

*На правах рукописи*

**Лебедева Людмила Федоровна**

**МЕТОДЫ ОПТИМИЗАЦИИ ТЕХНОЛОГИИ ВОСПРОИЗВОДСТВА  
В ПЛЕМЕННОМ КОНЕВОДСТВЕ**

06.02.10 – Частная зоотехния, технология производства продуктов  
животноводства

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора  
сельскохозяйственных наук

Дивово - 2017

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

Научный консультант                      доктор сельскохозяйственных наук,  
профессор, академик РАН  
**Калашников Валерий Васильевич**

Официальные оппоненты:

**Алексеева Евгения Ивановна,**

доктор сельскохозяйственных наук, доцент кафедры крупного животноводства ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»

**Иванов Реворий Васильевич,**

доктор сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией технологии продуктивного коневодства ФГБНУ «Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафонова»

**Конвалова Галина Константиновна,**

доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры коневодства ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина»

Защита состоится «...» \_\_\_\_\_ 2017 года в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 006.018.01 ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» по адресу: 391105, Рязанская область, Рыбновский район, пос. Дивово, п/о Институт коневодства

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства», WWW.ruhorses.ru

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Готлиб М.М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность работы**

Интенсификация селекционного процесса в племенном коневодстве России является важнейшим условием развития отрасли, ее хозяйственной и социальной значимости, конкурентоспособности и возвращения стране утраченного в последние десятилетия статуса мировой коневодческой державы.

Лошади, в отличие от большинства других видов сельскохозяйственных животных, биологически имеют самый низкий коэффициент размножения и самую длительную смену поколений, что существенно ограничивает возможности эффективного отбора племенного материала и сокращает темпы селекции в породах. Поэтому, одним из определяющих факторов ускорения селекционного прогресса в коневодстве является высокий уровень организации воспроизводства племенного поголовья.

За последние 20 лет существенно пополнились фундаментальные знания в области физиологии размножения лошадей, появились более совершенные технические средства в сфере биотехнологий. В результате процесс воспроизводства поголовья в коневодческой отрасли вышел на более высокий теоретический и технологический уровень. Современные методы воспроизводства лошадей с учетом физиологических особенностей их репродуктивной системы предусматривают использование специальной аппаратуры, инструментов и материалов. На этом фоне возникла острая необходимость совершенствования сложившейся традиционной системы воспроизводства лошадей в отечественном коннозаводстве.

Главным условием успешного воспроизводства является качество племенного маточного поголовья, что определяет необходимость разработки эффективной системы оценки и отбора кобыл в производящий состав по их репродуктивным признакам на основе современных диагностических методов.

Внедрение в практику разведения лошадей адаптированных биотехнологических разработок должно способствовать не только росту показателей воспроизводства, как экономической категории коневодства, но и решению сложнейшей задачи тиражирования и сохранения уникальных генотипов лошадей, отвечающих возросшим требованиям их многогранного использования в спорте, досуге, иппотерапии, ипподромном бизнесе и иных сферах. С учетом ключевого значения воспроизводства лошадей в селекционном процессе разработка эффективных методов его оптимизации в нашей стране является крайне актуальной.

## **Степень научной разработанности проблемы**

Радикальным технологическим приемом интенсификации селекции в коневодстве была разработка и внедрение И.И. Ивановым в начале XX века метода искусственного осеменения кобыл. Труды отечественных ученых и практиков В.К. Милованова (1938, 1962), В.К. Кедрова (1938,1940), Х.И. Животкова (1937,1941,1952), А.А. Зальцмана (1939), Г.В. Паршутина (1939,1953), П.Н. Скаткина (1941,1950,1953) Н.Н. Михайлова (1949) метод был впоследствии усовершенствован и достиг широкомасштабного распространения. Созданная на основе открытия № 107 технология криоконсервации семени жеребцов неограниченно расширила географию применения искусственного осеменения в разведении лошадей и способствовала огромному селекционному прогрессу в отрасли. Важнейшую роль в создании современных технологий криоконсервации спермы жеребцов сыграли научные разработки П.Н. Скаткина, Т.И. Ильинской (1957), П.П. Печникова (1959), В.А. Румянцевой (1959), Е.С. Кружковой (1970), С.Я. Ромбэ (1967), Е.М. Платова (1971), А.И. Науменкова, Н.К. Романьковой (1971), А.И. Алиева (1975), Е.Л. Фоминой (1989). За рубежом технология криоконсервации семени жеребцов тоже активно совершенствовалась (О.С. Martin, E. Klug (1979), M. Tischner (1979), B.W. Pickett (1983, 2001), P.R. Loomis (1983, 2008), E. Palmer (1984), M. Vidament (2005), S. Barbacini (2006)). Это в конечном итоге привело к созданию собственных, отличных от российских, подходов к обработке, фасовке, замораживанию спермы жеребцов, что требует сегодня от отечественных специалистов владения зарубежными технологиями при осеменении кобыл импортной спермой.

Существенному повышению результативности случки и осеменения способствовали фундаментальные и прикладные исследования физиологических особенностей репродуктивной системы кобыл, фолликулогенеза и овуляции, оплодотворения и раннего эмбриогенеза у лошадей. В нашей стране значительный прогресс в раскрытии биологических механизмов этих процессов был достигнут благодаря научным трудам П.А. Волоскова (1940), Г.В. Паршутина (1950,1959), Г.Н. Архипова (1956), П.Н. Скаткина, А.Н. Буйко (1961), В.В. Ключева, С.М. Ромбе (1966), К.И. Мамина (1970), В.Г. Черных (2004) и др. Однако позднее инициатива была перехвачена зарубежными исследователями, среди которых наиболее весомый вклад в эту сферу знаний внесли W.R. Allen (1975, 2000, 2009), R.L. Pashen (1979), K.J. Betteridge (1982), O.J. Ginther (1983, 2004), E.M. Carnevale (1993), E.L. Gastal (2004), A.O. McKinnon (2011) и др. Последние данные зарубежных исследователей привели к переосмыслению привычных представлений и подходов к репродукции лошадей.

Немало содействовали росту эффективности воспроизводства лошадей успехи в разработке методов диагностики функционального состояния

половой системы кобыл: ректального, вагинального, цитологического, бактериологического (А.Ю. Тарасевич (1924), И.Т. Ратяпин, Н.М. Рязанцева (1936), Х.И. Животков (1937,1949,1952), В.К. Кедров (1938), П.А. Волосков (1939), Х.М. Крейнина (1940), М.А. Керов (1940), А.П. Студенцов (1950), Л.А. Храброва (1995), О.В. Баковецкая (1997), D. Brook (1985,1993), М.М. LeBlanc (2007), J. Dascanio (1997, 2014)). Но наиболее значимым и, по сути, революционным событием стало применение французским исследователем E.Palmer (1980) трансректального ультразвукового сканирования матки и яичников кобыл. Подробное изучение УЗ-признаков половых органов циклирующих и жеребых кобыл, развивающегося в матке плода, патологий репродуктивного тракта было проведено зарубежными исследователями О.Г. Ginther (1984,1995), E.L. Squires (1988), А.О. McKinnon (1988) и др. Новый подход позволил резко повысить эффективность воспроизводства лошадей за рубежом. В России ультразвуковой метод стал использоваться сравнительно недавно. Первые попытки его освоения и применения в отечественном коневодстве были предприняты в лаборатории физиологии размножения ВНИИК в конце 1990-х годов (С.Г. Лебедев, Е.В. Котельникова) (1998,1999). Однако разработчикам, по объективным причинам, не удалось до конца освоить все возможности данного метода и довести его до внедрения в практику, в то время как современные специалисты остро нуждаются в качественном руководстве по УЗ-диагностике репродуктивной системы кобыл.

За рубежом применяется комплексная оценка воспроизводительных качеств кобыл на основе использования вышеперечисленных диагностических методов (М.М. LeBlanc et al., 2003). Это позволило значительно улучшить качественный состав маточного поголовья и существенно повысить показатели воспроизводства. В России сегодня такая оценка не практикуется.

Исследованиями гормональной регуляции и разработкой методов управления воспроизводительной функцией кобыл с помощью гормонов в нашей стране успешно занимались К.И. Барулин (1932,1946), Б.М. Завадовский (1934,1937), Л.М. Мирская и В.В. Петропавловский (1937,1938), Ю.Д. Клинский (1967,1969), В.П. Гончаров (1971), С.Г. Лебедев (1977), А.И. Алиев (1980), Е.Л. Фомина, В.В. Андрюшин, М.Ю. Алексеев (1984,1987), Г.В. Филиппова (1999), Р.О. Логинов (2006) и др. За рубежом большой вклад в решение проблем воспроизводства лошадей гормональными методами внесли M.G. Evans (1976), С.Н. G.Irwin (1979), S.L. Alexander (1982), О.Г. Ginther (1992), R.W. Allen (2001) и др. В отечественной практике коневодства не преодолены проблемы с эффективным использованием гормонов в сфере размножения, поэтому разработка четких рекомендаций их применения для

оптимизации репродуктивного цикла у племенных кобыл остается весьма актуальной.

Отечественная технология трансплантации свежих эмбрионов лошадей была разработана в 1982 году С.Г. Лебедевым. В основу разработки положен нехирургический метод извлечения и пересадки эмбрионов японских авторов N. Oguri и Y. Tsutsumi (1974). Зарубежные исследователи продвинулись в эмбриотехнологиях дальше отечественных специалистов, разработав методы охлаждения и криоконсервации эмбрионов лошадей, которые расширяют возможности применения технологии эмбриопересадок и успешно используются в воспроизводстве, наряду с традиционными методами разведения лошадей.

Для достижения прогресса в сфере размножения лошадей в отечественном коневодстве необходимо обновить существующую систему воспроизводства, предоставить в распоряжение российских практикующих зоотехников и ветеринарных врачей новую сумму знаний и методов и предложить оптимальную систему организации репродуктивного цикла в современном коневодческом хозяйстве с применением физиологических, диагностических и биотехнологических методов. Лишь на такой основе возможно получение высоких результатов воспроизводства и максимально эффективное использование племенного поголовья лошадей.

#### **Цели и задачи исследования**

Целью исследований является совершенствование и оптимизация технологии воспроизводства лошадей в отечественном коннозаводстве на основе использования современных биотехнологических и физиологических методов и технических средств.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать эффективность технологий воспроизводства лошадей различных пород в России и за рубежом, изучить характер, распространение и результативность использования биотехнологических методов (искусственное осеменение и трансплантация эмбрионов) в мировой практике коннозаводства.

2. Разработать комплексную систему оценки репродуктивных качеств кобыл для отбора в производящий состав племенных хозяйств.

3. Оптимизировать схемы гормонального воздействия на организм с целью управления воспроизводительной функцией и ее коррекции у кобыл.

4. Усовершенствовать биотехнологические методы воспроизводства лошадей (искусственное осеменение и трансплантация эмбрионов) для повышения эффективности использования высокоценных племенных животных в отечественном коннозаводстве.

5. Разработать систему мониторинга состояния репродуктивной функции у кобыл, тестирования фаз полового цикла и жеребости, диагностики

результатов случки, осеменения и эмбриотрансплантации, контроля над развитием эмбриона с использованием ультразвукового метода (УЗИ).

6. Создать новую, отвечающую современным требованиям модель технологии воспроизводства высокоценного племенного поголовья лошадей для конных заводов Российской Федерации.

### **Научная новизна**

Впервые проведен сравнительный анализ технологии воспроизводства лошадей в России и за рубежом с учетом применения биотехнологических методов (искусственное осеменение и трансплантация эмбрионов) и способов естественной случки. Предложена система комплексной репродуктивной оценки и отбора кобыл в производящий состав на основе современных диагностических методов в качестве составной части технологии воспроизводства. Разработаны адаптированные отечественные методики культивирования, охлаждения и криоконсервации эмбрионов лошадей для последующей трансплантации кобылам-реципиентам. Разработана эффективная система УЗ-мониторинга состояния репродуктивной функции у кобыл для контроля овуляции, результатов случки/осеменения, состояния жеребости. Сформулирована концепция и предложен алгоритм рациональной организации воспроизводства племенного поголовья лошадей в конных заводах Российской Федерации, разработана модернизированная производственная технология.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты разработок по теме диссертации существенно углубляют научное представление о физиологических механизмах регулирования репродуктивной функции у кобыл, развивают учение о регуляторном действии гормонов на течение половых циклов, вносят вклад в совершенствование методики эмбриотрансплантации, дополняют знания о течении эмбриогенеза у лошадей.

Рекомендации производству на основе полученных научных данных позволяют существенно повысить качество и количество племенных лошадей в Российской Федерации за счет усовершенствованной технологии воспроизводства племенного поголовья, внедрения современных биотехнологических методов, более интенсивного использования кобыл в разведении, применения комплексной оценки репродуктивной функции кобыл при отборе в производящий состав, повышения эффективности контроля над результатами работы на всех этапах процесса воспроизводства.

Результаты научных разработок используются для пополнения теоретической и образовательной базы в области биотехнологии и физиологии размножения лошадей, а также для производства отечественных культуральных и криопротективных сред для культивирования, охлаждения и витрификации эмбрионов лошадей. В течение 2004-2016 годов с

использованием результатов научных исследований автором подготовлено около 100 отечественных и зарубежных специалистов-репродуктологов по программам послевузовского образования.

### **Методология и методы исследования**

Методологическую основу проведенной исследовательской работы составили общенаучные методы: индукция, дедукция, анализ, синтез, сравнение и обобщение теоретических и экспериментальных данных.

Эмпирическая часть исследований строилась на методах наблюдения, фиксации, измерения и описания биологических признаков, постановки экспериментов с использованием опытных и контрольных групп животных, оценки, измерения и мониторинга результатов опытов с применением математической статистики. Теоретический подход выражался в структурно-функциональной систематизации и классификации биологических и сельскохозяйственных признаков, моделировании усовершенствованной системы организации репродуктивного процесса в коневодстве. Схема исследований приведена на рисунке 1.

Исследования проводили в периоды с 1986 по 1990 и с 2002 по 2016 годы на базе экспериментальной конюшни ВНИИ коневодства, в конных заводах Рязанской области (Старожиловский, Рязанский), Тульской области (Прилепский), Брянской области (Локотской), Нижегородской области (Перевозский), и в частных коневодческих хозяйствах (А.А. Казакова, Воронцовский и др.). Опытное поголовье было представлено кобылами ахалтекинской, арабской, орловской рысистой, русской рысистой, тракененской, ганноверской, буденновской, донской, русской верховой, башкирской, бельгийской, русской и советской тяжеловозных пород и помесных лошадей в возрасте от 2 до 20 лет. Все кобылы содержались на общем или улучшенном рационе и имели нормальную упитанность.

По каждой кобыле собирали возможно более подробную информацию о ее плодовой деятельности и половой цикличности в предыдущие годы. Охоту у кобыл выявляли с помощью жеребца-пробника.

Комплексное исследование репродуктивных качеств кобыл включало: наружный осмотр, ректальную, вагинальную, мануальную, ультразвуковую, цитологическую и бактериологическую экспертизу. УЗИ яичников и матки кобыл проводили с помощью японского ультразвукового сканера марки Honda HS-2000 посредством ветеринарного трансректального линейного датчика HLV-375M на частоте 7,5 МГц.



Рисунок 1 - Схема исследований

Для цитологических исследований клеточный материал отбирали в период эструса, диэструса и овуляции. Образцы слизи фиксировали и окрашивали по Май-Грюнвальду. Анализ мазков проводили под световым микроскопом (X 400). Бактериологический анализ образцов слизи проводили в Рязанской областной ветеринарно-бактериологической лаборатории, Тульской межобластной ветеринарной лаборатории и независимой лаборатории «Инвитро» (региональные отделения).

Гормональный анализ (концентрация прогестерона) проводили в лаборатории «Инвитро». Забор крови для анализа осуществляли из яремной вены у кобыл перед утренним кормлением, с помощью вакуумных пробирок. Образцы крови центрифугировали в режиме 3000 оборотов в течение 15 минут, затем замораживали (хранение не более 1 месяца), после чего доставляли в лабораторию в замороженном виде.

Кобыл крыли или искусственно осеменяли свежим, охлажденным или заморожено-оттаянным семенем. В экспериментах использовали сперму отечественного (алюминиевые тубы по 5 и 15-20 мл, гранулы) и импортного (пластиковые соломинки по 0,5 мл) производства.

Осеменение проводили соответствующими технологии инструментами с обязательным контролем качества оттаянной спермы.

Эмбрионы получали нехирургическим методом по отечественной технологии (Лебедев С.Г., 1995) на 6,5-8,5 дни после овуляции от кобыл, покрытых проверенными по качеству спермы жеребцами или осемененных свежеполученным семенем. Уровень жизнеспособности эмбрионов после различных манипуляций проверяли методами морфологической оценки, дифференциального окрашивания и пересадки реципиентам.

Дифференциальное окрашивание эмбрионов проводили двумя методами: 1) витальным красителем голубой Эванса (0,05%), световая микроскопия (X 56-98), 2) флуо- и ДНК-красителями Hoechst 33342, FITC (fluorescein isothiocyanate), L/D RBCVK (live/dead Reduced Biohazard Cell Viability Kit) и PI (propidium iodide), люминесцентная и конфокальная микроскопия (K. Zeiss Axiovert 200 S10 Meta) на кафедре эмбриологии МГУ.

Для охлаждения эмбрионов использовали среды отечественного производства (НПП «Панэко», Москва): 1) среда Ham's F10, в которую добавляли буфер Hepes, и 2) готовая среда с буфером Hepes (Ham's F12+ Hepes). Криоконсервацию эмбрионов проводили двумя методами: программное замораживание на криогенном аппарате ЭМБИ-К производства института биофизики РАН (г. Пуцзино) и витрификация. В экспериментах были использованы среды собственного приготовления на основе фосфатно-буферного солевого раствора Дюльбекко (ФБС) и авторской МЖС-среды (50% стерилизованного кобыльего молока + 50% желтка куриного яйца), а также готовая среда импортного производства EquiPro® Vit-Kit™ (Minitube, Германия). В качестве криопротекторов использовали диметилсульфоксид

(ДМСО), глицерин (Гл), этиленгликоль (ЭГ), сахарозу (С) в разных соотношениях:

Среда 1 МЖС без криопротектора
Среда 2 (10-40% ДМСО) на МЖС+С
Среда 3 (10-40% ЭГ+ДМСО) на МЖС+С
Среда 4 (10% Г ) на МЖС
Среда 5 (10-40% ЭГ+ДМСО) на ФБС+С
Среда 6 (15-50% ЭГ+Г) на ФБС+С
Среда 7 (EquiPro® Vit-Kit™)

Во все среды на основе ФБС добавляли 3% фетальной сыворотки теленка (ФСТ) и санирующий препарат полиген (ЗАО «Мосагроген») в концентрации 300 мкг/мл.

Пересадку эмбрионов осуществляли нехирургическим методом реципиентам, синхронизированным с донором по фазе полового цикла (овуляция не ранее одного дня и не позднее трех дней овуляции донора).

Гормональную обработку кобыл осуществляли с целью вызова внеочередной охоты у кобыл, стимуляции овуляции, синхронизации половых циклов, поддержки жеребости, прерывания жеребости. Для этого использовали: 1) простагландин  $F_{2\alpha}$  (Магэстрофан, ЗАО Мосагроген) в дозе 0,7-1,0 мл однократно в/м, 2) человеческий хорионический гонадотропин (ХГЧ, хорулон) 1500-3000 МЕ внутривенно или внутримышечно, 3) прогестерон (2,5% масляный раствор, БиоХимФарм, Россия) 4 мл (100 мг) внутримышечно ежедневно до 45-70 дня жеребости.

По всем кобылам вели подробные записи о ходе и результатах исследований, анализов, проведенных процедур, пробы, случки/осеменения/эмбриотрансплантации и выжеребки. В сложных случаях при определении характера патологий и лечении гинекологических заболеваний кобыл пользовались консультациями ветеринарных специалистов.

Полученные в результате исследований данные обрабатывали статистическим методом по Е. К. Меркурьевой (1970) и с помощью компьютерных программ «Excel 2007» и «Statistica 6.0».

### **Связь работы с научными программами**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденными планами научных исследований Всероссийского НИИ коневодства в периоды с 1986 по 1990 и с 2002 по 2016 годы по темам государственного задания: «Разработать новые и усовершенствовать существующие методы повышения эффективности размножения основных заводских пород лошадей России»; «Разработать системы и способы содержания сельскохозяйственных животных, рыб, насекомых с целью создания новых технологий производства продукции животноводства»; «Разработать ресурсосберегающие технологии интенсификации производства продукции животноводства»;

«Усовершенствовать методы оценки репродуктивной функции кобыл, стадий эмбриогенеза, культивирования и хранения эмбрионов».

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

- Экономические, нормативные, биотехнологические, и иные значимые факторы детерминации эффективности технологий воспроизводства лошадей в России и за рубежом.

- Обоснование эффективности комплексной оценки репродуктивных качеств кобыл (ректальная, ультразвуковая, вагиноскопическая, цитологическая, бактериологическая экспертиза) в технологии воспроизводства племенного поголовья лошадей.

- Алгоритм использования гормонов (простагландин F<sub>2α</sub>, человеческий хорионический гонадотропин (ХГЧ) и прогестерон) в производственном репродуктивном цикле кобыл в племенном коневодстве.

- Результаты усовершенствования и практического применения биотехнологических методов в воспроизводстве лошадей (искусственное осеменение спермой, сохраненной в замороженном состоянии, трансплантация культивированных *in vitro*, охлажденных и замороженных эмбрионов).

- Система ультразвуковой диагностики состояния репродуктивных органов у холостых и жеребых кобыл в норме и патологии. УЗ-мониторинг подготовки, проведения и контроля результатов случки/осеменения кобыл, контроль над развитием эмбриона.

- Технологическая схема усовершенствованного производственного цикла воспроизводства поголовья лошадей для отечественного коннозаводства.

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

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на ежегодных заседаниях ученого Совета ФГБНУ «ВНИИ коневодства» (Дивово, с 2002 по 2016 годы), НТС секции животноводства Минсельхоза РФ (Москва, 2007), международных научно-практических конференциях: «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2004), «Трансплантация эмбрионов как инструмент селекции в новом тысячелетии (Киев, 2006), «Проблемы коневодства» (Новосибирск, 2008), «БиоТехЖ-2008» (Дубровицы, 2008), «Актуальные проблемы сохранения биоресурсов, селекции и разведения животных» (Киев, 2011), всероссийская молодежная научная школа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (Уфа, 2012), 64-й митинг Европейской ассоциации животноводства (ЕААР) (Франция, г.Нант, 2013), 30-й митинг Европейской Ассоциации по трансплантации эмбрионов (30<sup>th</sup> Annual Meeting А.Е.Т.Е.) (Германия, г. Дрезден, 2014), «Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы» (г. Пущино, 2014), международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва,

2015), «Актуальные вопросы развития отечественного коневодства в современных условиях» (РГАУ МСХА, Москва, 2016), «РосБиоТех-2017» (Москва, 2017), на международной выставке «Эквирос. 2015» (Москва, 2015), на пятом модуле курсов повышения квалификации «Основы размножения лошадей. Диагностика и лечение заболеваний репродуктивной системы лошадей» (Московская обл., КСК «Новый век», 2015).

#### **Личный вклад автора**

Автором лично проведены: сбор и анализ материалов о современном уровне воспроизводства в отечественном и зарубежном коннозаводстве, эффективности различных видов случки, характере и степени использования биотехнологических методов в репродуктивных технологиях в коневодстве; оценка состояния матки и яичников кобыл методами ректального, вагинального и ультразвукового исследования; забор образцов биоматериала (кровь, слизь) для проведения гормонального, цитологического и бактериологического анализов; приготовление цитологических мазков эндометриальной, цервикальной и вагинальной слизи кобыл; гормональная обработка кобыл; подготовка и проведение экспериментов по искусственному осеменению кобыл, извлечению, дифференциальному окрашиванию, культивированию, охлаждению и криоконсервации эмбрионов лошадей, пересадке эмбрионов кобылам-реципиентам; УЗ-мониторинг репродуктивной системы кобыл, выявление патологий воспроизводительных органов кобыл и лечение эндометритов. В общем объеме экспериментальной работы доля участия автора составила 95%.

В проведении экспериментальных исследований на различных этапах оказывали содействие сотрудники лаборатории физиологии ВНИИ коневодства: д-р биол. наук С.Г. Лебедев, науч. сотр. Н.В. Сидорова (трансплантация эмбрионов), ст. науч. сотр., канд. биол. наук М.М. Атрощенко (искусственное осеменение, гормональная обработка кобыл), доцент кафедры эмбриологии МГУ им. М.В. Ломоносова д-р биол. наук, профессор М.Л. Семенова (окрашивание эмбрионов флуоресцентными и ДНК-красителями, конфокальная лазерная микроскопия), д-р с.-х. наук Л.А. Храброва (окрашивание эмбрионов голубым Эванса), гл. зоотехник к/з А.А. Казакова С.Г. Бурмистрова (искусственное осеменение), зоотехник-селекционер ЗАО «Конный завод Локотской», канд. биол. наук Е.В. Солодова (комплексная репродуктивная оценка, наружный осмотр).

В сборе информации о показателях воспроизводства в российских конных заводах автор воспользовался помощью зав. отделом экономики ФГБНУ «ВНИИ коневодства В. С. Ковешникова и сотрудников отдела селекции: зав. отделом, канд. с.-х. наук Г. В. Калининной, канд. с.-х. наук М. И. Стародумова, канд. с.-х. наук Н. А. Купцовой, канд. с.-х. наук А. А. Николаевой, канд. с.-х. наук Н. В. Абрамовой, канд. с.-х. наук А. В. Борисовой, канд. с.-х. наук А. В. Дорофеевой, канд. с.-х. наук Л. Л.

Викуловой, ст. научн. сотр. В. А. Айдарова, ст. научн. сотр. А. И. Никоновой, научн. сотр. Г. В. Королевой, научн. сотр. В. В. Крешихиной, ветврача ООО «Башагроген» Д.Петрова.

Данные по состоянию воспроизводства лошадей за рубежом были существенно дополнены источниками, любезно предоставленными иностранными специалистами J. Monteiro, J. Walter, M. Cressent.

Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность научному консультанту – доктору сельскохозяйственных наук, профессору, академику РАН, заслуженному деятелю науки РФ, директору ФГБНУ «ВНИИ коневодства» В.В. Калашникову, отечественным и зарубежным коллегам за отзывчивость и помощь в работе.

**Публикации.** По результатам исследований опубликовано 72 научных работы, в том числе 18 статей в журналах, рецензируемых ВАК, 1 инструкция, 2 наставления, 1 пособие, 1 методические рекомендации, 1 авторское свидетельство.

#### **Структура и объем диссертации**

Работа состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, предложений производству и списка литературы, включающего 379 источников, в том числе 220 на иностранных языках, содержит 302 страницы компьютерного текста, 77 рисунков, 35 таблиц и 11 приложений.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** освещены наиболее значимые вехи в эволюции технологического процесса воспроизводства в коневодстве мира с акцентом на достижения последних 30 лет. Обоснована актуальность проблемы реформирования сложившейся системы репродукции лошадей в отечественном коннозаводстве. Поставлены цели и задачи исследования, выделены теоретическая, практическая значимость и научная новизна результатов работы. Описаны методология и методы исследований, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** приводится аналитический обзор и оценка технологий воспроизводства лошадей в зарубежном и отечественном коннозаводстве в аспекте трех способов размножения: естественная случка, искусственное осеменение и трансплантация эмбрионов. Прослежены основные тенденции в мировом коневодстве, выделены проблемы и перспективы организации воспроизводства лошадей в России и за рубежом. Описаны основные видовые особенности репродуктивной системы кобыл в свете последних открытий мировой биологической науки. Выделены физиологические причины пониженной плодовитости кобыл, в сравнении с самками других видов

сельскохозяйственных животных. Подробно изложены существующие естественные и искусственные методы воспроизводства лошадей, основные достижения, проблемы и перспективы их использования в коннозаводстве. В анализе искусственных технологий внимание уделено работе со свежим, охлажденным и криоконсервированным биоматериалом (сперма и эмбрионы), отмечены наиболее сложные и отличительные черты каждого метода. Рассмотрена схема гормональной регуляции половой системы кобыл в современном представлении и методы работы с гормонами для управления репродуктивной функцией у кобыл. Выделены и прокомментированы цели и случаи применения гормонов в воспроизводстве лошадей. Завершающая часть первой главы посвящена вопросам оценки репродуктивных качеств кобыл. Описаны различные диагностические подходы для определения функционального состояния половой системы, выявления патологий и прогнозирования дальнейшей плодовой деятельности кобыл. Обоснована необходимость применения комплексной репродуктивной оценки для отбора кобыл в производящий состав. Заключение первой главы констатирует необходимость обновления традиционной системы репродукции лошадей в отечественном коннозаводстве с учетом новых знаний и опыта, на основе современных диагностических методов и биотехнологий.

Во **второй главе** описаны этапы работы, поголовье опытных животных, диагностическая и лабораторная база, материалы и методы, использованные при проведении теоретических и экспериментальных исследований.

В **третьей главе** приведены результаты собственных экспериментальных исследований, полученные за 27-летний период научно-практической деятельности автора.

## **1 Технологии воспроизводства поголовья в коневодстве разных направлений**

На примере коневодческих хозяйств разных регионов страны с различными направлениями использования лошадей была изучена результативность отечественных технологий естественной случки кобыл (косячной, варковой, ручной) за последние годы (таблица 1).

В среднем по всему материалу уровни зажеребляемости кобыл в разрезе технологий случки выглядят по мере возрастания следующим образом: косячная – 79,9%, варковая – 80,1%, ручная – 86,4%. То есть, в ведущих конных заводах при ручной случке сегодня достигаются более высокие показатели, чем в изученных примерах использования косячной и варковой технологий случки, а также на 7-20% выше, чем в среднем по соответствующим породам по рассчитанными нами показателям. Следует подчеркнуть, что в этих заводах в ходе случной компании применяются, как минимум, два основных метода репродуктивной оценки кобыл (ректальная диагностика и УЗИ).

Таблица 1 - Показатели воспроизводства лошадей при различных видах случки

Хозяйство, порода лошадей	Годы	Кобыл, гол.	Зажеребляемость		Благ.выжеребка	
			п	%	п	%
<b>Косаячная случка</b>						
Республика Алтай, Алтайский край, новоалтайская	2004-2005	2964	2282	77,0	2252	76,0
	2013	1743	-	-	1254	71,9
Республика Ингушетия, терская	2010-2013	222	178	80,2	177	79,0
Ставропольский край, терская	2008-2012	105	87	82,6	78	74,2
Итого		5034	2547	79,9 <sup>1)</sup>	3761	75,3 <sup>1)</sup>
<b>Варковая случка (кобылы-биопродуценты СЖК<sup>2)</sup>)</b>						
ООО «Башагроген», Башкирия, башкир.	2010-2016	1396	1118	80,1	- <sup>3)</sup>	- <sup>3)</sup>
<b>Ручная случка (ведущие российские конные заводы)</b>						
к/з Восход, ч/к верховая	2010-2015	345	288	83,5 (76,7) <sup>4)</sup>	240	69,6
Волгоградский к/з, ч/к верховая	2010-2015	262	226	86,3 (76,7) <sup>4)</sup>	184	70,2
к/з АА. Казакова, орловская рысист.	2011-2015	109	96	88,1 (81,3) <sup>4)</sup>	73	67,0
Терский к/з № 169, арабская	2010-2016	614	510	83,1 (86,2) <sup>4)</sup>	454	73,9
Гергенбург к/з, Калинингр. обл. трак./ голш./ ганн.	2010-2015	227	204	90,0 (70,6-78,6) <sup>4)</sup>	151	66,5
к/з Локотской <sup>5)</sup> , русск., америк., франц. рысистые	2013-2016	582	510	87,6 (70,7) <sup>4)</sup>	453	77,8
Итого		2139	1834	86,4 <sup>1)</sup>	1471	70,8 <sup>1)</sup>
Примечание: <sup>1)</sup> расчет в среднем по хозяйствам; <sup>2)</sup> СЖК – сыворотка жеребой кобылы; <sup>3)</sup> показатель не учитывался; <sup>4)</sup> в среднем по породе; <sup>5)</sup> используется осеменение свежезятым, разбавленным семенем						

Вместе с тем, потери на этапе плодonoшения и выжеребки (абортy и мертворожденные) в конных заводах с высоким уровнем организации случки остаются весьма значительными (15,6%). Это, вероятно, является следствием

упущений в других технологических звеньях процесса воспроизводства, в частности, ослабления контроля над результатами случки.

Полученные данные позволяют заключить, что тренд зажеребляемости кобыл в результате применения разных технологий случки ориентирован на возрастание качественных показателей по мере роста технической оснащенности процесса от простого к более сложному: косячная, варковая, ручная. Вместе с тем, при всех технологиях случки главенствующее значение имеет уровень организации случной компании в хозяйстве и компетенция исполнителей. Важнейшей стороной воспроизводства также является качество маточного поголовья.

## 2 Комплексная оценка репродуктивных качеств кобыл

Были проведены исследования репродуктивной системы кобыл различными методами для разработки системы отбора кобыл в производящий состав.

**2.1 Наружный осмотр.** Тезис о непосредственной связи уклона линии «анус-вульва» больше  $10^\circ$  в краниальном направлении с вероятностью загрязнения полового тракта и снижением плодовитости у кобыл был проверен на поголовье маток в двух конных заводах (ЗАО «Конный завод Локотской» и ООО «Рязанский конный завод») (рисунок 2).

Результаты исследований плодовой карьеры кобыл в группах с нормальным (без уклона и меньше  $10^\circ$ ) и потенциально «проблемным» (уклон больше  $10^\circ$ ) строением вульвы не выявили достоверных различий в уровне зажеребляемости и благополучной выжеребки. Однако были получены достоверные данные ( $p < 0,05$ ) о связи этих показателей с возрастом кобыл во всех группах.

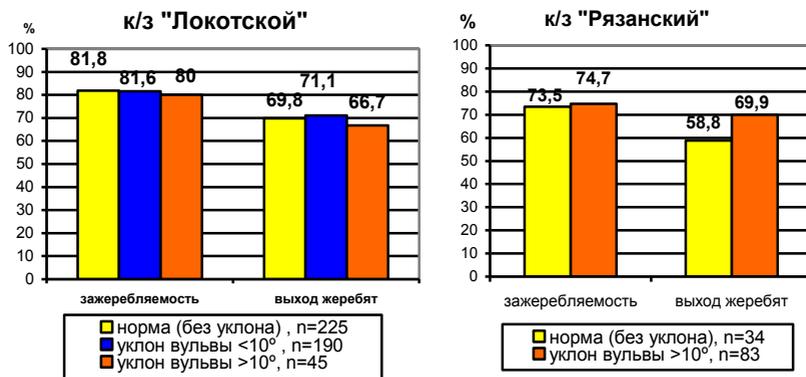


Рисунок 2 - Показатели плодовой деятельности кобыл, в зависимости от строения наружных половых органов (краниальный уклон вульвы)

Сделано заключение, что возрастная тенденция затягивания ануса и верхней части вульвы в краниальном направлении не связана напрямую со снижением фертильности и при условии нормальной работы остальных защитных барьеров генитального аппарата кобыл не препятствует их использованию в воспроизводстве.

**2.2 Ректальная пальпация.** На основе проведенных опытов в течение 27 лет (более 20000 исследований) было подтверждено, что метод ректальной диагностики (по Х.И.Животкову, Г.В.Паршутину, П.Н.Скаткину) остается базовым и высокоинформативным при исследовании функционального состояния матки и яичников кобыл, фазы полового цикла и жеребости. Было выделено 13 видов основных патологий репродуктивного тракта, диагностируемых ректальным методом, и выявлено 172 случая патологических отклонений от нормы. Показано, что при определенных видах патологий (посткоитальный эндометрит, частные случаи хронических гинекологических заболеваний, гематомы, геморрагические фолликулы, опухоли яичников) он малоэффективен и требует уточнения диагноза с помощью других методов исследования.

**2.3 Вагинальное исследование.** Поголовье исследованных кобыл составило 175 голов. Обнаружено 48 случаев и выделено 7 видов различных патологий, выявляемых данным диагностическим методом при исследовании преддверия влагалища, влагалища и шейки матки. Сделано заключение о том, что метод вагиноскопии в сочетании с мануальным исследованием влагалища и шейки матки обеспечивает дополнительную и важную информацию о полноценности протекания эстрального цикла, компетентности внутренних защитных барьеров полового тракта, наличии патологий, нарушающих воспроизводительную функцию кобыл.

**2.4 Цитологический анализ.** В период с 2006 по 2015 год были собраны и проанализированы данные об основных видах клеток из разных участков репродуктивного тракта кобыл в различные фазы полового цикла. Всего было приготовлено и протестировано 430 цитологических препаратов, составлена коллекция из 150 слайдов с характерными цитологическими признаками нормального и патологического состояния полового тракта кобыл с опорой на определенные виды клеток (эпителий, лейкоциты, эозинофилы, лимфоциты). Дано их описание в фазе развития и деградации. Исследования доказали простоту и информативность цитологического метода и подтвердили, что повышенное количество нейтрофилов в мазке (более 7-10 в поле зрения) является характерным признаком воспалительного процесса в генитальном тракте кобылы.

**2.5 Ультразвуковое исследование.** В итоге 8-летних наблюдений (2009-2016 годы) были проанализированы и систематизированы основные ультразвуковые характеристики матки и яичников кобыл в различные фазы половой активности, полового покоя или жеребости. Всего было проведено

более 4000 УЗ-экспертиз, изучено и систематизировано около 2000 эхограмм. Разработан алгоритм исследований и определены ключевые сроки проведения УЗ-экспертизы для жеребых и нежеребых кобыл. Составлены таблицы с описанием основных УЗ-признаков матки и яичников кобыл в различные фазы нормального полового цикла и жеребости. Отдельное внимание уделено систематизации УЗ-признаков при наиболее часто встречающихся патологиях. Показана приоритетная значимость метода УЗИ в системе оценки репродуктивных качеств кобыл.

**2.6 Бактериологический анализ.** Эндометриальные и цервикальные мазки были взяты у 26 кобыл с подозрениями на бактериальную инфекцию генитального тракта. Из 26 исследованных в лаборатории образцов 18 оказались положительными, в том числе 5 показали наличие грибов. Среди выявленных микроорганизмов подавляющее большинство составляла кишечная палочка (33,3%) и стафилококки (27,8%), реже присутствовали стрептококки (16,7%), энтерококки (5,6%), синегнойная палочка (5,6%). В том числе в образцах обнаруживались смешанные инфекции. По результатам тестирования выявленных микроорганизмов на чувствительность к антибиотикам выбирали вариант лечения кобыл. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что бактериологический анализ является опорным диагностическим методом в лечении гинекологических заболеваний кобыл и должен быть обязательной частью в системе репродуктивной оценки маточного поголовья.

**2.7 Комплексный подход.** На заключительном этапе работы были сопоставлены и проанализированы результаты 5 диагностических методов исследования. Всего была обследована 51 кобыла, в том числе 20 кобыл 4-10 летнего возраста и 31 кобыла 11-22 летнего возраста. Исходя из информативных критериев каждого метода, делали вывод по каждому из них о наличии или отсутствии признаков воспаления в половом тракте кобыл. Анализ полученных данных показал, что по всем пяти видам исследования результаты совпали в 8 случаях из 13 (69,2%) по четырем методам – в 22 случаях из 40 (55%), по трем видам – в 41 случае из 51 (80,4%). В наибольшей степени подтверждают друг друга УЗИ и вагиноскопия (87,2%), цитология и вагиноскопия (84,2%), ректальная диагностика и УЗИ (81,8%).

Была собрана информация о результатах лечения (или его отсутствия) и последующей зажеребляемости по 46 кобылам из 51 обследованных голов (таблица 2).

Результаты анализа по возрастным группам кобыл свидетельствуют о высокой эффективности проведенного лечения как на молодых, так и на возрастных кобылах. Однако, среди кобыл, не прошедших лечения, в группе старшего возраста итоговый показатель благополучной выжеребки на 23,3% ниже, чем у более молодых, за счет 4-х случаев ранней эмбриональной гибели плода. У кобыл без признаков воспаления полового тракта разницы в уровне

благополучной выжеребки между молодыми и старыми особями не наблюдается (60%), но в старшей группе отмечена 1 эмбриональная гибель. Таблица 2 – Показатели воспроизводства кобыл с учетом их комплексной репродуктивной оценки и результатов лечения

Возрастные группы и категории кобыл	Показатели воспроизводства, гол.(%)			
	с лечением		без лечения	
	n	зажер./благ. выж.	n	зажер./благ.выж.
от 4 до 10 лет				
проблемные	10	9(90,0) / 8(80,0)	3	1(33,3) / 1(33,3)
здоровые	-	-	5	3(60,0) / 3(60,0)
от 11 до 22 лет				
проблемные	13	12(92,3) / 11(84,6)	10	5(50,0) / 1(10,0)
здоровые	-	-	5	4(80,0) / 3(60,0)
Всего, в т.ч.	23	22(91,3) / 21(82,6)	23	13(56,5) / 8(34,8)
проблемные	23	22(91,3) / 21(82,6)	13	6(46,2) / 2(15,4)
здоровые	-	-	10	7(70,0) / 6(60,0)

На основании результатов работы была составлена таблица основных патологий эстрального цикла и жеребости кобыл, выявляемых различными диагностическими методами (таблица 3).

Результаты комплексных исследований показали, что каждый из пяти используемых диагностических методов (ректальный, ультразвуковой, вагиноскопический, цитологический и бактериологический) имеет как свои достоинства, так и недостатки при применении в разных случаях заболеваний половой сферы у кобыл, но явным преимуществом среди них обладает метод УЗИ. Поэтому для оценки репродуктивных качеств кобыл рекомендуется использовать комплексный подход, который обеспечивает полный и разносторонний анализ проблем субфертильности/бесплодия и составляет основу для их устранения.

Лечение кобыл, назначенное по результатам комплексной оценки, обеспечивает их высокую последующую зажеребляемость и благополучную выжеребку (до 80-85%).

### **3 Использование гормонов в производственном репродуктивном цикле в коневодстве**

Одним из важнейших инструментов управления репродуктивным процессом в коневодстве является гормональное воздействие на кобыл. Были исследованы возможности применения трех отечественных гормональных препаратов (магэстрофан, ХГЧ и прогестерон) в различных случаях для повышения результативности и уровня показателей воспроизводства конского поголовья.

Таблица 3 - Разрешающие способности различных диагностических методов при определении основных репродуктивных патологий у кобыл

Виды репродуктивных патологий	Выявляется (+) или не выявляется (-) следующими методами исследования						
	наружн. осмотр	ректальная пальпация	УЗИ	вагинальный осмотр		цитология	бак. анализ
с зеркалом				мануально			
<b>Нежеребые кобылы</b>							
воспалительные процессы органов	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+
посткоитальный эндометрит	-	-	+	-	-	-	-
разрывы, спайки, рубцы вульвы, влагалища и шейки матки	+/-	-	-	+	+	-	-
воздух в матке (пневмовагина)	-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-
влагалищный варикоз	+/-	-	-	+	+/-	-	-
персистентная девственная плева	+/-	-	-	+	+	-	-
паровариальные кисты	-	+/-	+	-	-	-	-
маточные кисты	-	-	+	-	-	-	-
лютеинизация фолликула	-	-	+	-	-	-	-
гематома яичника	-	+/-	+	-	-	-	-
овариальные опухоли	-	+/-	+	-	-	-	-
персистентное желтое тело	-	-	+	-	-	-	-
инфантильная матка и яичники	-	+	+	-	-	-	-
<b>Жеребые кобылы</b>							
слабый тонус матки	-	+	-	-	-	-	-
отставание эмбриона в развитии	-	-	+	-	-	-	-
эмбриональная гибель	-	+/-	+	-	-	-	-
выраженный отек в матке	-	-	+	-	-	-	-
двойня	-	+/-	+	-	-	-	-
отсутствие сердцебиения плода	-	+/-	+	-	-	-	-

**3.1 Простагландин  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ).** За 15-летний период (2001-2016 годы) препарат Магэстрофан ( $PGF_{2\alpha}$ ) было обработано 59 нежеребых и 30 жеребых кобыл. Препарат холостым кобылам вводили не ранее 6 дня после овуляции. Результаты гормональной обработки свидетельствуют, что однократное введение  $PGF_{2\alpha}$  вызывает наступление охоты у холостых кобыл на 3-4 день, и овуляции - на 8-9 день после инъекции (таблица 4).

Таблица 4 - Сроки наступления охоты и овуляции у кобыл после однократной инъекции  $PGF_{2\alpha}$

Фазы цикла	Число кобыл, n	Сроки, день
Наступление охоты	54	3,78±0,14
Наступление овуляции	59*	7,91±0,26
Интервал между началом охоты и овуляцией	48	4,40±0,03

Примечание: \*учтены 2 случая лютеинизации фолликула

Использование  $PGF_{2\alpha}$  на кобылах для прерывания жеребости дает неоднозначные результаты (таблица 5).

Таблица 5 - Результат воздействия простагландина  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) в зависимости от срока жеребости у кобыл

Тавро/кличка, группа кобыл	Кобыл, n	Инъекция(и) $PGF_{2\alpha}$ , на сроке жеребости, дней	Наступление охоты после инъекции(й) $PGF_{2\alpha}$ , день
Группа 1, в т.ч.	21	6,5-28	3,81±0,31
подгруппа а)	10	6,5-20	4,40 ±0,22
подгруппа б)	11	21-28	3,27±0,53
Группа 2, в т.ч.	3	34-36	2-20
04-02		34	2
01-00		34	20
05-92		36	14
Группа 3, в т.ч.	6	46-87	-
Речка		46	Жер. **
07-02		51,57,61,64	Жер.
01-00		60,67,74, 84,85,86,87	Жер. 130
09-02		59,60,61	141
06-00		65,66,67	125
01-02		68,69,70,71	3 (1 день*), 28(1 день*), 86
Итого	30		

Примечание: \*продолжительность охоты; \*\* осталась жеребой

В частности, для прерывания нежелательной или проблемной жеребости у кобыл на сроках до 34-35 дня достаточно 1 инъекции (07,-1 мл PGF<sub>2α</sub>, внутримышечно).

После 45-50 дня (формирование дополнительных желтых тел) требуется проводить курс ежедневных инъекций PGF<sub>2α</sub> в течение 2-4 дней. После стимулированной эмбриональной гибели на сроках 35 дней и позднее охота у кобыл существенно задерживается, вплоть до завершения цикла работы эндометриальных чаш (100 дней жеребости и более с индивидуальной вариабельностью).

**3.2 Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ).** Были проанализированы данные ХГЧ-обработки 48 кобыл в 63 половых циклах, в том числе повторные на некоторых кобылах в 2-3-х случных сезонах подряд (таблица 6).

Таблица 6 - Частота и время наступления овуляции у кобыл после обработки ХГЧ в различных дозировках с учетом диаметра фолликула

Размер фолликул а, мм	Число овуляций после инъекции ХГЧ*				Время наступления овуляции, ч
	n	в т.ч. в интервале времени, n (%)			
		до 24 ч	24-36 ч	36-48 ч	
1500 МЕ ХГЧ					
33-37	6	0 (0)	0 (0)	6 (100)	39,4±1,59 <sup>a</sup>
38-41	14	0 (0)	0 (0)	14 (100)	38,1±0,81 <sup>b</sup>
42-47	17	5 (29,4)	11 (64,7)	1 (5,9)	25,9±1,95 <sup>c</sup>
Всего	37	5 (13,5)	12 (32,4)	20 (54,1)	32,7±0,96
2000-3000 МЕ ХГЧ					
33-37	8	1 (12,5)	3 (37,5)	4 (50,0)	34,1±2,62 <sup>d</sup>
38-41	10	1 (10,0)	4 (40,0)	5 (50,0)	33,0±2,36 <sup>e</sup>
42-47	6	3 (50,0)	3 (50,0)	0 (0)	22,3±4,27 <sup>f</sup>
Всего	24	5 (20,80)	10 (41,7)	9 (37,5)	30,7±1,61

Примечание: \* хорионический гонадотропин человека;  
a,c p>0,95; b,c p>0,95; d,f p>0,95; e,f p>0,95

На основании результатов проведенных исследований была предложена корректировка по дозировке и схемам применения ХГЧ на кобылах. Наиболее точный прогноз овуляции в интервале 36-48 часов после инъекции ХГЧ достигается при воздействии препарата в дозе 1500 МЕ (внутримышечно или внутривенно) при величине фолликула 38-41 мм. Даны рекомендации по режиму ректальных и УЗ-экспертиз при подготовке кобылы к осеменению свежим, охлажденным и криоконсервированным семенем после введения препарата.

**3.3 Прогестерон.** Результаты исследования уровня прогестерона в крови кобыл (n=21) в первые 1,5 месяца жеребости показали, что это величина индивидуальная и весьма вариабельная (рисунок 3).

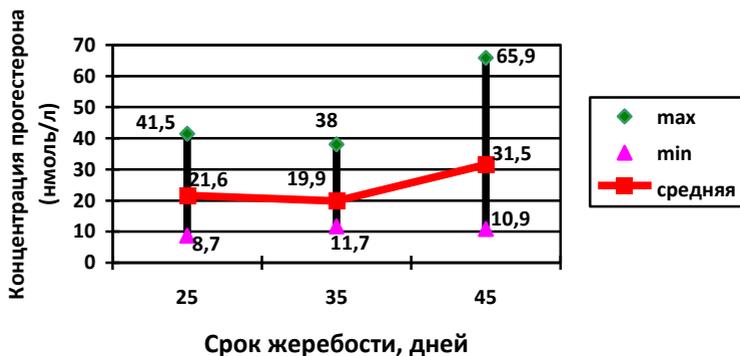


Рисунок 3 - Уровень прогестерона в крови кобыл на ранних сроках жеребости

Между 35-м и 45-м днями нормальной жеребости концентрация прогестерона в крови у кобыл возрастает. Была отмечена высоко достоверная разница ( $p > 0,999$ ) между средними показателями по этим группам. Исключение составили три кобылы, у которых впоследствии произошла эмбриональная гибель. Был сделан вывод о том, что падение уровня прогестерона на указанном сроке может рассматриваться, как угроза потери жеребости и основание для применения гормональной поддержки (прогестиновой терапии).

Были проведены исследования о пользе прогестиновой поддержки жеребости у кобыл (n=16) с УЗ-признаками отставания в развитии эмбриона. Результаты показали, что курс ежедневных инъекций прогестерона до 45-го дня жеребости (и далее) оказывает положительный эффект на нормальный исход жеребости (благополучная выжеребка – 68,8%).

В результате данных исследований были предложены схемы гормональной обработки кобыл тремя препаратами отечественного производства (простагландин  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), человеческий хорионический гонадотропин (ХГЧ) и прогестерон (ПГ) в следующих случаях: инициирование очередного эструса, стимуляция овуляции, прерывание жеребости, поддержка жеребости, синхронизация половых циклов донора и реципиента в программах искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов. Предложенные гормональные методы обеспечивают полный цикл работ по оптимизации воспроизводительной функции у кобыл. Не менее важным аспектом в

репродукции лошадей является совершенствование и оптимизация искусственных (биотехнологических) методов разведения.

#### 4 Искусственное осеменение кобыл замороженным семенем

В задачу исследований входило определение значимости различных факторов, влияющих на результат искусственного осеменения племенных кобыл замороженно-оттаянным семенем (таблица 7). В обработку были включены данные по 106 половым циклам кобыл верховых и рысистых пород, в которых проводилось искусственное осеменение криоконсервированной спермой жеребцов отечественного и зарубежного производства специалистами высокого уровня (участие автора -50%).

Таблица 7 - Результаты осеменения кобыл криоконсервированной спермой, в зависимости от различных факторов

Кобыл (циклов)	Зажеребляемость		ЭГ*	Благополучная выжеребка, %	
	гол.	%	гол.	от зажеребевш.	от осемененн.
<b>Активность спермы</b>					
1,5 балла и выше					
59	46	78,0±5,39 <sup>a</sup>	7	84,8±5,29	66,1±6,16 <sup>c</sup>
ниже 1,5 баллов					
28	5	17,9±7,24 <sup>b</sup>	1	80,0±17,88	14,3±6,61 <sup>d</sup>
<b>Гинекологическое состояние кобыл</b>					
без видимых отклонений					
18	16	88,9±7,40 <sup>e</sup>	3	81,2±9,77	72,2±10,56 <sup>g</sup>
патологии (жидкость или воздух в матке, выделения из вульвы, ПКЗ**)					
18	7	38,9±11,49 <sup>f</sup>	3	57,1±18,70	22,2±9,80 <sup>h</sup>
<b>Время осеменения</b>					
менее чем за 12 часов до овуляции					
20	13	65,0±10,67	1	92,3±7,39	60,0±10,95
во время овуляции					
21	11	52,4±10,90	2	81,8±10,70	42,9±10,80
в течение 6 часов после овуляции					
65	44	67,7±5,80	7	84,1±5,51	56,9±6,14
Примечание: * эмбриональная гибель; ** посткоитальный эндометрит, a,b p<0,001, c,d p<0,001, e,f p<0,001, g,h p<0,01					

Среди 5 факторов, оказывающих влияние на результат осеменения (технология замораживания (фасовка) и активность спермы, время осеменения относительно овуляции, репродуктивная группа (молодые, холостые, подсосные, после аборта) и исходное гинекологическое состояние кобыл), наиболее важными факторами, достоверно (p<0,001) определяющими

успешный результат искусственного осеменения криоконсервированной спермой, оказались 2 фактора: высокое качество (активность) семени жеребца, замороженного по любой технологии, и отсутствие патологий воспроизводительной системы кобылы.

Было показано, что осеменение кобыл замороженным семенем в течение 6 часов после овуляции обеспечивает высокую результативность (зажеребляемость в одном цикле  $67,7 \pm 5,8$  %) и существенную экономию в расходовании дорогостоящих доз спермы жеребцов.

Специальными исследованиями (таблица 8) было выявлено, что в послеродовую (первую после выжеребки) хоту кобылы (67 голов, 91 цикл) имеют достоверно ( $p < 0,01$ ) более низкий процент зажеребляемости и благополучной выжеребки, чем в последующие циклы, как для естественно покрытых ( $n=57$ ), так и осемененных замороженной спермой ( $n=34$ ) кобыл.

Таблица 8 - Результаты случки/ осеменения ожеребившихся кобыл

Вид случки	Кобыл, циклов	Зажеребляемость		ЭГ*	Благ. выжеребка, %	
		n	%	n	от зажер.	от случен.
Первая (послеродовая) охота						
ЕС**	29	19	$65,6 \pm 8,82^a$	1	$94,7 \pm 3,83$	$62,1 \pm 9,01^e$
ИО з.с.***	5	0	$0^b$	-	-	$0^f$
Всего	34	19	$55,9 \pm 7,56$	1	$94,7 \pm 3,83$	$52,9 \pm 8,56^l$
Вторая охота						
ЕС	22	21	$95,5 \pm 4,45^c$	0	100%	$95,5 \pm 4,45^g$
ИО з.с.	18	7	$38,9 \pm 11,49^d$	1	$85,7 \pm 8,25$	$33,3 \pm 11,10^h$
Всего	40	28	$70,0 \pm 4,74$	1	$96,4 \pm 2,94$	$67,5 \pm 7,41$
Третья охота						
ЕС	6	5	$83,3 \pm 15,23$	0	100%	$83,3 \pm 15,23$
ИО з.с.	11	7	$63,6 \pm 13,90^p$	0	100%	$63,6 \pm 13,90^q$
Всего	17	12	$70,6 \pm 11,05$	0	100%	$70,6 \pm 11,05$
Итого на конец года						
голов	67	59	$88,1 \pm 3,79$	6	$89,8 \pm 3,94$	$79,1 \pm 4,97^j$
циклов	91		$64,8 \pm 5,0$		-	-
в т.ч. ЕС	57	45	$79,0 \pm 10,46^k$	5	$88,9 \pm 4,68$	$70,2 \pm 6,06^m$
ИО з.с.	34	14	$41,2 \pm 8,44^l$	1	$92,9 \pm 6,86$	$38,2 \pm 8,33^n$

Примечание: \* эмбриональная гибель; \*\* естественная случка; \*\*\* искусственное осеменение замороженной спермой; а,с  $p < 0,01$ ; b,d  $p < 0,01$ ; a,b  $p < 0,001$ ; c,d  $p < 0,001$ ; e,f  $p < 0,001$ ; g,h  $p < 0,05$ ; i,j  $p < 0,001$ ; k,l  $p < 0,01$ ; m,n  $p < 0,001$ ; b,p  $p < 0,001$ ; p,q  $p < 0,001$

Осеменение кобыл замороженным семенем в 1-ю и 2-ю охоту после выжеребки дает достоверно более низкие результаты ( $p < 0,001$ ), чем естественная случка, а также более высокий процент эмбриональной гибели.

## 5 Трансплантация эмбрионов лошадей

Проведены исследования по трем основным направлениям эмбриотрансплантации: культивирование, охлаждение и криоконсервация эмбрионов. Всего за период 2001-2016 гг. было выполнено 536 процедур нехирургического извлечения эмбрионов из матки кобыл-доноров, в которых удалось получить 286 (53,4%) эмбрионов для опытов.

**5.1 Культивирование эмбрионов in vitro.** Кандидатская диссертация автора была посвящена разработке метода культивирования эмбрионов лошадей in vitro. В экспериментах (1986-1989 годы) было использовано 66 эмбрионов.

Итогом работы стал предложенный способ культивирования поздних бластоцист лошадей в авторской культуральной среде, состоящей из 0-60%, кобыльего молока, 20-60% куриного желтка и/или 20-60% фосфатного солевого буфера Дюльбекко (МЖС). Метод обеспечивает нормальный рост и развитие 8-8,5-дневных эмбрионов лошадей в МЖС-среде при 37°C в течение 1-2 суток, что было подтверждено двумя успешными пересадками прокультивированных эмбрионов.

**5.2 Оценка качества эмбрионов методом дифференциального окрашивания.** Для экспериментальной работы с эмбрионами лошадей были апробированы методы их дифференциального окрашивания флуоресцентными и ДНК-красителями и витальным красителем голубой Эванса для определения степени повреждения клеток после различных воздействий на основе принципа селективной проницаемости мембран у живых и мертвых клеток (таблица 9).

Результаты экспериментов показали принципиальную возможность оценки качества эмбрионов лошадей (n=9) с помощью флуоресцентных и ДНК-красителей (3 – условно живые и 6 – погибшие).

Усовершенствованная автором методика микроскопирования эмбриона (X 56-98), окрашенного витальным красителем голубой Эванса, позволила с высокой точностью определять уровень жизнеспособности эмбрионов (n=74) после различных манипуляций по пропорции окрашенных (погибших) и не окрашенных (живых) клеток. Лишь после достижения в опытах высокой сохранности клеток в эмбрионах по результатам окрашивания голубым Эванса переходили к пересадке эмбрионов кобылам-реципиентам.

**5.3 Охлаждение эмбрионов.** Эксперименты по охлаждению эмбрионов (n=17) показали, что готовая среда отечественного производства (Nam's F12 с буфером Нерес, производство НПП «Панэко», Москва) с добавлением белкового и saniрующего ингредиентов поддерживает эмбрионы лошадей в жизнеспособном состоянии при плюс 5°C в течение 24 часов. Наиболее подходящей фазой для хранения эмбрионов в гипотермических условиях, по результатам окрашивания, является возраст 7,5-8 суток, когда размер

эмбриона укладывается в диапазон 450-800 мкм. Пять пересадок эмбрионов этой группы принесли в двух случаях положительный результат (40%).

**5.4 Криоконсервация эмбрионов.** Были проведены эксперименты по определению воздействия 1) криопротектора и 2) режима замораживания (медленный и ультрабыстрый) на сохранность клеток в эмбрионе после оттаивания (таблица 9).

Таблица 9 - Результаты оценки качества эмбрионов на различных этапах криоконсервации методами дифференциального окрашивания

Среды	n	Диаметр эмбрионов, мкм	Результат окрашивания, % мертвых клеток
<b>Окрашивание витальным красителем голубой Эванса</b>			
Контроль, свежие эмбрионы:			
Оценка 4-5	5	160-850	0%
(жизнеспособный)	5	160-1000	0-30%
Оценка 3 (сомнительный)	10	150-1250	100%
Оценка 1-2 (погибший)			
<b>Проводка по криопротекторам без замораживания</b>			
Среда 5 (ЭГ+ДМСО) на	4	<350	1-25%
ФБС+С	3	>350	15-80%
<b>Программное замораживание</b>			
Среда 5 (ЭГ+ДМСО) на	3	<350	2-50%
ФБС+С	2	>350	35-55%
<b>Витрификация</b>			
Среда 2 (ДМСО) на МЖС+С	2	480-960	0%
Среда 3 (ЭГ+ДМСО) на	3	950-1275	35-80%
МЖС+С			
Среда 4 (Г) на МЖС	4	640-950	10-95%
Среда 5 (ЭГ+ДМСО) на	6	<350	5-70%
ФБС+С	5	>350	30-98%
Среда 6 (ЭГ+Г) на ФБС+С	5	<350	3-5%
	5	650	40%
Среда 7 (EquiPro® Vit-Kit™)	1	650	2-3%
<b>Окрашивание флуо- и ДНК-красителями</b>			
Среда 5 (ЭГ+ДМСО) на ФБС + С	7	400-625	1-живой, 1-условно живой, 5-погибшие
Среда 3 (ЭГ+ДМСО) на МЖС	2	600	1-условно живой, 1-погибший
Итого	69	-	-

Было апробировано 6 вариантов криопротективных сред (см. методику). Опыты с поэтапным введением-выведением (0%-10%-20%-30%-40%-30%-20%-10%-0%) криопротектора (среда 5) без замораживания показали, что клетки начинают гибнуть в эмбрионе уже на этапе насыщения криопротектором. Кроме того, эмбрионы крупнее 350 мкм в диаметре более уязвимы по отношению к стресс-фактору, чем эмбрионы меньшего диаметра. Та же закономерность прослеживалась и в эмбрионах после замораживания-оттаивания (среда 5).

Сравнение двух методов свидетельствовало в пользу более щадящего воздействия медленного программируемого режима охлаждения. Но у трех из пяти замороженных в таком режиме эмбрионов после оттаивания оболочка оказалась поврежденной.

Итоги работы по трансплантации витрифицированных эмбрионов представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Результаты пересадки эмбрионов, замороженных методом витрификации в различных средах

Витрификационные среды	Число пересадок, n	Диаметр эмбрионов, мкм	Зажеребляемость, %
Среда 1 МЖС <sup>1)</sup> без криопротектора	1	600	0 (0/1)
Среда 2 (ДМСО <sup>5)</sup> ) на МЖС	17	380-960	0 (0/17)
Среда 3 (ЭГ <sup>3)</sup> + ДМСО) на МЖС	3	725-950	0 (0/3)
Среда 4 (Г <sup>4)</sup> ) на МЖС	5	640-1700	0 (0/5)
Среда 5 (ЭГ+ДМСО) на ФБС <sup>2)</sup>	7 11	<350 >350	0 (0/7) 0 (0/11)
Среда 6 (Г+ЭГ) на ФБС+С <sup>6)</sup>	4	<350	50.0 (2/4)
Среда 7 (EquiPro® Vit-Kit™)	9	<350	11.1 (1/9)
Контрольная пересадка свежих эмбрионов	2	880-960	100 (2/2)
Итого	68	-	-

Примечание: <sup>1)</sup> авторская культуральная среда : 50% молока+50% желтка; <sup>2)</sup> фосфатно-солевой буферный раствор Дюльбекко; <sup>3)</sup> этиленгликоль; <sup>4)</sup> глицерин; <sup>5)</sup> диметилсульфоксид; <sup>6)</sup> сахара

При апробации зарубежной технологии “Vit-Kit” была получена одна зажеребляемость в 10 пересадках эмбрионов. Неудачи в остальных опытах по этой методике, возможно, были связаны с несоблюдением режима хранения сред при транспортировке в Россию.

После пересадки 4 эмбрионов, витрифицированных в среде собственного приготовления (среда 6), было получено 2 зажеребляемости (50%). В результате, в 2012 году во ВНИИ коневодства родились первые в России жеребята от пересадки замороженных эмбрионов.

## **6 Контроль над результатами случки, искусственного осеменения и эмбриотрансплантации, УЗ-мониторинг жеребости**

В итоге 7-летних (2009-2016 годы) исследований (мониторинг 85 жеребых кобыл, более 2000 УЗ-экспертиз) была предложена схема последовательных действий и описание характерных УЗ-признаков матки и яичников кобыл на разных сроках жеребости. Было показано, что УЗИ матки и яичников кобыл является основным методом контроля за протеканием жеребости. Описана методология определения пола плода между 55 и 75 днем жеребости. Выявлены и сгруппированы в таблицу ультразвуковые характеристики матки и яичников жеребых кобыл при различных репродуктивных патологиях. Представлена методика выявления двойнёвой жеребости и удаления лишнего эмбриона. Рекомендованы ключевые сроки для проведения УЗ-экспертиз в первые 2 месяца жеребости (14, 17, 20, 30, 37, 48,60-65 дни), позволяющие оценить состояние эмбриона в соответствии со шкалой развития, вовремя выявить отставание в росте и другие патологии, подлежащие коррекции.

## **7 Схема организации производственного цикла размножения лошадей в современных условиях**

На основе результатов собственных исследований и передового практического опыта работы в области размножения лошадей предложена эффективная схема производственного репродуктивного цикла в коневодстве с использованием современных физиологических, биотехнологических и диагностических методов (рисунок 4).



## Выводы

1. Сравнительным анализом современного современного технологий воспроизводства в отечественном и зарубежном коннозаводстве, проведенном на обширном статистическом материале, полученном из актуальных информационных источников и первичных данных зоотехнической отчетности племенных хозяйств, выявлены основные технологические факторы, которые определяют достижение максимальных показателей по зажеребляемости кобыл, благополучной выжеребке и выходу молодняка. Установлено, что высокий технологический уровень организации воспроизводства в лучших племенных хозяйствах обеспечивает дополнительный прирост данных показателей на 7-20%.

2. В результате исследования доказано, что тренд показателя зажеребляемости кобыл в отечественном племенном коневодстве при разных технологиях случки отражает его возрастание по мере роста технической оснащенности процесса воспроизводства от простого к более сложному: косячная случка, варковая, ручная. В среднем уровни зажеребляемости кобыл в разрезе технологий случки выглядят следующим образом: косячная – 79,9%, варковая – 80,1%, ручная (в ведущих конных заводах) – 86,4%. Вместе с тем, при использовании любой технологии случки главенствующее значение имеет правильная организация случной компании в хозяйстве, компетенция исполнителей и оптимизация методов воспроизводства.

3. Как установлено, опережающий селекционный прогресс в породах лошадей спортивного назначения в странах с развитой конной индустрией был достигнут при активном использовании методов искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов, о чем свидетельствуют широкие масштабы их применения. Так, в спортивном коневодстве Франции и Германии до 90% кобыл осеменяют искусственно (в 2014 году во Франции учтено 29814 осеменений, в том числе 25% замороженным семенем). В США в 2011 году было проведено 6122 пересадки эмбрионов лошадей. Эти показатели многократно превышают объемы использования биотехнологических методов в Российской Федерации.

4. Экспериментально установлено, что наиболее важными факторами, достоверно ( $p < 0,001$ ) определяющими успешный результат искусственного осеменения кобыл, являются качество семени жеребца, замороженного по любой технологии (гранулы, тубы, соломины), и отсутствие патологий воспроизводительной системы у маток. Осеменение кобыл криоконсервированным семенем в течение 6 часов после овуляции обеспечивает такую же зажеребляемость в одном цикле ( $67,7 \pm 5,8$  %), как и осеменение за 12 часов до овуляции ( $65,0$ %), что очень важно учитывать на

фоне высокозатратных показателей процесса воспроизводства в элитном коннозаводстве.

5. Экспериментальные данные свидетельствуют, что репродуктивный статус кобыл оказывает существенное влияние на результат случки/осеменения. В первую послеродовую охоту кобылы имеют достоверно более низкий процент зажеребляемости и благополучной выжеребки, чем в последующие циклы, как при естественной случке ( $p < 0,01$ ), так и при осеменении замороженно-оттаянной спермой ( $p < 0,01$ ). Осеменение кобыл криоконсервированным семенем в первые две охоты после выжеребки дает достоверно более низкие результаты ( $p < 0,001$ ), чем естественная случка, а также более частые случаи эмбриональной гибели.

6. В опытах доказано, что эффективность процесса воспроизводства может быть в целом обеспечена тремя гормональными препаратами: магэстрофан ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), ХГЧ (хорионический гонадотропин человека) и прогестерон. Высокий эффект применения препаратов достигается при использовании разработанных схем системного гормонального воздействия на организм кобыл в процессе реализации репродуктивных технологий.

7. Экспериментально установлено, что необходимым условием достижения высоких показателей воспроизводства является применение методики отбора кобыл в маточный состав по репродуктивным качествам на основе комплексной диагностики функционального состояния их репродуктивной системы. Результаты исследований показали, что для выявления основных гинекологических проблем при проведении репродуктивной оценки кобыл целесообразно использовать ректальный, вагиноскопический, ультразвуковой, цитологический и бактериологический методы диагностики. При этом доказана наиболее высокая эффективность лечения кобыл по результатам комплексного диагностического обследования с применением всех указанных методов диагностики.

8. Разработанная в данном исследовании технология мониторинга эстрального цикла и результатов случки/осеменения кобыл на основе применения метода ультразвуковой диагностики состояния матки, яичников и эмбриона/плода позволяет с абсолютной точностью определить на момент исследования актуальную фазу полового цикла, факт овуляции, наличие или отсутствие жеребости, двойнёвости и эмбриональной гибели, а также основных репродуктивных патологий, что позволяет максимально оптимизировать процесс воспроизводства в племенном коневодстве Российской Федерации на основе применения биотехнологических методов.

9. Составленные на основании большого числа экспериментальных наблюдений таблицы диагностических ультразвуковых признаков эмбриона/плода лошади на определенных стадиях развития и предложенные контрольные сроки проведения УЗ-экспертиз (14-й, 17-й, 20-й, 30-й, 37-й,

48-й и 60-65-й дни жеребости), позволяют своевременно выявить ту или иную патологию и принять соответствующие корректирующие меры (прерывание или гормональная поддержка жеребости, удаление лишнего эмбриона и др.), что является инновационным биотехнологическим инструментом для отечественных специалистов-репродуктологов.

10. В развитие ранее разработанной и усовершенствованной с участием автора отечественной технологии извлечения и пересадки свежих эмбрионов лошадей предложены оригинальные методы культивирования, охлаждения и витрификации (ультрабыстрого замораживания) эмбрионов с использованием авторских сред оригинального состава и способа приготовления: среда для 24-часового культивирования (37°C) 8-8,5-дневных эмбрионов (молочно-желточно-солевая - МЖС), среда для 24-часового гипотермического хранения (плюс 5°C) 7,5-8-дневных эмбрионов (Ham's F12+Нерес), среда для витрификации 6,5-7-дневных эмбрионов (глицерин, этиленгликоль, сахароза, фосфатно-солевой буфер).

11. Усовершенствованная методика оценки эмбриона лошади, окрашенного витальным красителем голубой Эванса, в ходе микроскопического исследования позволяет определять уровень повреждения клеток после различных воздействий, повышать достоверность прогноза качества ранних эмбрионов при разработке новых репродуктивных технологий.

12. Результаты настоящей аналитической и экспериментальной работы позволяют существенно повысить показатели воспроизводства поголовья лошадей в племенных хозяйствах Российской Федерации на основе оптимизации технологии с применением методов: комплексной репродуктивной оценки маточного поголовья, отбора кобыл в селекционную группу, подбора доноров и реципиентов, набора биотехнологических репродуктивных методов с использованием свежего, охлажденного и замороженного биоматериала (сперма, эмбрионы), а также средств гормональной обработки кобыл и современных диагностических приборов и технических средств.

### **Практические рекомендации**

Для оптимизации технологии воспроизводства в племенном коневодстве Российской Федерации и повышения качественных показателей рекомендуется использовать в практике коннозаводства изданные по результатам научных исследований практические рекомендации автора:

1. Инструкция по искусственному осеменению и трансплантации эмбрионов лошадей (Дивово, 2012). Рассмотрена и одобрена научно-техническим советом МСХ РФ 22 декабря 2006 года.

2. Наставление по культивированию эмбрионов лошадей (Дивово, 2014). Одобрено на секции коневодства Отделения зоотехнии Россельхозакадемии 7 декабря 2006 года.

3. Методические рекомендации «Способ приготовления сред для витрификации эмбрионов лошадей (Дивово, 2014). Одобрено на секции коневодства Отделения зоотехнии Россельхозакадемии 11 декабря 2012 года.

4. Наставление по витрификации эмбрионов лошадей (Дивово, 2014), секции коневодства Отделения зоотехнии Россельхозакадемии 24 сентября 2013 года.

5. Пособие для специалистов «Ультразвуковая диагностика репродуктивной системы кобыл в норме и патологии» (Рязань, 2016 г.), Рассмотрено и одобрено на заседании Ученого Совета ФГБНУ «ВНИИ коневодства» 28 декабря 2015 года.

### **Публикации по теме диссертации**

#### ***Научные статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, входящих в Перечень ВАК МОиН Российской Федерации***

1. Лебедева, Л. Ф. .О пользе УЗИ в аспекте двойности у лошадей /**Л. Ф. Лебедева** // Коневодство и конный спорт. - 2007. - № 2. - С. 35-36.

2. Лебедева, Л. Ф. ДНК-красители и флуоресцентная микроскопия для определения жизнеспособности клеток в эмбрионах лошадей после криоконсервации /М. Л. Семенова, **Л. Ф. Лебедева** // Вестник РАСХН.-2009. - № 5.-С. 65-67.

3. Лебедева, Л. Ф. Значимость комплексного подхода к оценке воспроизводительных качеств кобыл /**Л. Ф. Лебедева**, А. Б. Дубровская // Коневодство и конный спорт.-2010.- № 6. - С.13-15.

4. Лебедева, Л. Ф. Трансплантация эмбрионов лошадей: ретроспективный анализ и современное состояние основных аспектов технологии / **Л. Ф. Лебедева** // Коневодство и конный спорт. – 2011. - № 1. - С. 14-17.

5. Лебедева, Л. Ф. Модифицирующее влияние ультрадисперсной металлополимерной композиции «медь-железо-цинк» на биохимические показатели крови кобыл в случной период / О. В .Баковецкая, **Л. Ф. Лебедева**, А. А. Терехина // Коневодство и конный спорт» . – 2011 . - № 3. - С. 14.

6. Лебедева, Л. Ф. Физиологическая и ультразвуковая характеристика нормального эстрального цикла кобыл / **Лебедева Л. Ф.** // Коневодство и конный спорт. – 2012 . - № 1. - С. 16-18.

7. Лебедева, Л. Ф. Ультразвуковые характеристики различных фаз беременности у кобыл / **Лебедева Л. Ф.** // Коневодство и конный спорт. – 2013. - № 2. - С. 14-16.

8. Лебедева, Л.Ф. Изучение длительности сроков хранения семени жеребцов в состоянии анабиоза / В. А. Науменкова, **Л. Ф. Лебедева**, М. М. Атрощенко, Р. А. Халилов, Т. Н. Рябова // Коневодство и конный спорт. - 2013. - №5. - С. 15-17.

9. Лебедева, Л. Ф. ЕАЖ-2013:новости науки / Л. А. Храброва, **Л. Ф. Лебедева** // Коневодство и конный спорт. – 2013. - № 5. - С. 19-21.

10. Лебедева, Л. Ф. Ультразвуковые характеристики матки и яичников кобыл при различных репродуктивных патологиях / **Л. Ф. Лебедева** // Коневодство и конный спорт. –2013. - № 6. - С. 15-18.

11. Лебедева, Л.Ф. А.Е.Т.Е. 2014 – новости науки / **Л. Ф. Лебедева** // Коневодство и конный спорт. - 2014. - № 5. – С. 29-31.

12. Лебедева Л. Ф. Оплодотворяемость кобыл в послеродовую охоту / **Л. Ф. Лебедева**, С. Г. Бурмистрова // Коневодство и конный спорт. - 2015. - № 3. С. 15-17.

13. Лебедева, Л. Ф. Основные факторы, влияющие на результативность осеменения кобыл спермой, криоконсервированной по российским и зарубежным технологиям / **Л. Ф. Лебедева**, М. М. Атрощенко, С. А. Бурмистрова //Сельскохозяйственная биология. - 2015.-т. 50.-№ 4.-С.476-485.

14. Лебедева Л.Ф. Цитологическая характеристика генитального тракта кобыл в различные фазы полового цикла / **Л. Ф. Лебедева** // Коневодство и конный спорт. - 2015. - № 6. - С. 29-31.

15. Лебедева, Л. Ф. Уровень воспроизводства лошадей в российском коннозаводстве / **Л. Ф. Лебедева** // Коневодство и конный спорт. - 2016. - № 5. - С. 8-11.

16. Лебедева, Л. Ф. Уровень воспроизводства лошадей за рубежом / **Л. Ф. Лебедева** // Коневодство и конный спорт. - 2016. - № 6. - С. 10-13.

17. Лебедева, Л. Ф. Анализ плодовой деятельности кобыл с различной конфигурацией наружных половых органов / **Л. Ф. Лебедева**, Е. В. Солодова // Коневодство и конный спорт.- 2017. - № 2. – С. 27-30.

18. Лебедева Л.Ф. Использование хорионического гонадотропина для стимуляции овуляции фолликулов у кобыл /**Л.Ф. Лебедева**, М.М. Атрощенко // Ветеринария. – 2017. - №5. – С. 35-38.

#### *Публикации в других изданиях*

19. Lebedeva, L. Culture of equine embryos in media containing EGG yolk, mare's milk and saline: preliminary results /Lebedev S., **Lebedeva L.** //Theriogenology. – 1994. –V. 41. - № 6. - p. 1201-1206.

20. Лебедева, Л.Ф. Экспресс-оценка жизнеспособности эмбрионов методом витального окрашивания /Л.А.Храброва, **Л.Ф.Лебедева** //Резервы повышения эффективности коневодства и коннозаводства. Сб. науч. тр. – ВНИИ коневодства. – Рыбное. – 1987. – С.74-75.

21. Лебедева, Л.Ф. Культивирование экспандированных бластоцист лошади /С.Г.Лебедев, **Л.Ф.Лебедева** // Интенсификация селекции и технологии выращивания лошадей. - Рыбное, [Ряз. обл.], 1988. - С. 202-209.

22. Лебедева, Л.Ф. Сравнение роста эмбрионов лошади in vivo и in vitro / Л.Ф.Лебедева // Современное состояние и перспективы развития науч. исслед. по коневодству. пос. Рыбное, 1989. - С. 70-71.

23. Лебедева, Л.Ф. Контроль МЖС - среды по показателям рН и осмотического давления / Л.Ф.Лебедева //: Новое в технологии коневодства и коннозаводства: сб. науч. тр. / ВНИИ коневодства. - Рыбное, 1990 (1991). - С. 80-87.

24. Лебедева, Л.Ф. Использование витальных красителей для оценки качества эмбрионов / Л.А.Храброва, С.Г.Лебедев, **Л.Ф.Лебедева** // Новое в технологии коневодства и коннозаводства: сб. науч. тр. / ВНИИ коневодства. - Рыбное, 1990(1991). - С. 166-173.

25. Лебедева, Л.Ф. Влияние импульсного магнитного поля на воспроизводительную функцию кобыл с гинекологическими заболеваниями / **Л.Ф. Лебедева**, М.Ю.Алексеев, Л.А.Храброва, // Пути повышения плем., спортив., рабочих и продуктив. качеств лошадей: сб. науч. тр. / ВНИИ коневодства. – Рыбное, 1992. - С. 169-172.

26. Лебедева, Л.Ф. Перспективы развития исследований в области биологии размножения лошадей в XXI веке / С.Г.Лебедев, **Л.Ф.Лебедева** // Перспективы коневодства России в 21 в.: тез. докл. науч. – практ. конференции и координац. совещания, посвящ. 70-л. ВНИИ коневодства. - Дивово, 2000. - Ч.1. - С.63-66.

27. Лебедева, Л.Ф. Актуальность и перспективы криобиологических исследований в аспекте трансплантации эмбрионов лошадей / Л.Ф.Лебедева // Науч. основы сохранения и совершенствования пород лошадей: сб. науч. тр. / ВНИИ коневодства. – Дивово, 2002. – С.104-107.

28. Лебедева, Л.Ф.Использование диметилсульфоксида в качестве криопротектора при сверхбыстром замораживании эмбрионов лошади / **Л.Ф.Лебедева**, Н.В.Сидорова, Ю.Л.Ошуркова // Проблемы сохранения генофонда, повышения племенных и продуктивных качеств заводских и местных пород лошадей: тезисы. - Дивово, 2003.- С.51-53.

29. Лебедева Л.Ф. Развитие эмбрионов лошади в зародышевый период / Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева** // Проблемы развития коневодства и конного спорта в России: материалы междунар. науч.- практ. конференции. – Новосибирск, 2003. – С.78-81.

30. Лебедева Л.Ф. Раннее эмбриональное развитие лошадей / Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева**, Н.В.Сидорова // Материалы 4-й науч. – практ. конференции по болезням лошадей. – М., 2003. – С.92-97.
31. Лебедева, Л.Ф. Развитие эмбриона лошади на 2-3-й неделе жеребости / Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева** // Проблемы сохранения генофонда, повышения племенных и продуктивных качеств заводских и местных пород лошадей: тезисы. - Дивово, 2003.-С.55-58.
32. Лебедева, Л.Ф. Критические стадии в раннем эмбриогенезе лошадей / Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева**, Н.В.Сидорова // Орловская рысистая порода в 2003 году. – Дивово, 2004. – С.162-168.
33. Лебедева Л.Ф. Морфологическая характеристика эмбрионов лошади в зародышевый период / Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева** // Актуальные вопросы ветеринарной медицины / Новосиб. гос. аграр. ун-т. - Новосибирск, 2004. - С. 258-262.
34. Лебедева, Л.Ф. Раннее эмбриональное развитие у лошадей / Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева** // Искусственное осеменение лошадей - истоки биотехнологии в животноводстве. - Дивово, 2004. - С. 36-40.
35. Лебедева, Л.Ф. Критические периоды в раннем эмбриогенезе лошади /Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева** // Искусственное осеменение лошадей - истоки биотехнологии в животноводстве. - Дивово, 2004.- С. 41-44.
36. Лебедева, Л.Ф. Развитие плодных оболочек у эмбрионов лошадей в зародышевый период / Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева** // Искусственное осеменение лошадей - истоки биотехнологии в животноводстве. - Дивово, 2004. - С. 44-48.
37. Лебедева, Л.Ф. Состояние и перспективы использования метода трансплантации эмбрионов в коневодстве / Л.Ф.Лебедева // Проблемы развития коневодства, конного спорта, ветеринарного дела и иппотерапии / Новосиб. гос. аграр. ун-т. - Новосибирск, 2004. - С. 58-61.
38. Лебедева, Л.Ф. Проблемы воспроизводства лошадей / Л.Ф.Лебедева // Актуальные вопросы ветеринарной медицины / Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск. - 2004. - С. 262-265.
39. Лебедева, Л.Ф. Жизнеспособность витрифицированных эмбрионов лошадей/ **Л.Ф.Лебедева**, Н.В.Сидорова. // Искусственное осеменение лошадей - истоки биотехнологии в животноводстве. – Дивово.- 2004.- С.32-36.
40. Лебедева, Л.Ф. Сравнительная характеристика эмбрионального развития лошади в зародышевый период [Сравнение с человеком, крупным рогатым скотом и овцами]/ Ю.Л.Ошуркова, **Л.Ф.Лебедева** // Науково-технічний бюлетень. - Харків, 2005; N 91. - С. 65-72.

41. Лебедева, Л.Ф. Подготовка кобыл и жеребцов к случному сезону / Л.Ф.Лебедева // Актуальные вопросы ветеринарной медицины / Новосибир. гос. аграр. ун-т. - Новосибирск, 2005. - С. 221-222.
42. Лебедева, Л.Ф. Кукушкины дети / **Л.Ф. Лебедева**, Д.Лазарев // Золотой мустанг. – 2005. - №1 (45). – С.84-88.
43. Лебедева, Л.Ф. Методы диагностики бактериальных эндометритов у кобыл / А.А.Фадеев, **Л.Ф.Лебедева** // Коневодство на рубеже веков: материалы междунар. науч. конф., посвящ. 90-л. со д.р. и 70-л. науч. деятельности Заслуж. деятеля науки РФ, проф. Барминцева Ю.Н. – Дивново, 2005. – С.84-86.
44. Лебедева, Л.Ф. Витрификация как этап технологии трансплантации эмбрионов лошадей / **Л.Ф.Лебедева**, Н.В.Сидорова // Розведення і генетика тварин: міжвідом. темат. наук. збірник. – Київ, 2006. - Вип. 40. Матеріали ІV Міжнарод. конференції «Трансплантація ембріонів як інструмент селекції в новому тисячодітті». – С.75-82.
45. Лебедева, Л.Ф. Использование ультразвукового сканера в гинекологии кобыл / **Л.Ф.Лебедева** // Материалы регион. науч. - практ. конф. «Болезни лошадей». Новосибирск, 2006. – С.55.
46. Лебедева, Л.Ф. Грамотный подход к ведению случной компании в коневодстве в ранние весенние месяцы / **Л.Ф.Лебедева** // Проблемы коневодства: матер. междунар. научно - практ. конференции. - Новосибирск, 2008. – С.151-154.
47. Лебедева, Л.Ф. Экспресс-метод определения степени повреждения клеток в эмбрионах после различных манипуляций / **Л. Ф. Лебедева** В сборнике: Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: роль нанотехнологий в реализации приоритетных задач биотехнологии. 7-я Международная научная конференция-школа. - 2008. -С. 173-175.
48. Лебедева, Л.Ф. Комплексная оценка воспроизводительных качеств кобылы / **Л.Ф.Лебедева**, А.Б.Дубровская // Проблемы коневодства Сибири: материалы науч. конференции. - Иркутск, 2009. – С.178-181.
49. Лебедева, Л.Ф. Инновационные технологии сохранения и рационального использования генетических ресурсов в коневодстве (09 – 04 -13725) / В.В.Калашников, А.М.Зайцев, Л.А.Храброва, **Л.Ф.Лебедева** [и др.] // Материалы Всеросс. науч. конференции «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в агропромышленном комплексе России». – М., 2010. – С.84-87.
50. Лебедева Л.Ф. Геморрагические фолликулы у кобыл / **Лебедева Л.Ф.** // Проблемы коневодства: материалы третьей междунар. науч. – практ. конференции, посвящ. 70-л. ГНУ ИЭВСиДВ (Новосибирск, 6-7 окт. 2010 г.). - Новосибирск, 2010. – С. 140-142.

51. Лебедева, Л.Ф. Современное состояние различных аспектов эмбриотрансплантации в коневодстве / **Л.Ф.Лебедева**, И.И.Промская // Научно – технический прогресс в коневодстве: сб. науч. тр. / ВНИИ коневодства. – Рязань, 2010. – Т.52. – С.170-177.

52. Лебедева, Л.Ф. Оценка жизнеспособности эмбрионов лошадей с помощью окрашивания витальными и ДНК-красителями / **Л.Ф.Лебедева** // Науковий вісник націон. ун-ту біоресурсів І природокористування.- Киев, 2011. – Ч.2. – С.71-76.

53. Лебедева, Л. Ф. Современные методы диагностики беременности у кобыл /**Л. Ф. Лебедева**, Г. П. Дюльгер // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2011. - №4. - С. 32-40.

54. Лебедева, Л.Ф. Комплексная оценка воспроизводительных качеств кобылы / **Л.Ф.Лебедева**, А.Б.Дубровская // Проблемы коневодства: материалы 4-й Междунар. науч. – практ. конференции. – Чита, 2011. – С.163-165.

55. Лебедева, Л.Ф. Ультразвуковой мониторинг нормального эстрального цикла у кобыл / **Л.Ф.Лебедева** // Проблемы коневодства: материалы 4-й Междунар. науч. – практ. конференции. – Чита, 2011. – С.166-172.

56. Лебедева, Л.Ф. Новый успех российской науки в области искусственного осеменения / Т.Н.Рябова, **Л.Ф.Лебедева** // Ахал – теке информ - 2013. – С.157-161.

57. Лебедева Л.Ф. Состояние и перспективы технологии трансплантации эмбрионов в коневодстве / **Л.Ф. Лебедева** // Ветеринария сельскохозяйственных животных . – 2013. - № 7. - С. 42-45.

58. Lebedeva, L.F. The scientific development in horse reproduction in Russia / **L.F.Lebedeva**, V.A. Naumenkova, M.M.Atroshchenko // Book of Abstracts of the 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Federation for Animal Science (26 -30 august 2013). – Nantes (France), 2013. - P.131.

59. Lebedeva, L.F. Horse embryo freezing in Russia: 2 aspects of technology [Текст] / **L.F.Lebedeva** // Book of Abstracts of the 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Federation for Animal Science (26 -30 august 2013). – Nantes (France), 2013. – P.131.

60. Lebedeva L., Nikitina I, Sidorova N. A useful method for evaluation of horse embryos after different manipulations [Текст]/ **L. Lebedeva**, I. Nikitina, N. Sidorova N. //30<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Ambryo Transfer Association (A.E.T.E.) – 12<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> September 2014. - Dresden (Germany). - P. 124.

61. Лебедева, Л.Ф. Криопротективная среда для витрификации эмбрионов лошадей / **Л.Ф.Лебедева** // Научное обеспечение развития и повышения эффективности племенного, спортивного и продуктивного

коневодства в России и странах //Сб. докладов межд.-практ. конференции. – Дивово. – 2014. – С.150-151.

62. Лебедева, Л.Ф. Витрификация эмбрионов лошадей в различных криопротективных средах / **Л. Ф. Лебедева**, Н. В. Сидорова // В книге: Биотехнология: состояние и перспективы развития материалы VIII Московского Международного Конгресса. ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. 2015. С. 473-474.

63. Лебедева, Л.Ф. Опыт, растянувшийся на десятилетия – искусственное осеменение кобыл длительно сохраненным семенем/ В. А. Науменкова, М. М. Атрощенко, **Л. Ф. Лебедева**// Эффективное животноводство. - 2016. - № 5 (126). - С. 9-11.

64. Лебедева, Л.Ф. Опыт, растянувшийся на десятилетия – искусственное осеменение кобыл длительно сохраненным семенем / В.А.Науменкова, М.М.Атрощенко, **Л.Ф.Лебедева** // Эффективное животноводство. - 2016. – №5. – С.9-11.

65. Лебедева, Л.Ф. Состояние воспроизводства лошадей в России и за рубежом [Текст] / **Л.Ф.Лебедева**. – Рязань, 2016. – 60 с.

66. Лебедева, Л.Ф. Гипотермическое хранение эмбрионов лошадей / **Л.Ф.Лебедева** // Материалы 11-й Всеросс. конференции – школы мол. ученых с междунар. участием «Соврем. достижения и проблемы биотехнологии с.-х. жив-х БиоТехЖ – 2016». – Дубровицы, 2016. – С.96-101.

### **Рекомендации (инструкции, наставления)**

67. Лебедева, Л.Ф. Инструкция по искусственному осеменению и трансплантации эмбрионов лошадей / В.А.Науменкова, **Л.Ф.Лебедева**, С.Г.Лебедев, Е.Л.Фомина. – Дивово, 2012. – 72 с.

68. Лебедева, Л.Ф. Способ приготовления комплекта сред для витрификации эмбрионов лошадей / Л.Ф.Лебедева. – Дивово, 2014. – 10 с.

69. Лебедева, Л.Ф. Наставление по культивированию эмбрионов лошадей / Л.Ф.Лебедева. – Дивово, 2014. – 22 с.

70. Лебедева, Л.Ф. Наставление по витрификации эмбрионов лошадей / **Л.Ф.Лебедева**, Н.В.Сидорова. – Дивово, 2014. – 42 с.

71. Лебедева, Л.Ф. Ультразвуковая диагностика репродуктивной системы кобыл в норме и патологии, руководство / Л.Ф.Лебедева. – Рязань, 2016.- 92 с. ISBN 978-5-9908149-0-5 Тир.500 экз.

### **Авторское свидетельство**

72. Способ культивирования поздних бластоцист лошадей: пат. 1497215 Рос. Федерации: МПК: С12N 5/00 / Лебедев С.Г., Лебедева Л.Ф.; заявитель ВНИИ коневодства. - № 4327730/30-13 ; Заявл. 12.11.87 ; опубл. 30.07.89, Бюл. № 28.