (n=6)
1,0	18±3,7	59±3,0***	46±3,1***
0,5	22±1,8	420±20**	64±4,4***
0,25	30±2,6	470±19**	75±5,6***
0,12	66±4,6	580±16*	154±9,9***
0,06	72±4,2	605±31	220±13,1***
0,03	85±5,1	630±27	340±15,8**
0,015	180±21,2	655±18	355±10,3**
0,008	250±18,5	670±25	408±24,2*
0,004	406±26,0	690±31	468±21,7*
0,002	620±31***	705±41	570±31,5
0,001	690±44***	710±34	580±38,6
Контроль	710±53***	695±28	610±27,4

\* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$

Результаты таблицы № 8 свидетельствуют, что селенит натрия оказался более токсичным для сперматозоидов собак по сравнению с двумя другими препаратами.

Наименее токсичным селеносодержащим препаратом для сперматозоидов собак является органический препарат - селекор. Но даже при использовании данного препарата во всех изученных дозах, не было выявлено его заметного положительного влияния на выживаемость сперматозоидов при 5°C.



Препарат ДАФС-25 также не повысил выживаемость сперматозоидов собак.

На основании этих экспериментов можно заключить об отсутствии защитного влияния на выживаемость сперматозоидов собак при 5°C всех трех изученных препаратов селена.

Ранее, в экспериментах, проведенных на сперме различных видов животных, было установлено, что при введении в состав разбавителя для хранения спермы в охлажденном состоянии низкомолекулярных тиолов, отмечалось снижение окисления сульфгидрильных групп в белках, улучшение энергетического обмена и повышалась оплодотворяющая способность сперматозоидов (Прокопцев В.М., 1981; Ерохин А.С, Чернова И.Е., 1992;. и др., 2013; Ерохин А.С. и др., 2014).

Поэтому мы решили изучить влияние различных дозировок восстановленного глутатиона в составе среды на выживаемость сперматозоидов собак при 5°C.

Результаты этих опытов показаны в таблице № 9.

Таблица № 9. Влияние восстановленного глутатиона на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C (n=6)

Концентрация восстановленного глутатиона, мг/мл среды	Подвижность сперматозоидов, %					
	Сроки хранения охлажденной спермы, часы					
	0	24	48	72	96	120
0,01	82±3,6	76±4,1	71±4,4	52±3,0	43±1,8	11±0,3
0,02	84±4,4	79±5,6	72±3,2	61±2,1	47±2,2	8,5±0,1
0,03	82±5,1	74±3,0	70±3,0	58±2,7	41±3,1	10±0,1
0,04	83±4,8	80±4,8	74±2,8	54±3,1	46±6,1	12±0,2
0,05	81±3,1	73±4,3	72±3,1	63±3,6	51±2,0	11±0,1
0,06	83±4,6	77±3,6	71±2,6	65±2,7	49±2,6	9,5±0,2

0,07	82±3,8	74±3,9	68±2,4	61±2,2	44±1,7	8±0,1
0,08	82±4,2	75±4,4	69±3,1	59±2,9	40±1,8	8±0,1
0,09	82±4,7	78±5,1	72±4,1	56±3,1	44±2,6	12±0,4
0,1	83±3,6	74±2,8	69±3,1	58±2,5	47±3,2	13±0,3
Контроль (без глутатиона)	83±3,3	77±4,6	66±3,6	59±2,7	45±1,8	10±0,2

Результаты таблицы № 9 свидетельствуют, что добавления в состав среды для спермы собак восстановленного глутатиона в изученных дозировках (0,01–0,1 мг/мл) не оказало положительного влияние на подвижность и выживаемость сперматозоидов.

В задачу наших исследований входило также изучение влияния введения в состав разбавителя для хранения спермы собак в охлажденном состоянии серосодержащей аминокислоты цистеина на биологическую полноценность сперматозоидов.

Сразу после получения и оценки эякуляты собак разбавляли 1:1 трис-фруктозо-лимоннокислой средой. Перед разбавлением в состав среды вводили различные концентрации (0,01 – 1,28 мг/мл) L цистеина. Контрольные образцы семени разбавляли этой же средой, но без добавления цистеина.

Влияние цистеина на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C представлено в таблице № 10.

Из таблицы № 10 видно, что добавление некоторых доз цистеина оказало заметное защитное влияние на сохранение подвижности сперматозоидов. Более высокий защитный эффект был отмечен в группе с добавлением 0,08 мг/мл цистеина. При этой концентрации препарата подвижность сперматозоидов собак через 72 часа хранения была выше, чем в контроле, на 12,0% ( $P < 0,05$ ). Через пять дней хранения спермы при этой температуре подвижность

сперматозоидов в этой группе была выше, чем в контроле на 10% ( $P < 0,05$ ).

Таблица №10. Влияние цистеина на подвижность сперматозоидов собак при 5°C (при  $n=8$ )

Концентрация цистеина мг/мл, среды	Подвижность сперматозоидов, %					
	Сроки хранения спермы при 5°C, часов					
	0	24	48	72	96	120
0,01	77,3	71,4	65,2	56,6	37,4	8,1
0,02	75,5	70,8	63,6	58,9	41,7	7,7
0,04	78,2	74,1	70,6	61,5	47,3	8,4
0,08	75,3	75,2	73,8	69,0*	61,1*	14,2
0,16	76,1	74,3	70,7	67,1*	55,5	13,3
0,32	75,2	70,1	65,4	54,3	41,1	9,5
0,64	77,1	71,8	63,5	48,6	37,2	6,8
Контроль без цистеина	78,4	74,6	66,3	57,0	51,1	12,1

\*- $P < 0,05$

Добавление в состав разбавителя цистеина в дозе 0,16 мг/мл, также способствовало повышению подвижности и выживаемости сперматозоидов собак по сравнению с контролем. Через 72 часа хранения спермы подвижность сперматозоидов в этой группе была выше, чем в контроле на 10,1%, а через 5 дней хранения на 4,4%.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования оптимальных дозировок цистеина в составе разбавителя для хранения спермы собак в охлажденном состоянии. Но необходимо в дальнейшем изучить влияние добавления цистеина в состав разбавителя на оплодотворяющую способность спермы.

### **3.3.5 Влияние регуляторных пептидов на подвижность и выживаемость охлажденной спермы собак**

В последние годы появились данные о влиянии различных регуляторных пептидов на подвижность и выживаемость сперматозоидов животных и человека (Евдокимов В.В. и др., 2016; Kordan W. e.a., 1998; Brudel R. e.a., 2012; Park S.K. e.a., 2012).

Свое действие они оказывают посредством связывания со специфическими рецепторами на мембране сперматозоидов (Park S.K. e.a., 2012).

В большинстве случаев отмечено активирующее влияние ряда пептидов на подвижность сперматозоидов. Например, в исследованиях Евдокимова В.В. с сотрудниками (2016) было установлено активирующее влияние регуляторных пептидов Семакс и Селанк на подвижность сперматозоидов человека.

Аналогичное активирующее влияние на сперматозоиды оказали полипептиды, выделенные из гипоталамо-гипофизарной системы (Brudel R. e.a., 2012) и специфические пептиды-инактиваторы тропанина в сперматозоидах (Park S.K. e.a., 2012).

Хотя из семенной плазмы животных выделены и пептиды, специфически ингибирующие подвижность сперматозоидов (Kordan W. e.a., 1998).

В связи с тем, что в нашей стране были синтезированы специальные регуляторные пептиды в Институте молекулярной биологии гена (г. Москва), получившие названия Селанк, Семакс и Проглипро, мы решили изучить действие данных соединений на подвижность сперматозоидов собак, сохраняемые при температуре 5°C.

Результаты эксперимента по влиянию препарата Селанк на выживаемость сперматозоидов собак представлено в таблице № 11.

Таблица №11. Влияние пептида «Селанк» на подвижность сперматозоидов собак, сохраняемых при 5°C (n=5)

Концентрация селанка, мг/мл среды	Подвижность сперматозоидов, в %					
	Сроки хранения спермы при 5°C, часов					
	0	24	48	72	96	120
1	73	61,3	50,3*	35,6*	22,8*	7,8*
0,5	75	65,2	56,4	44,3	30,1	12,6
0,25	74	67,4	58,2	47,1	32,8	13,1
0,12	70	65,1	57,6	45,4	34,3	12,7
0,06	74	68,6	55,8	46,8	31,7	14,2
0,03	74	70,0	57,1	44,1	32,6	12,2
0,015	73	66,5	58,3	46,6	35,1	13,6
0,0075	73	64,8	54,4	45,7	33,6	14,1
0,0032	75	63,5	57,9	46,1	31,8	11,6
0,0016	74	67,1	57,6	47,8	32,9	10,8
Контроль (без селанка)	73	68,3	61,6	49,9	34,1	14,4

\* -  $P < 0,05$

Как видно из таблицы № 11 препарат «Селанк» не оказал положительного влияния на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C.

Также не было выявлено и положительного влияния на данные показатели пептида «Селанк» и «Проглипро» (таблицы 12 и 13)

Полученные нами результаты свидетельствуют, что в отличие от других авторов, в наших экспериментах не было установлено положительного действия изученных пептидов на сохранение

подвижности сперматозоидов собак, инкубируемых при температуре 5°C. Эти данные могут быть обусловлены различиями в мембранных структурах сперматозоидов различных видов животных и человека, а так же наличием более высоких концентраций ферментов пептидаз в семенной плазме у собак.

Таблица №12. Влияние пептида «Семакс» на подвижность сперматозоидов собак при 5°C (n=6)

Концентрация семакса, мг/мл среды	Подвижность сперматозоидов, в %					
	Сроки хранения спермы при 5°C, часов					
	0	24	48	72	96	120
1	75,6	60,1	42,4*	21,3*	9,7**	-
0,5	75,2	64,5	51,3	32,1	21,4	5,7
0,25	75,6	66,1	52,4	35,1	24,3	6,8
0,12	75,4	65,3	51,6	37,2	19,7	7,7
0,06	74,2	67,2	50,8	34,8	22,6	7,6
0,03	74,6	66,9	55,1	38,1	24,1	8,2
0,015	76,3	65,7	53,2	36,2	23,8	6,4
0,0075	75,5	63,3	52,8	34,4	21,6	6,5
0,0032	74,4	62,8	53,6	37,1	20,9	7,0
0,0016	76,2	61,9	52,1	33,6	21,8	6,4
Контроль (без семакса)	74,8	65,4	56,7	38,1	23,7	7,3

\* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$

Таблица №13. Влияние регуляторного пептида «Проглипро» на подвижность сперматозоидов собак при 5°C (n=6)

Концентрация пептида, мг/мл среды	Подвижность сперматозоидов, в %					
	Сроки хранения спермы при 5°C, часов					
	0	24	48	72	96	120

1	72,1	50,1*	31,2*	15,4**	-	-
0,5	73,8	62,7	45,4	29,2	15,1	-
0,25	72,4	64,3	44,3	31,4	14,8	4,1
0,12	74,4	65,8	46,1	34,3	16,6	5,6
0,06	73,1	62,4	42,8	35,1	17,1	3,8
0,03	72,0	64,6	44,4	33,9	15,3	7,1
0,015	71,9	65,1	42,8	31,2	15,6	5,7
0,0075	72,6	64,7	45,1	34,6	14,9	4,9
0,0032	74,1	62,9	42,7	35,1	13,7	4,8
0,0016	73,7	63,8	43,6	33,7	15,1	4,4
Контроль (без пептида)	74,2	67,1	44,9	34,8	15,6	5,7

\* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$

### **3.3.6 Сравнительное изучение защитного действия на охлажденную сперму собак желтка куриного яйца и сухого соевого лецитина**

В связи с тем, что с желтком куриного яйца в состав синтетических сред могут попадать различные микроорганизмы и вирусы, в последние годы исследователи предпринимают попытки исключить из состава разбавителей для семени животных продуктов животного происхождения: молока, желтка куриных яиц и т.д. (Thibier M., Guerin B., 2000).

Результаты ряда исследований показали, что желток в составе среды для криоконсервации быков можно заменить на сухой фосфолипидный экстракт из соевых бобов (Christensen P. e.a.. 2009; Ерохин А.С., Добровольский Г.А., 2009).

Так как сухой соевый лецитин не использовался ранее в составе разбавителя для хранения спермы собак в охлажденном состоянии, мы решили провести сравнительное изучение по возможности замены желтка куриного яйца в составе разбавителя для хранения спермы собак при 5°C на сухой соевый лецитин.

При этом свежеполученные эякуляты собак разбавляли до концентрации 200 млн/мл трис-фруктозо-лимоннокислой средой, содержащей вместо желтка различные дозировки сухого соевого лецитина. В контроле сперму разбавляли этой же средой, содержащей 20% желтка.

Данные по изучению влияния сухого лецитина на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C показаны в таблице № 14.

Таблица №14. Влияние сухого соевого лецитина на выживаемость спермы собак при 5°C (n=8)

Концентрация сухого лецитина в среде, %	Подвижность сперматозоидов, в %					
	Сроки хранения спермы, часы					
	0	24	48	72	96	120
1	69,8±5,5	66,2±4,4	54,5±2,7	42,1±3,1*	30,2±1,7*	14,6±1,2*
2	72,1±6,1	67,4±3,6	69,8±3,6	44,4±2,9*	36,3±2,9*	18,8±2,1*
3	71,5±4,3	65,9±5,1	60,3±4,5	56,8±5,1	36,4±2,2*	25,3±1,1*
4	74,1±5,1	69,3±4,4	64,4±4,2	59,2±4,4	50,5±3,8	42,3±3,1
5	73,5±8,1	70,8±3,4	65,6±3,7	60,4±3,1	52,6±3,1	44,1±2,6
6	74,0±3,3	68,6±2,9	63,3±5,5	57,2±5,1	50,3±4,4	39,7±3,1
7	72,6±4,8	66,7±5,6	60,8±4,3	52,6±2,9	43,8±2,6	37,6±2,7
8	72,9±5,6	68,1±4,9	62,5±2,9	50,6±2,7	42,2±3,3	29,5±1,9*
9	73,1±3,7	65,3±3,7	57,1±3,1	51,2±4,3	41,1±4,5*	27,6±3,1*
10	74,4±4,1	67,7±4,9	59,2±4,4	46,8±5,1	37,4±2,7*	28,8±1,9*



Контроль (20% желтка)	73,3±5,1	71,3±5,1	65,2±3,6	59,9±4,8	52,2±3,9	41,6±2,6
-----------------------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

\*-P <0,05

Как видно из данных таблицы №14 сухой соевый лецитин в определённых дозировках оказал заметный эффект на сохранение подвижности сперматозоидов при 5°C. В частности, концентрации лецитина в пределах 4-5 % оказали такой же защитный эффект на выживаемость половых клеток, как и 20% желтка куриного яйца. Например, через 72, 96 и 120 часов хранения спермы с 5% сухого соевого лецитина, подвижность сперматозоидов составляла 60,4%; 52,6% и 44,1%, соответственно, против 59,9%; 52,2% и 41,6% при содержании в разбавителе 20% желтка куриного яйца. Более низкие или более высокие дозировки лецитина в составе среды приводили к достоверному снижению подвижности сперматозоидов. Это свидетельствует о перспективности использования оптимальных дозировок сухого соевого лецитина в качестве альтернативы нативному желтку куриных яиц в составе сред для хранения спермы собак в охлажденном состоянии.

### **3.4 Подвижность и выживаемость сперматозоидов собак в различных средах при 17°C**

Как известно, сперму некоторых видов животных, возможно, сохранять в разбавленном виде при комнатной температуре 16-20°C (Милованов В.К., 1962; Хабибулин И.Х., 1965; Прокопцев В.М., 1981; Ерохин А.С., Сейдахметов Б.С., 1998).

При этом сперма хряков и баранов, сохраняемая при данной температуре, сохраняет оплодотворяющую способность в течение нескольких дней.

Однако в литературе отсутствуют данные по влиянию хранения спермы собак при данных температурах на подвижность и выживаемость сперматозоидов. Поэтому мы решили выяснить выживаемость сперматозоидов собак при температуре 17°C после разбавления эякулята трис-фруктозо-лимоннокислой и молочной средой.

Результаты этих опытов суммированы в таблице № 15.

Таблица №15. Влияние хранения спермы собак при 17° в трис-фруктозо-лимоннокислой и молочной средах на подвижность и выживаемость сперматозоидов (n=5)

Состав среды	Подвижность сперматозоидов, %				
	Сроки хранения спермы, часов				
	0	24	48	72	96
Трис-фруктозо-лимоннокислая	70	55,3±4,1*	27,6±1,5*	5,1±0,1	М
Молочная	70	41±3,8	15,4±1,1	М	М

\*-P<0,05

Как видно из данных таблицы №15, хранение семени собак при 17°C приводило к быстрому снижению подвижности сперматозоидов уже через 24 часа хранения. Причем, более низкая выживаемость спермы была отмечена в молочном разбавителе. Возможно, это объясняется активизацией реакции перекисного окисления липидов в сперме при хранении при этой температуре.

Поэтому в следующем эксперименте мы решили выяснить выживаемость сперматозоидов собак при 17°C в трис-фруктозо-лимоннокислом разбавителе при добавлении в его состав антиоксиданта цистеина.

Результаты этого эксперимента приведены в таблице № 16.

Таблица №16. Влияние цистеина на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак в трис-фруктозо-лимоннокислом разбавителе при 17°C (n=5)

Концентрация цистеина, мг/мл среды	Подвижность сперматозоидов, в %				
	Сроки хранения спермы, часов				
	0	24	48	72	96
0,02	75,1±3,5	56,4±3,8	27,2±1,7	3,0±0,2	М
0,04	74,8±5,1	59,7±4,1	31,4±2,6	2,7±0,4	М
0,08	74,3±4,4	62,7±3,3*	35,8±3,1*	3,1±0,1	М
0,16	74,8±3,2	57,3±4,1	31,4±2,7	2,7±0,2	М
Контроль (без цистеина)	74,3±2,7	53,2±3,6*	23,2±1,4*	3,0±0,4	М

\*-  $P < 0,05$

Эксперименты с добавлением антиоксиданта цистеина показали, что данный препарат в определенных дозировках оказал положительное влияние на выживаемость сперматозоидов собак при 17°C. Так, при использовании цистеина в дозе 0,08 мг/мл среды, подвижность сперматозоидов через 24 часа и 48 часов хранения была выше, чем в контроле, соответственно на 9,5% и 12,6 % ( $P < 0,05$ ).

Более низкие дозировки препарата оказали меньшее защитное влияние на сохранение подвижности.

Но даже при использовании антиоксиданта, выживаемость сперматозоидов собак при 17°C была гораздо ниже, чем в случае хранения спермы при 5°C.

В этой связи необходимы дальнейшие исследования в данном направлении с целью разработки более совершенной среды для хранения спермы собак при комнатной температуре.

### **3.5 Результативность искусственного осеменения собак свежеполученной и охлажденной спермой**

#### **3.5.1. Эффективность искусственного осеменения собак свежеполученной спермой в связи с местом ее введения**

Искусственное осеменение собак свежеполученным семенем обычно применяется в случае невозможности естественного осеменения животных. Это может быть обусловлено физическими или поведенческими причинами. Оптимальное время осеменения суки при этом определяется путем изучения вагинальных мазков или измерением концентрации прогестерона в крови. При осеменении свежим неразбавленным семенем обычно используется цельный эякулят или смесь первой и второй фракций эякулята. При этом объем вводимого внутривлагалищно семени должен быть не менее 2-4 мл, в зависимости от размера самки. Осеменение свежим семенем обычно производится в течении 30-40 минут после его получения.

В настоящее время в кинологии все чаще применяется осеменение охлажденным до 2-5°C семенем (Ерохин А.С., Квичко И.Л., 1998;.Werhahn E.A., 2015) При этом появляется возможность проводить селекционную работу с использованием импортной спермы. Для разбавления семени используются различные разбавители: молочный, трис-цитратный и ряд других (Linde-Forsberg C, 1995; Farstad W, 1984; Pena F.J. e.a., 2006). Охлажденную сперму хранят при температуре 2-5°C. Хорошие результаты по оплодотворяемости обычно достигаются при ее хранении в течении 24-48 часов. Оплодотворяемость самок зависит от правильного выбора времени осеменения по отношению к овуляции, состава разбавителя и места введения семени: интравагинально или

интрауретрально (Gill H.P. e.a., 1970; Goodman M.F., Cain J, 1993; Pinto C.R., e.a., 1999).

Целью наших исследований было выяснение эффективности искусственного осеменения собак свежеполученной и охлажденной спермой при введении спермы во влагалище или внутриматочно.

При осеменении свежеполученным семенем собак мелких и средних пород, получали смесь первой и второй фракций эякулята, а при осеменении сук крупных пород, дополнительно к этим двум фракциям добавляли и часть третьей фракции. При этом объем вводимой дозы спермы в первом случае составлял в среднем 2-5 мл, а при осеменении самок крупных пород – 8-10 мл.

В экспериментах сравнивалась эффективность вагинального введения семени с помощью укороченной пластиковой пипетки для искусственного осеменения крупного рогатого скота, соединенной переходником с одноразовым пластиковым шприцем и внутриматочного осеменения с помощью норвежского катетера (Andersen K., 1975).

Предварительно полученный эякулят оценивали по подвижности и концентрации сперматозоидов. Осеменение сук проводили через 20-30 минут после получения семени. Сук осеменяли двукратно в течение эструса с интервалом в 24-48 часов. Наличие эструса подтверждали с помощью вагинальной цитологии.

Результативность осеменения учитывали по количеству оценившихся самок и их многоплодию.

При осеменении собак охлажденной спермой, смесь первой и второй фракций разбавляли трис-фруктозо-лимонокислой средой, с добавлением желтка и антибиотиков. Сперму разбавляли до содержания 300 млн. сперматозоидов в дозе.

Результаты искусственного осеменения собак представлены в таблице №17.

Таблица №17. Результативность искусственного осеменения свежеполученной и охлажденной спермой

Осеменение проведено спермой	Место введения семени							
	Влагалищное				Внутриматочное			
	Осемене -но собак	ощенилось		многопло- дие	осемене- но собак	ощенилось		Многоп- -лодие
		ГОЛО В	%			ГОЛО В	%	
Свежеполученной	37	18	48,6	5,4±0,3	24	14	58,3*	5,7±0,2*
Охлажденной	18	8	44,4	5,2±0,2	13	7	53,8	5,6±0,2

\*-P<0,05

Как видно из данных таблицы №17, при влагалищном введении свежеполученного и охлажденного семени получена практически одинаковая оплодотворяемость собак: 48,6 и 44,4%, соответственно. Многоплодие сук в сравниваемых группах также практически не отличалось.

При внутриматочном введении семени оплодотворяемость сук в группе, где использовали свежеполученную сперму, была выше на 9,7% по сравнению с влагалищным введением семени. При этом была отмечена тенденция и повышения многоплодия самок на 0,3 щенка. Также оплодотворяемость сук была выше на 9,4% и в группе, где использовали внутриматочное осеменение собак и охлажденной спермой.

Эти данные свидетельствуют, что при внутриматочном осеменении сук свежеполученным и охлажденным семенем результативность искусственного осеменения повышается.

### **3.5.2. Изучение оплодотворяемости сук охлажденной спермой при выявлении овуляции с помощью прогестеронового теста**

В следующем эксперименте мы изучили результативность внутривлагалищного осеменения сук охлажденной спермой без предварительного выявления овуляции или после выявления овуляции с помощью прогестеронового теста.

При этом, первую группу сук осеменяли влагалищно без предварительного выявления овуляции, а вторую группу сук осеменяли после предварительного выявления овуляции с помощью прогестеронового теста (концентрация прогестерона в крови  $> 8$  нг/мл).

Результаты опыта представлены в таблице №18.

Таблица №18. Эффективность влагалищного осеменения сук охлажденной спермой с предварительным выявлением овуляции

Способ осеменения	Место введения спермы	Осеменено собак	оценилось		Среднее многоплодие
			голов	%	
Без выявления овуляции	влагалищно	24	11	49,1	$5,7 \pm 0,3$
С выявлением овуляции	влагалищно	18	11	61,1*	$6,2 \pm 0,4^*$

\*- $P < 0,05$

Из данных, представленных в таблице видно, что при влагалищном осеменении сук охлажденной спермой, результативность осеменения была выше на 12%, а многоплодие больше на 0,5 щенка в группе, где предварительно выявляли наличие овуляции с помощью прогестеронового теста.

### **3.5.3. Оплодотворяемость сук при вагинальном введении свежеполученного семени с помощью различных катетеров**

Кроме того, в задачу наших исследований входило изучение результативности влагалищного осеменения сук свежеполученной спермой с помощью различных катетеров. При этом использовали укороченный катетер для осеменения коров, соединенный переходником с одноразовым пластиковым шприцом или специальный катетер «Osiris» для влагалищного осеменения собак.

Результаты опытов суммированы в таблице №19.

Таблица №19. Результативность влагалищного осеменения сук свежеполученной спермой с помощью различных катетеров.

Используемый катетер	Осеменено сук	ощенилось		Среднее многоплодие
		голов	%	
Укороченный катетер для осеменения коров	37	18	48,6	5,4±0,3
Катетер Osiris для влагалищного осеменения собак	36	19	52,7	5,3±0,2

Из данных этого эксперимента видно, что при влагалищном осеменении свежеполученным семенем не было выявлено достоверных различий по оплодотворяемости и многоплодию сук в



связи с используемым для введения семени катетером, хотя некоторое повышение результативности осеменения было отмечено при использовании французского катетера (Osiris), особенностью которого является наличие надуваемого баллончика на верхушке катетера, что способствует лучшей имитации натурального спаривания и препятствует вытеканию спермы из влагалища.

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время во многих странах мира возрос интерес к проблеме искусственного осеменения собак. Использование данного метода позволяет ускорить генетический прогресс в разводимых породах собак. При этом становится возможным проводить международный обмен спермой собак или перевозить ее на дальние расстояния без необходимости перевозки самих животных.

В настоящее время более широкое распространение находит искусственное осеменение собак с использованием свежеполученной и охлажденной спермы (Linde-Forsberg C. 1995; Ерохин А.С., Квичко И.Л., 1998; Pena F.J.e.a., 2006).

Однако при использовании охлажденной спермы, удовлетворительные результаты по оплодотворяемости сук достигаются только при краткосрочном хранении спермы при 2-5°C в течение 24-48 часов (Farstad W., 1996)

Это обусловлено недостаточными защитными свойствами применяемых разбавителей. Поэтому необходимы дальнейшие исследования по изучению возможности улучшения защитных свойств разбавителей на сперму собак путем использования в их составе различных биологически активных веществ.

Кроме того, результативность искусственного осеменения сук свежеполученной спермой так же остается недостаточно высокой в связи с трудностью выявления оптимального времени осеменения в период эструса (England G.C., Allen W.F., 1992; Werhahn F.e.a., 2015). Поэтому представляет несомненный интерес изучение влияния времени и способа осеменения сук в период эструса на результативность искусственного осеменения.

Результаты изучения физиологических особенностей свежеполученной спермы у кобелей немецкой овчарки показали, что наши данные согласуются с данными, полученными ранее на других породах собак. Например, по данным немецких исследователей (Goericke-Persch S., Failing K., 2013) средний объем второй фракции у собак средних пород составляет 1,7 мл, а концентрация сперматозоидов-300 млн/мл. По нашим данным средний объем первой и второй фракции эякулята у кобелей немецкой овчарки составил 3,4 мл, а концентрация сперматозоидов-250 млн/мл.

В задачу наших исследований входило выяснение влияния двух разбавителей на биологическую полноценность сперматозоидов собак, сохраняемых в охлажденном до 5°C состоянии. Результаты показали, что трис-фруктозо-лимоннокислый разбавитель обладает более высокими защитными свойствами на подвижность и выживаемость сперматозоидов в сравнении с молочным разбавителем.

В этом разбавителе также отмечена более высокая сохранность акросомной мембраны у половых клеток кобелей. Эти данные свидетельствуют о большей перспективности использования этого разбавителя для хранения охлажденной спермы собак.

В настоящее время проводятся исследования по совершенствованию синтетических разбавителей для хранения спермы собак в охлажденном состоянии путем введения в их состав различных биологически активных веществ (England G.C., Millar K., 2008; Michael A.J. e.a., 2009)

В литературе имеются данные о положительном влиянии на сохранность плазматической мембраны сперматозоидов животных при их криоконсервации добавления гиалуроновой кислоты (Rodriguez-Martinez H. e.a., 1992). Поэтому в задачу наших исследований входило изучение защитного влияния гиалуроновой

кислоты на сперму собак, сохраняемую при 5°C. Но наши результаты показали, что данное вещество не оказало положительного влияния на подвижность и выживаемость сперматозоидов при изучаемой температуре. Возможно, использование более высоких дозировок этого полисахарида может оказать положительное влияние.

В литературе имеются сообщения о положительном влиянии некоторых высокомолекулярных соединений на криоустойчивость сперматозоидов животных.

В частности, установлено положительное влияние инулина, поливинилпирролидона, декстрана и других соединений (Милованов В.К., Соколовская И.И., 1984; Курбатов А.Д. и др., 1988; Наук В.А., 1992). Ряд ученых считает, что добавление этих веществ к сперме, сохраняемой в охлажденном состоянии, способствует снижению седиментации половых клеток при хранении, что положительно влияет на их биологическую полноценность (Yaniz J. e.a., 2005).

Поэтому мы решили изучить влияние некоторых загустителей среды при хранении спермы собак при 5°C. Однако, наши исследования показали отсутствие положительного влияния изученных высокомолекулярных соединений на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак, сохраняемых в охлажденном состоянии. Возможно, использование других высокомолекулярных соединений может оказаться более успешным.

Известно, что при хранении спермы различных видов животных в охлажденном состоянии происходит снижение биологической полноценности половых клеток в результате активизации различных биологических процессов. В частности, одной из причин снижения биологической полноценности охлажденной спермы животных является активация процессов перекисного окисления липидов (Прокопцев В.М. и др., 1974; Владимиров Ю.А. и др., 1991; Ерохин А.С., 1991; Holt W.V., 2000). Для снижения процессов перекисидации

липидов в сперме, предложено использовать различные натуральные и синтетические антиоксиданты в составе разбавителей (Ерохин А.С. и др, 2001; Michael A.J. e.a., 2009).

Селен является одним из природных антиоксидантов и имеются данные о положительном влиянии добавления его в состав разбавителя для криоконсервации спермы быков на подвижность и выживаемость половых клеток (Абдуллаев Ф.И., 1989; Гусейнов Т.М. и др., 1990; Pratt W.D. e.a., 1980; Siegal R.L. e.a., 1980). В этой связи мы решили выяснить влияние добавления в состав разбавителя для спермы собак различных соединений селена на подвижность и выживаемость половых клеток, сохраняемых при 5°C.

В наших опытах изучалось действие селенита натрия, селекора и ДАФС-25. Оказалось, что наименее токсичным препаратом для сперматозоидов собак оказался селекор. Но даже при использовании данного препарата во всех изученных дозах, не было выявлено его заметного положительного влияния на выживаемость сперматозоидов при 5°C. На основании этих результатов можно заключить об отсутствии защитного влияния на сперматозоиды собак всех трех изученных препаратов селена.

В связи с тем, что в литературе имеются данные о положительном влиянии низкомолекулярных тиолов на биологическую полноценность сперматозоидов разных видов животных, сохраняемых в охлажденном состоянии (Прокопцев В.М., 1981; Мороз Л.Г. и др., 1996; Ерохин А.С. и др., 2014; Gadea J. e.a., 2000), мы решили изучить влияние добавления в состав разбавителя для семени собак восстановленного глутатиона на выживаемость половых клеток при 5°C. Полученные результаты показали отсутствие положительного действия данного препарата в изученных дозировках (0,01-0,1 мг/мл) на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при анализируемой температуре.

В задачу наших исследований входило также изучение защитного влияния на сперматозоиды собак серосодержащей аминокислоты цистеина при хранении разбавленной спермы при 5°C. Оказалось, что добавление данной аминокислоты в состав разбавителя в дозе 0,08 мг/мл, способствовало повышению подвижности и выживаемости половых клеток, сохраняемых в охлажденном состоянии. Это свидетельствует о перспективности использования цистеина в оптимальных дозировках в составе разбавителя для хранения спермы собак в охлажденном состоянии. Желательно продолжить исследование с данным препаратом с целью изучения его влияния на оплодотворяющую способность сперматозоидов собак.

В последние годы появились данные о защитном влиянии на сперматозоиды животных и человека различных регуляторных пептидов (Brudel R. e.a., 2012; Park S.K. e.a., 2012; Евдокимов В.В. и др., 2013). Свое положительное действие на сохранность подвижности сперматозоидов они оказывают путем связывания со специфическими рецепторами на мембране половых клеток.

Мы решили изучить влияние трех регуляторных пептидов (селанк, семакс и прогли-про) на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак, сохраняемых в охлажденном до 5°C состоянии. Данные препараты были синтезированы в Институте молекулярной биологии гена (г. Москва).

На основании проведенных исследований было установлено отсутствие положительного действия всех трех изученных препаратов на выживаемость сперматозоидов собак.

В связи с тем, что с желтком куриного яйца в состав разбавителей спермы животных могут попадать различные микроорганизмы и вирусы, исследователи предпринимают попытки исключить из их состава продукты животного происхождения: молока, желтка куриных яиц и т.д. (Thibier M., Guerin B., 2000).

Некоторые исследователи показали, что желток куриного яйца в составе разбавителя для спермы быков можно успешно заменить на сухой фосфолипидный экстракт из соевых бобов (Christensen P.e.a., 2000; Ерохин А.С., Добровольский Г.А., 2009). Так как ранее сухой соевый лецитин не использовался в составе разбавителей для хранения спермы собак при 5°C, мы решили провести изучение возможности замены желтка куриного яйца в составе среды, на сухой соевый лецитин. Оказалось, что сухой лецитин в определенных дозировках оказывает заметный защитный эффект на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C. В частности, сухой соевый лецитин в оптимальной концентрации (4-5%) оказал такой же защитный эффект на выживаемость половых клеток, как и оптимальная концентрация желтка куриного яйца (20%). Эти результаты свидетельствуют о перспективности использования сухого соевого лецитина в качестве альтернативы желтку куриных яиц в составе сред для хранения спермы собак в охлажденном состоянии.

Как известно, сперму некоторых видов животных можно сохранять при температуре 16-20°C (Хабибулин И.Х., 1965; Прокопцев В.М., 1981; Ерохин А.С., Сейдахметов Б.С., 1998). При этом, сперма хряков и баранов сохраняет оплодотворяющую способность в течение нескольких дней хранения при этой температуре. Однако, в литературе отсутствуют данные по влиянию хранения спермы собак при этой температуре на подвижность и выживаемость сперматозоидов. Поэтому, в своих исследованиях мы решили выяснить выживаемость сперматозоидов собак, сохраняемых при температуре 17°C в двух сравниваемых средах: трис-фруктозо-лимоннокислой и молочной. Полученные данные показали, что в обеих средах, подвижность сперматозоидов, сохраняемых при данной температуре, резко снижается уже через 24 часа хранения.

Резкого снижения подвижности сперматозоидов через 24 часа хранения при этой температуре не удалось предотвратить и добавлением в состав разбавителей антиоксиданта цистеина в оптимальных дозировках. Исследования в данном направлении необходимо продолжить с целью разработки более совершенного разбавителя для хранения спермы собак при комнатной температуре.

Искусственное осеменение собак свежеполученным семенем обычно применяются в случае невозможности естественного осеменения животных в результате физических или поведенческих причин (Ерохин А.С., Квичко И.Л., 1998).

В последние годы все большей популярностью в кинологии пользуется искусственное осеменение с помощью охлажденного до 2-5°C семени. При этом появляется возможность проводить селекционную работу с использованием семени от импортных производителей и транспортировать ее на дальние расстояния. Охлажденную сперму сохраняют обычно при 2-5°C и хорошие результаты по оплодотворяемости обычно достигаются при ее хранении в течение 24-48 часов. Однако, даже при использовании свежеполученной спермы, результативность осеменения собак бывает недостаточно высокой. В связи с этим мы изучали результативность искусственного осеменения собак свежеполученной и охлажденной спермой в связи с местом введения семени в половые пути самки с помощью различных катетеров и контролем срока овуляции с помощью прогестеронового теста.

Сравнительная результативность искусственного осеменения при введении семени во влагалище или внутриматочно с помощью норвежского катетера показала, что при внутриматочном введении семени оплодотворяемость собак повышается как при использовании свежеполученного, так и охлажденного семени. При влагалищном осеменении свежеполученным семенем не было выявлено



достоверных различий по оплодотворяемости и многоплодию сук в связи с используемым для введения семени катетером, хотя некоторое повышение результативности осеменения было отмечено при использовании французского катетера (Osiris), особенностью которого является наличие надуваемого баллончика на верхушке катетера, что способствует лучшей имитации натурального спаривания и препятствует вытеканию спермы из влагалища. Вероятно, при оптимальном времени осеменения сук в период эструса с использованием обоих видов катетеров, может отмечаться хорошая моторика матки, позволяющая сперме из влагалища быстро проникать к месту оплодотворения. Гораздо важнее используемого катетера, проводить искусственное осеменение собак в оптимальное по отношению к овуляции время с использованием прогестеронового теста. Так как, несмотря на то, что в половых путях у сук подвижность сперматозоидов наблюдается в течении 4-6 дней после осеменения (Doak R.L. e.a., 1967), их оплодотворяющая способность сохраняется в течении гораздо более короткого периода в результате активации процесса пероксидации липидов и снижения внутриклеточного уровня АТФ, а также индуцирования реакций капацитации и апоптоза (Kawakami E. e.a., 1998). Эти биологические процессы в сперматозоидах различных производителей могут значительно варьировать в результате возрастных и породных особенностей, а также в связи с сезоном года, состоянием здоровья и рядом других факторов (England G.C., Allen W.F., 1992).

В отличие от других видов сельскохозяйственных животных (Федотов С.В., 2009), эстральный период у сук довольно продолжительный, в связи с чем, необходимо проводить осеменение в оптимальное по отношению к овуляции время. Овуляция у сук обычно наступает через 24-72 часа после предовуляторного пика

секреции лютеинизирующего гормона (Ververidis H.N., Boscós C.M., Stefanakis A. e.a., 2007)

Первое мейотическое деление происходит через 24 часа после овуляции, когда ооциты находятся в средней части яйцевода. Завершение созревания ооцитов наступает в среднем через 72 часа после овуляции и они сохраняют способность к оплодотворению в течение 24-96 часов. Осеменение сук с учетом только цитологического анализа мазков часто приводит к низким результатам их оплодотворяемости (Van Haaften B., 1989). Как известно, у собак уровень прогестерона в крови начинает повышаться с момента предовуляторного выброса лютеинизирующего гормона из гипофиза и овуляция отмечается в период, когда концентрация прогестерона в крови достигает 5 нг/мл (Ververidis H.N. e.a., 2007).

Осеменение собак в период 24-72-х часов после овуляции, особенно при использовании криоконсервированной спермы, приводит к значительному повышению их оплодотворяемости и многоплодия (Van Haaften B. e.a., 1989; Thomassen R., Farstad W., 2009).

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что средний объем первой и второй фракции эякулята у немецких овчарок составляет 3, 4 мл, а концентрация сперматозоидов – 250 млн/мл. При этом подвижность сперматозоидов в полноценных эякулятах колебалась от 72% до 92%.
2. Выяснено, что выживаемость разбавленной спермы собак при 5°C была выше в трис-фруктозо-лимоннокислом разбавителе по сравнению с молочным разбавителем. В этом разбавителе также отмечено увеличение сохранности акросом в сперматозоидах на 16,1% по сравнению с молочным разбавителем, через 96 часов хранения охлажденной спермы.
3. Доказано, что добавление в состав разбавителя для хранения спермы собак при 5°C антибактериального препарата «Полиген» в дозах 0,1 – 0,5 мг/мл, не оказало отрицательного влияния на подвижность и выживаемость сперматозоидов.
4. Показано, что добавление в состав разбавителя для спермы собак антиоксиданта цистеина в дозе 0,08 мг/мл, способствовало повышению подвижности сперматозоидов через 3 дня хранения при 5°C на 10,1% по сравнению с контролем. Введение в состав среды восстановленного глутатиона в дозировках 0,01 – 0,1 мг/мл, не оказало положительного влияния на подвижность и выживаемость сперматозоидов.
5. Установлено, что дополнительное введение в состав трис-фруктозо-лимоннокислого разбавителя для хранения спермы собак в охлажденном до 5°C состоянии таких регуляторных пептидов, как: селанк, семакс и прогли-про, не оказало положительного влияния на подвижность и выживаемости сперматозоидов.

6. Добавление в состав разбавителя для хранения спермы собак при 5°C вместо желтка куриного яйца сухого соевого лецитина в концентрации 4-5%, оказывает высокий защитный эффект на сохранение подвижности и выживаемость сперматозоидов собак.
7. Сравнительное изучение подвижности и выживаемости сперматозоидов собак в охлажденном до 5°C и 17°C состоянии, показало что данные показатели резко снижались при 17°C в сравнении с хранением при 5°C.
8. Изучение влияния различных селен-содержащих препаратов на подвижность и выживаемость сперматозоидов собак при 5°C не выявило их положительного действия на данные показатели.
9. Установлено, что при внутриматочном введении свежеполученного и охлажденного семени сукам, результативность искусственного осеменения повышается на 9,7 и 9,4 %, соответственно, по сравнению с влагалищным введением семени.
10. Не выявлено различий по результативности искусственного осеменения сук при влагалищном введении свежеполученного семени с помощью укороченной пипетки для осеменения коров и французского катетера для влагалищного осеменения Osiris.
11. При влагалищном осеменении сук свежеполученным семенем после выявления овуляции с помощью прогестеронового теста, результативность осеменения повысилась на 12% по сравнению с осеменением без учета периода овуляции.

## 6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Предлагаем кинологическим организациям для практического испытания усовершенствованную среду для хранения спермы кобелей в охлажденном до 5°C состоянии, содержащую: вода дистиллированная – 100 мл; трис- (гидроксиметил) –аминометан – 3,25 г; лимонная кислота – 1,27 г; фруктоза – 1,25 г; цистеин – 8 мг; сухой соевый лецитин – 4 г; полиген – 30 мг.
2. Рекомендуем с целью повышения результативности искусственного осеменения сук свежеполученным и охлажденным семенем, проводить осеменение с учетом выявления овуляции с помощью прогестеронового теста (концентрация прогестерона в крови > 8 нг/мл).

## 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулаев, Ф. И. Некоторые биохимические аспекты действия селена на организм животных / Ф. И. Абдулаев. // Успехи современной биологии. – 1989. – Т.5. - Вып. 2(5). – С. 279-288.
2. Аллен, В. Э. Полный курс акушерства и гинекологии собак / В. Э. Аллен. – М. : Аквариум ЛТД, 1993. – 342 с.
3. Белоус, А. М. Замораживание и криопротекция / А. М. Белоус, Е. А. Гордиенко, Л. Ф. Резанов. – М. : Высшая школа, 1978. – 324 с.
4. Белоус, А. М. Молекулярные механизмы криоповреждений мембран / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко. // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Биофизика. – 1978. – т.9. – С. 80-113.
5. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев. // ВИНТИ. Сер. Биофизика. – 1991. – т.29. – С. .
6. Гусейнов, Т.М. Изучение влияния экзогенной супероксиддисмутазы на течение модельной патологии печени / Т.М. Гусейнов, Э.М. Насибов, А.И. Джафаров// Биохимия. – 2001. – т.55,вып.3. – С. 499-508.
7. Гуськов, А.М. Повышение репродуктивной способности животных методом ингибирования перекисного окисления липидов / А.М. Гуськов, Г.Е. Дарий, А.М. Пузина// Доклады ВАСХНИЛ. – 1993. – №4. – С. 71-73.
8. Добровольский, Г. А. Повышение эффективности искусственного осеменения коров криоконсервированной спермой / Г. А. Добровольский. // Автор диссертации, кандидат биологических наук, Лесные Поляны, МО. – 2009. – 20 с.

9. Дюльгер, Г. П. Физиология размножения и репродуктивная патология собак / Г. П. Дюльгер., - 2002. – 152 с.
10. Евдокимов, В. В. Влияние регуляторных пептидов на параметры эякулята человека / В. В. Евдокимов. и др. // Андрология и генитальная хирургия. – 2013. – №3. – С. 38-43.
11. Ерохин, А. С. Активность супероксиддисмутаза в сперме барана и быка при криоконсервации / А. С. Ерохин, И. Г. Коган, В. А. Барсель. // Сельскохозяйственная биология., – 1995. – №4. – С. 30-32.
12. Ерохин, А. С. Влияние антиоксидантных и санирующих препаратов на выживаемость семени собак при температуре 4°C. // А. С. Ерохин, Б. С. Сейдахметов, Е. С. Купляускас. // Селекция, кормление, содержание сельскохозяйственных животных и технология производства продуктов животноводства, труды ВНИИплем. – 2001. – вып.11. – С. 116-121.
13. Ерохин, А. С. Влияние восстановленного глутатиона на криоустойчивость семени козлов / А. С. Ерохин, И. Е. Приданова, С. А. Хатаев. // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2004. – №1. – С. 22-23.
14. Ерохин, А. С. Влияние восстановленного глутатиона на устойчивость семени хряков к хранению в охлажденном и замороженном состоянии / А. С. Ерохин, М. И. Дунин, Н. И. Федина. // Зоотехния. – 2013. – №9. – С. 31-32.
15. Ерохин, А. С. Влияние селена на воспроизводительную функцию животных / А. С. Ерохин. // ВНИИплем. – 2008. – . – С. 142.
16. Ерохин, А. С. Влияние тиолов на криоустойчивость спермы / А. С. Ерохин, И. Е. Чернова. // Овцеводство. – 1992. – №4. – С. 22-23.
17. Ерохин, А. С. Влияние холодового шока и глубокого замораживания на содержание АТФ в сперматозоидах собак. Селекция, кормление, содержание с-х. животных и

- технология производства продуктов животноводства / А. С. Ерохин, И. В. Лехмус, Б. С. Сайдахметов. // Труды ВНИИплем, М.О. – 1999. – вып.8. – С. 51-56.
- 18.Ерохин, А. С. Замораживание семени быков в среде с сухим соевым лецитином.// / А. С. Ерохин, Г. А. Добровольский. // Молочное и мясное скотоводство. – 2009. – №5. – С. 16-17.
  - 19.Ерохин, А. С. Использование свежей, охлажденной и криоконсервированной спермы при искусственном осеменении собак / А. С. Ерохин, И. Л. Квичко. // Сельскохозяйственная биология. – 1998. – №4. – С. 114-120.
  - 20.Ерохин, А. С. Методы стимуляции эструса у сук / А. С. Ерохин. // Ветеринария. – 2016. – №4. – С. 32-36.
  - 21.Ерохин, А. С. Определение содержания АТФ биolumинесцентным методом в сперматозоидах барана после криообработки / А. С. Ерохин, И. А. Лехмус. // Доклады РАСХН.. – 1996. – №1. – С. 32-34.
  - 22.Ерохин, А. С. Содержание антиокислительных ферментов в сперме собак до и после ее криоконсервации / А. С. Ерохин. // Доклады РАСХН. – 2004. – №1. – С. 37-39.
  - 23.Ерохин, А. С. Физиологические аспекты криорезистентности спермы баранов и быков// / А. С. Ерохин. // Дисс. докт.биол.наук.- Дубровицы, МО. – 1994. – . – С. .
  - 24.Ерохин, А. С. Хранение спермы баранов при температуре 16 °С / А. С. Ерохин, Б. С. Сейдахметов. // Зоотехния. – 1998. – №6. – С. 29-31.
  - 25.Иванов, И. И. Исследования на ферменты семенной жидкости собак / И. И. Иванов, Н. Н. Андреев. // Архив ветеринарных наук. – 1915. – кн.15. – С. 473-483.
  - 26.Квасницкий, А. В. Искусственное осеменение свиней / А. В. Квасницкий. // Киев, Урожай. – 1983.– 187 с.



- 27.Квичко, И. Л. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в криоконсервированной сперме собак / И. Л. Квичко. // Рукопись ВНИИТЭИ. – 1998. – №17563. – С. 3.
- 28.Козло, Н. Е. Учебная книга техника по искусственному осеменению животных / Н. Е. Козло, А. Н. Варнавский, Р. И. Пихоя. – М. : Агропроимиздат, 1987. – 256 с.
- 29.Кузнецова, Н. А. Первый ответ применения искусственного осеменения в каракулеводстве / Н. А. Кузнецова. // Проблемы животноводства. – 1932. – №5-6. – С. 86-90.
- 30.Купляускас, Е. С. Влияние породы, возраста и сезона года на воспроизводительную функцию сук / Е. С. Купляускас. // Селекция, кормление, содержание сельскохозяйственных животных и технология производства продуктов животноводства. Сб. трудов ВНИИплем.. – 1999. – вып.6. – С. 127-131.
- 31.Купляускас, Е. С. Влияние различных факторов на воспроизводительную функцию собак / Е. С. Купляускас. // Автореферат диссертации кандидата биологических наук. Лесные поляны, М.О.. – 2000. – 20 с.
- 32.Курбатов, А. Д. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных / А. Д. Курбатов. и др. – М. : Агропромиздат, 1988. – 256 с.
- 33.Ленинджер, А. И. Митохондрии. Молекулярные основы структуры и функции / А. И. Ленинджер. и др. – М. : Мир, 1966. – 160 с.
- 34.Милованов, В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных / В. К. Милованов. и др. – М. : Издательство с-х литературы и плакатов, 1962. – 696 с.
- 35.Милованов, В. К. Теория и практика воспроизведения животных / В. К. Милованов, И. И. Соколовская. – М. : Колос, 1984. – 271 с.

- 36.Милованов, В. К. Теория холодового удара живчиков млекопитающих / В. К. Милованов, И. И. Соколовская. – М. : Доклады ВАСХНИЛ., 1959. – с. 3-9.
- 37.Мингазов, Т. А. Воспроизведение сельскохозяйственных животных / Т. А. Мингазов. и др. – М. : Алма-Ата: Кайнар., 1988. – 168 с.
- 38.Мороз, Л. Г. Влияние состава диализной среды на показатели функциональной полноценности спермы хряков при охлаждении и замораживании / Л. Г. Мороз. и др. // Селекционно-биологические методы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных. Сб. научных трудов ВНИИРГЖ. – 1996. – С. 127-140.
- 39.Осташко, Ф. И. Причины и механизмы холодового удара клеток / Ф. И. Осташко. // Международный сельскохозяйственный журнал.. – 1964. – №3. – С. 106-109.
- 40.Платов, Е. М. Теоретические и практические основы замораживания семени производителей сельскохозяйственных животных / Е. М. Платов. // Автореф. Дис. канд. биол. наук. Дубровицы М.. – 1973. – 45 с.
- 41.Прокопцев, В. М. Действие унитиола на сперму хряков / В. М. Прокопцев, А. Рустенов, Л. Г. Мороз. // Сельскохозяйственная биология. – 1974. – т.9 №4. – С. 581-584.
- 42.Прокопцев, В. М. Технология искусственного осеменения свиней / В. М. Прокопцев. – Л. : Колос, 1981. – 160 с.
- 43.Пушкаръ, Н. С. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования / Н. С. Пушкаръ, А. М. Белоус, Ц. Д. Цветков. – М. : Киев, Наукова Думка, 1984. – 320 с.
- 44.Скаткин, П. Н. Температурный шок сперматозоидов жеребца / П. Н. Скаткин. –Доклады ВАСХНИЛ, - 1940. - №8 – с. 29-34
- 45.Советкин, С. В. Эффективность применения комплексных препаратов для санации спермы хряков / С. В. Советкин, В. Н.

- Родина, В. Т. Смирнов. // Тез.науч.-практ. конф. РАМЖ. Быково. – 1998. – 132 с.
- 46.Тарусов, Б. Н. Свободнорадикальные цепные реакции в липидах биологических систем / Б. Н. Тарусов. // М. – 1976. – с. 176-178.
- 47.Федотов, С. В. Андрология и гинекология животных и птиц / С. В. Федотов. – Барнаул : АГАУ, - 2009. – 219 с.
- 48.Федотов, С. В. Биотехника воспроизводства с основами акушерства животных / С. В. Федотов, В. С. Авдеенко, Ж. О. Кемешов. – М. : Издательство МГАВМиБ, 2014. – 131 с.
- 49.Федотов, С. В. Совершенствование диагностики состояния яичников у сук при различных стадиях полового цикла / С. В. Федотов, Н. И. Колядина, С. М. Борунова. – М. : Вестник Алтайского государственного аграрного университета 2014. - №8 – 135 с.
- 50.Хабибулин, И. Х. Сохранение спермы барана в условиях обратимой инактивации / И. Х. Хабибулин // Овцеводство. – 1965. – №8. – с. 9-11.
- 51.Шергин, Н. П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных / Н. П. Шергин. – М. : Колос, 1967 – 240 с.
- 52.Aalbers, O. G. ATP content of fresh and frozen-thawed boar semen and its relationship to sperm concentration and fertility / O. G. Aalbers, L. A. Jonson, -Smith E. A. Aalbers. – Uppsala : First Int. Cong. Deep Freezing Boar Semen., 1985. – 38-45 p.
- 53.Allen, W. E. Contrast radiographic study of the vagina and uterus of the normal bitch / W. E. Allen, C. A. France. – : J. Small Animal Prac., 1985. – 153 p.
- 54.Amann, R. P. Reproductive physiology and endocrinology of the dog / R. P. Amann. – Philadelphia: Saunders : Current Therapy in Theriogenology, 1986. – 523 p.

55. Amantea, G. Rassegna di studi sessuali iv, 306, / G. Amantea. // Am. J. Physiol., – 1924. – v.105. – p. 287-293.
56. Anderson, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique / K. Anderson. // Zuchthygiene. – 1975. – v.10. – p. 1-4.
57. Axener, E. Cryopreservation of dog semen in a Tris - extender with 1% or 2% soya bean lecithin as a replacement of egg yolk / E. Axener, E. Lagerson. // Reprod. Dom. Anim. – 2016. – v.51. – p. 262-268.
58. Bartlett, D. J. Glycolytic enzymes in spermatozoa and their leakage after shock / D. J. Bartlett. // J. Reprod. Fert., – 1962. – v.3. – p. 190-195.
59. Beccaglia, M. Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen / M. Beccaglia et al. // Reprod. Dom. Anim. – 2009. – v.44, Suppl.2. – p. 345-349.
60. Beijerink, N. J. Serotonin-antagonist-induced lowering of prolactin secretion does not affect the pattern of pulsatile secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the bitches / N. J. Beijerink et al. // Reproduction. – 2004. – v.128. – p. 181-188.
61. Bendof, R. Preservation of canine semen: preliminary observations / R. Bendof, N. Y. Chung. // Am. J. Vet. Sci. – 1958. – v.39. – p. 54-55.
62. Bouchard, G. F. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa mobility / G. F. Bouchard, J. K. Morris, J. D. Sikes. // Theriogenology, – 1990. – v.34. – p. 147-157.
63. Boucher, J. H. The evaluation of semen quality in the effect of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves / J. H. Boucher, R. H. Foote, R. W. Kirk. // Cornell Vet. – 1958. – v.67. – p. 86.
64. Brain, B. The use of frozen semen from dogs in Canada / B. Brain. // Can. Vet. J. – 1986. – v.27. – p. 161-163.

65. Brittain, D. Use of surgical intrauterine insemination to manage infertility in a colony of research German Shepherd dogs / D. Brittain. et al. // *Lab. Anim. Sci.* – 1986. – v.27. – p. 161-163.
66. Brown, R. An update of artificial insemination with fresh, chilled and frozen semen / R. Brown // *Problems of Veterinary Medicine.* – 1992. – v.4. – p. 445-453.
67. Brudel, R. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on human sperm mobility / R. Brudelet al.. // *J. Molecular Neuroscience.* – 2012. – v.48. – p. 623-630.
68. Christiansen, J. Reproduction in small mammals. Artificial insemination in dogs / J. Christiansen. // *Dansk Veterinartidssk Ritt.*, – 1990. – v.73. – p. 638-652.
69. Christiansen, P. Theviability, motility and fertility of bovine semen frozen in Triladyl and Biociphos plus / P. Christiansenet al . // *ESDAR Newsletter.* – 2000. – №5. – p. 25.
70. Concannon, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs` / P. W. Concannon. // *J. Reprod. Fertil.* – 1993. – v.43. – p. 3-27.
71. Concannon, P. W. Canine pregnancy and parturition / P. W. Concannon. // *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* – 1986. – №16. – p. 453-457.
72. Concannon, P. W. Oestrous induction in dogs / P. W. Concannon. // *Advances in Canine Reproduction.* – 1998. – Rep.3. – p. 21-26.
73. Concannon, P. W., Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog / P. W. Concannon, M. Temple. // *J. Reprod. Fertil.* – 1998. – v.39. – p. 3-25.
74. Concannon, P. W. Pregnancy in dogs and cats. In: (Knobil E., Neill J.) *Encyclopedia of Reproduction* / P. W. Concannon, J. Verstegen. // Academic Press, San Diego. – 1999. – 205 p.

75. Conchile, J. Diacyl and alkyl ester phospholipids in ejaculated porcine of spermatozoa / J. Conchile, T. Mann. // *Nature. Lond.* – 1957. – v.179. – p. 1190.
76. Darin-Bennet, A., The fatty acids and aldehydes of spermatozoan phospholipids / A. Darin-Bennet, A. Poulos. // *Proc. Austr. Biochem. Soc.* – 1973. – v.6. – p. 29-34.
77. Darin-Bennet, A. Influence of the cholesterol content of mammalian sperm on susceptibility to cold-shock / A. Darin-Bennet, I. White. // *Cryobiology.* – 1977. – v.14. – p. 466-470.
78. Doak, R. L. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch / R. L. Doak, A. Hall, H. E. Dale. // *J. Reprod. Fert.* – 1967. – v.13. – p. 51-58.
79. Ellington, J. E. Establishment of canine sperm and uterine tube epithelial cells / J. E. Ellington, V. N. Meyers-Wallen, B. A. Ball. // *Vet. Rec.* – 1995. – v.136. – p.542-543.
80. England, G. C. Factors affecting the vitality of canine spermatozoa / G. C. England, W. E. Allen. // *Theriogenology.* – 1992. – v.37. – p. 363-371
81. Hutchison, R. V. Vaginal and surgical intra-uterine deposition of semen / R. V. Hutchison. – *Proceeding of Canine Theriogenology Short Course* : , 1993. – p. 33-37
82. Inaba, T. Use of echography in bitches for detection of ovulation and pregnancy / T. Inaba, N. Masui, R. Shimizu. – *Vet. Record.* 1984. - v.115. – 276 p.
83. Iquer-Ouada, M. Long-term conservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory-prepared extenders / M. Iquer-Ouada, J. P. Verstegen. // *Theriogenology.* – 2001. – v.55. – p. 671-684.
84. Jalkanen, J. Artificial insemination of dog in Finland. 1991-1992 / J. Jalkanen. // *Suomen Elainlaarilehti.* – 1994. – v.100. – p. 450-455.

85. Jeffcoate, I. A. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentration, vaginale cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bithes / I. A. Jeffcoate, F. E. Lindsay. // J. Reprod. Fertil. – 1989. – v. 39. – p. 277-287.
86. Kawakami, E. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida / E. Kawakami et al. // Biol. Reprod. – 1993. – v. 48. – p. 841-845.
87. Kawakami, E. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid / E. Kawakami, T. Hori, T. Tsutsui. // J. Vet. Med. Sci. – 1998. – v. 60. – p. 197-202.
88. Kibble, R. M. Artificial insemination in dogs / R. M. Kibble. // Austr. Vet. J. – 1969. – v. 45. – p. 194-199.
89. King, T. E. Studies on the structure and function of lysozymes in animal semen / T. E. King, T. Mann. // Proc. Roy. Soc. B. – 1959. – v. 151. – p. 226-231.
90. Kooistra, H. S. Concurrent pulsatile secretion of LH and FSH during different stages of the estrus cycle and anestrus in beagle bithes / H. S. Kooistra et al. // Biol. Reprod. – 1998. – v. 60. – p. 65-71.
91. Kordan, W. Sperm mobility inhibiting factors (SMIF): a plasmatic peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa / W. Kordan et al. // Reprod. Dom. Anim. – 1998. – v. 33. – p. 347-354.
92. Kumi-Diara, J. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen / J. Kumi-Diara, G. Badtram. // Theriogenology. – 1994. – v. 41. – p. 1355-1366.
93. Levy, X. Determination the optimal time of mating in bitches: particularities / X. Levy, A. Fontbonne. // Rev. Bras. Reprod. Anim. – 2007. – v. 31. – p. 128-134.

- 94.Linde-Forsberg, C. Achieving pregnancy by using frozen or chilled extender semen / C. Linde-Forsberg. // Vet. Clin. Nort. Am. Small Anim. Prac. – 1991. – v. 21. – p. 467-485.
- 95.Linde-Forsberg, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog / C. Linde-Forsberg. // Sem. Vet. Med. Surgery. – 1995. – v.10. – p. 48-58.
- 96.Linde-Forsberg, C. Fertility in dog's relation to semen quality and the time and side insemination with fresh and frozen semen / C. Linde-Forsberg, M. Forsberg. // J. Reprod. Fertil., – 1989. – v.39. – p. 300-308.
- 97.Linde-Forsberg, C. Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study / C. Linde-Forsberg, HolstB. Strom, G. Govett. // Theriogenology. – 1999. – v.52. – p. 11-23.
- 98.Linde-Forsberg, C. Effects of whelping and season of the year on the interestrus interval in dogs / C. Linde-Forsberg, A. Wallen. // J. Small Anim. Pract., – 1992. – v.33. – p. 67-70.
- 99.Lindsay, F. E. The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy / F. E. Lindsay. // J. Small Anim. Pract. – 1983. – v.24. – p. 1-15.
100. Mann, T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract / T. Mann. // N-Y.. – 1964. – 370 p.
101. McBride, M. W. Ovarian function and FSH receptor characteristics during canine anestrus / M. W. McBride et al. // J. Reprod. Fertil. – 2001. – v.57. – p. 3-10.
102. Michael, A. J. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa / A. J. Michael, C. Alexopoulos, E. A. Pontiki. // Anim. Reprod. Sci. – 2009. – v. 112. – p. 119-135.



103. Monniaux, D. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals / D. Monniaux et al. // J.Reprod. Fertil. – 1997. – v.51. – p. 2-23.
104. Morton, D. B. Review on use of frozen semen in dog breeding / D. B. Morton. // Animal Technology. – 1986. – v.37. – p. 67-71.
105. Morton, D. B. Semen evaluation, cryopresevation and factor relevant to the use of frozen semen in dogs / D. B. Morton, S. G. Bruce. // J. Reprod. Fertil., – 1989. – v.39. – p. 311-314.
106. Moxon, R. Technical and financial evalution of assays for progesterone in canine practice in the UK / R. Moxon, D. Copley, G. C. England. // Vet. Rec., – 2010. – v. 167. – p. 528-531.
107. Moyle, W. R. Gonadotropins. In: Adashi E.Y., e.a. (eds). Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology / W. R. Moyle, R. K. Campbell. – Philadelphia : 1995. – 683 p.
108. Nizanski, W. Success of artificial insemination with fresh semen with the use of different methods` for determination of optimal insemination time in bitches / W. Nizanski, Z. M. Klimowic. // Medycyna Vet. – 2005. – v. 61. – p. 75-81.
109. Noden, D. The Embryology of Domestic Animals, Philadelphia / D. Noden, A. Delahunta. // – 1984. – 365 p.
110. Oettle, E. E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen / E. E. Oettle. // Animal Reprod. Sci. – 1986. – v.12. – p. 145-150.
111. Olar, T. T. Influence of extender, cryopreservation and seminal processing procedures on post thaw motility of canine spermatozoa frozen in straw / T. T. Olar, R. A. Bowen, B. W. Pickett. // Theriogenology. – 1989. – v. 31. – p. 451-461.
112. Olson, P. N. Reproductive endocrinology and physiology of the bitch / P. N. Olson, T. M. Nett. // Current Therapy in Theriogenology. – 1986. –p. 453-457.

113. Pardo-Carmona, B. Saliva crystallization as a means of determining optimal mating time in bitches / B. Pardo-Carmona et al. // J. Small Anim. Pract. – 2010. – v. 51. – p. 437-442.
114. Park, S. K. Enhancement of mouse sperm motility by trophinin-binding peptide / S. K. Park et al. // Reprod. Biol. Endocr. – 2012. – v.10. – p. 101-109.
115. Pena, F. J. Semen technologies in dog breeding: an update / F. J. Pena, I. Nunez-Martinez, J. M. Moran. // Reprod. Dom. Anim., – 2006. – v.41(Suppl.2), – p. 21-29.
116. Peneda, M. H. Dorsal median postcervical fold in the canine vagina / M. H. Peneda, R. A. Kainer, L. C. Faulker. // Am. J. Vet. Res. – 1973. – v. 34. – p. 1487-1491.
117. Phemister, R. D. Time of ovulation in the beagle bitch / R. D. Phemister, P. A. Holst, J. S. Spano. // Biol. Reprod. – 1973. – v.8. – p. 74-82.
118. Pinto, C. R. The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches / C. R. Pinto, B. E. Eilts, D. L. Paccamonti. // Theriogenology. – 1998. – v. 50. – p. 301-305.
119. Pinto, C. R. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen / C. R. Pinto, D. L. Paccamonti, B. E. Eilts. // Theriogenology. – 1999. – v.52. – p. 609-616.
120. Pratt, W. D. Effect of selenium supplementation on bull sperm metabolism in vitro.//W. D. Pratt, F. A. Muzzay, H. R. Conrad. // Theriogenology. – 1980. – v. 13. – p. 369-379.
121. Province, C. A. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5C / C. A. Province, R. P. Amann, B. W. Pickett. // Theriogenology. – 1984. – v.22. – p. 409-415.
122. Quinn, P. J. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa / P. J. Quinn, I. G. White. // J. Reprod. Fertil. – 1966. – v.12. – p. 263-270.

123. Rijesselaere, T. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa / T. Rijesselaere, SoomA., // *Theriogenology*. – 2002. – v.57. – p. 1669-1681.
124. Rijsselaere, T. Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation / T.Rijsselaere et al. // *Reproduction*. – 2004. – v. 128. – p. 801-811.
125. Rodrigues-Martinez, H. Use of hyaluronic acid for selection of frozen-thawed bull spermatozoa / H. Rodrigues-Martinez, A. Berrosteiguieta, L. Soderquist. // *12th Int. Congr. Anim. Reprod.*, – 1992. – v.1. – p. 520-522.
126. Rota, A. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a TRIS extender with or without Equex STM Paste / A.Rota et al. // *Theriogenology*. – 1999. – v. 51. – p. 1045-1058.
127. Rota, A. E. Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 C / A. E. Rota, B. Strom, C. Linde-Forsberg. // *Theriogenology*. – 1995. – v.44. – p. 885-900.
128. Sahashi, Y. Effect of butylated hydroxytoluence on dog sperm longevity in chilling storage and cryopreservation / Y. Sahashi, T. Otsuki, S. e. Higaki. // *J.Vet. Med. Sci.* – 2011. – v.73. – p. 895-899.
129. Seager, S. W. Conception rates and related data using frozen dog semen / S. W. Seager, C. C. Platz, W. S. Flether. // *J. Reprod. Fertil.*, – 1975. – v.45. – p. 189-192.
130. Shille, V. M. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotropins for induction of estrus and ovulation in the bitch / V. M. Shille, M. J. Thatcher, M. I. Lloyd. // *J. Reprod. Fertil.*, – 1989. – v.39. – p. 103-113.
131. Shutte, A. P. Practical aspect of A.I. in dog. Insemination of the bitch / A. P. Shutte. // *J.S. African. Vet. Med. Assoc.* – 1965. – v.38. – p. 349-354.

132. Siegel, E. T. Endokrine Krankheiten des Hundes Paul Parey / E. T. Siegel. // Berlin. – 1982. –p. 178-187.
133. Siegel, R. B. Effect of invitro selenium supplementation on bovine sperm motility / R. B. Siegel, F. A. Muzzay, W. E. Julien. // Theriogenology. – 1980. – v. 13. – p. 369-379.
134. Silva, L. D. Cervical opening in relation to progesterone and estradiol during heat in beagle bitches / L. D. Silva, K. Onclion, J. P. Verstegen. // J. Reprod. Fertil., – 1995. – v.104. – p. 85-90.
135. Silva, L. D. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch / L. D. Silva et al. // Theriogenology. – 1995. – v.43. – p. 615-623.
136. Smith, M. S. Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle. Pseudopregnancy and pregnancy in the dog / M. S. Smith, L. E. MacDonald. // Endocrinology. – 1971. – v.94. – p. 404-412.
137. Stabenfeldt, G. H. Reproduction in the dog and cat. In: H.H. Cole and P.T. Cupps (Ed.). Reproduction in Domestic Animals` / G. H. Stabenfeldt, V. M. Shille. // N-Y. – 1977. –p. 499-527.
138. Steinetz, B. G. Use of synthetic canine relaxin to develop a rapid homologous radioimmunoassay / B. G. Steinetz et al. // Biol. Reprod. – 1996. – v.54. – p. 1252-1260.
139. Stochner, P. K. The relationship of semen parameters to fertility in the dog / P. K. Stochner, C. Bardwick. // Canine Practice. – 1991. – v.16. – p. 15-23.
140. Suarez, S. S. Hyperactivated motility in sperm / S. S. Suarez. // J. Andrology. – 1996. – v.17. – p. 331-335.
141. Tani, H. Increasing gonadotropin-releasing hormone release by perfused hypothalamus from early to late anestrus in the beagle bitch / H.Taniet al. // Neurosci Letter. – 1996. – v.207. – p. 1-4.

142. Tash, J. S. Cyclic adenosine 3'5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagella motility / J. S. Tash, A. R. Means. // *Biology of Reproduction*. – 1983. – v.28. – p. 75-104.
143. Thatcher, M. I. Canine conceptus appearance and de novo protein synthesis in relation to the time of implantation / M. I. Thatcher, V. M. Shille, W. C. Buhi. // *Theriogenology*. – 1994. – v.41. – p. 1697-1692.
144. Thiangtum, K. Effect of catalase and superoxide dismutase on mobility, viability and acrosomal integrity of canine spermatozoa during storage at 5°C / K. Thiangtum, T. Hori, E. Kawakami. // *Thai J. Vet. Med.*, – 2012. – v.42. – p. 447-453.
145. Thibier, M. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination / M. Thibier, B. Guerin. // *Animal Reproduction Science*. – 2000. – v. 62. – p. 233-251.
146. Thomassen, R. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation / R. Thomassen, W. Farstad. // *Theriogenology*. – 2009. – v.71. – p. 190-199.
147. Tsutsui, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs / T. Tsutsui. // *J. Reprod. Fertil.*, – 1989. – v. 39. – p. 269-275.
148. Tsutsui, T. Prolonged duration of fertility of the dog ova / T. Tsutsui et al. // *Reprod. Dom. Anim.* – 2009. – v.44, Suppl.2. – p. 230-233.
149. Van, derWeyedenG. C. Physiological aspects of pregnancy and parturition in dog / derWeyedenG. C. Vanet al. // *J. Reprod. Fertil.*, – 1989. – v.39. – p. 211-224.
150. Van, HaaftenB. Induction of estrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine / Haaften B. Vanet al. // *J. Reprod. Fertil.* – 1989. – v.39. – p. 330-331.

151. Van, HaaftenB. Timing the mating of dogs on the basis of blood progesterone concentration / HaaftenB. Van, S. J. Dielman, A. C. Okkens. // *Veterinary Record*. – 1989. – v. 125. – p. 524-526.
152. Verstegen, J. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH / J. Verstegen, K. Onclin, L. Silva. // *J. Reprod. Fertil.*, – 1997. – v.3. – p. 35-40.
153. Ververidis, H. N. Use of enzyme-immunoassay for oestradiol-17 $\beta$  and progesterone quantification in canine serum / H. N. Ververidis, C. M. Boscos, A. Stefanakis. // *Anim. Reprod. Sci.*, – 2007. – v. 69. – p. 53-64.
154. Vizcarra, J. A. Effect of gonadotropin-releasing hormone (Gn-Rh) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone / J. A. Vizcarra, R. P. Wettemann, T. D. Braden. // *Endocrinology*. – 1997. – v.138. – p. 594-601.
155. Walles, S. S. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle / S. S. Walleset al. // *A. J. Vet. Res.*, – 1992. – v. 53. – p. 209-215.
156. Weitze, K. F. Prinzipien der spermauntersuchung + spermienmorphologie / K. F. Weitze, E. Muller. // *Kunstliche Besamung bei Nutztieren*. Ed. Bush W. – 1991. – 270 p.
157. Werhahn, F. Pregnancy rates of bitches after intravaginal and transcervical insemination with fresh semen / F. Werhahn, C. Urhausen, S. Schmid. // *Reprod. Dom. Anim.*, – 2015. – v. 50, suppl.1. –29p.
158. White, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review / I. G. White. // *Reprod. Fertil. Dev.* – 1995. – v. 5. – p. 639-658.
159. Whitney, L. F. The mating cycle of the dog / L. F. Whitney. // *Am. J. Physiol.* – 1927. – v. 105. – p. 287-293.

160. Wildt, D. E. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch / D. E. Wildt, P. K. Chakraborty, W. B. Panko. // Biol. Reprod., – 1978. – v.18. – p. 561-570.
161. Wilson, M. C. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen / M. C. Wilson. // J. Reprod. Fertil., – 1993. – v.47. – p. 307-311.
162. Yaniz, J. Effect of solid storage of sheep spermatozoa at 15 °C on their survival and penetrating capacity.// / J.Yanizet al.// Theriogenology. – 2005. – v. 64. – p. 1844-1851.
163. Yeager, A. E. Association between the preovulatory LH surge and the early ultrasonography detection of pregnancy and fetal heartbeats in beagle dogs / A. E. Yeager. // Theriogenology. – 1990. – v.34. – p. 655-665.