

## Репродуктивные биотехнологии

УДК 636.1:636.082:591.463.15:591.11:575

doi: 10.15389/agrobiologia.2018.4.735rus

АССОЦИИРОВАННОСТЬ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ АНТИГЕНОВ  
С ХАРАКТЕРИСТИКАМИ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ ПОСЛЕ  
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯА.В. ТКАЧЁВ<sup>1, 2</sup>, О.Л. ТКАЧЁВА<sup>3</sup>, В.И. РОССОХА<sup>3</sup>

Криоконсервирование спермы животных — важнейший способ сохранения исчезающих пород и видов. В коневодстве России и Украины это направление имеет особую актуальность в связи с критическим снижением численности поголовья племенных животных соответственно до 1,3 млн и 300 тыс. гол. Из 12 официально зарегистрированных украинских пород только у трех сохраняется минимально необходимая численность племенных жеребцов и кобыл. Поэтому повышение характеристик спермы жеребцов и расширение возможностей прогнозирования результативности криоконсервирования имеет большое научно-практическое значение. В статье представлены результаты исследований ассоциированной связи эритроцитарных антигенов А, С, D и К систем групп крови лошадей украинской селекции. Установлена ассоциированная связь эффективности криоконсервирования спермы жеребцов в зависимости от антигенных характеристик эритроцитов по А, С, D и К системам групп крови. Показано, что получение средних показателей по подвижности спермиев после криоконсервирования (4 балла) и выживаемости (2,5 ч) сопровождалось наличием у жеребцов аллелей эритроцитарных антигенов *bcm/cgm*, *bcm/de*, *bcm/dg*, *bcm/dk*, *cegm/cgm*, *cegm/d*, *cegm/dg*, *cegm/dk*, *cgm/cgm*, *cgm/d*, *cgm/dg*, *de/d*, *de/dk*, *dk/d*, *dk/de*, *dk/dk* системы группы крови D. Сперму, сохраняющую высокое качество после криоконсервирования (подвижность более 4 баллов и выживаемость спермиев 4 ч) получили от жеребцов — носителей аллелей эритроцитарных антигенов *bcm/d*, *cgm/de*, *dg/dk* системы группы крови D. Степень влияния эритроцитарных антигенов системы D на криорезистентность спермы жеребцов составляла 32,5 % ( $P < 0,001$ ), на подвижность размороженной спермы — 18,2 % ( $P < 0,01$ ), на выживаемость оттаянных сперматозоидов — 25,2 % ( $P < 0,001$ ). Отсутствие у жеребцов антигенов системы группы крови А сопровождается достоверным повышением биологических характеристик спермы после криоконсервирования. При отсутствии эритроцитарных антигенов системы группы крови А активность спермиев жеребцов была больше на 0,51 балла ( $P < 0,05$ ) относительно контроля, на 1,36 балла ( $P < 0,01$ ) в сравнении с таковой у носителей аллелей *a/-* и на 0,17 балла, чем у производителей с *ad/-*. Показано, что наличие *a/-* системы группы крови С способствует достоверному ( $P < 0,05$ ) ухудшению активности (на 0,33 балла), переживаемости (на 0,78 ч) и сохранности спермиев (на 6,26 %) в сравнении с жеребцами, у которых нет аллелей этой системы группы крови. В случае отсутствия наследования жеребцами антигенов системы группы крови К активность размороженной спермы была выше на 0,35 балла ( $P < 0,05$ ), чем у носителей *a/-* антигена К-системы, и на 0,40 балла ( $P < 0,05$ ) в сравнении с контрольными жеребцами, у которых не определяли антигенный профиль эритроцитов. Установлено, что степень влияния эритроцитарных антигенов системы группы крови К на активность спермиев после размораживания составила 1,4 % ( $P < 0,05$ ), на переживаемость спермы — 2,0 % ( $P < 0,05$ ), на абсолютный показатель переживаемости — 1,5 % ( $P < 0,05$ ), на сохранность спермиев — 1,2 % ( $P < 0,05$ ). Обобщающий дисперсионный анализ полученных данных показал, что степень влияния антигенных характеристик эритроцитов на криорезистентность спермы жеребцов украинской селекции составляет для группы крови D 38,7 % ( $P < 0,001$ ), А — 1,7 % ( $P < 0,05$ ), С — 16,6 % ( $P < 0,01$ ) и К — 12,9 % ( $P < 0,01$ ).

Ключевые слова: эритроцитарные антигены, системы групп крови, криоконсервирование спермы, лошади, жеребцы.

Криоконсервирование спермы животных — важнейший способ сохранения исчезающих пород и видов. В коневодстве России и Украины это направление имеет особую актуальность из-за критического снижения численности поголовья племенных животных соответственно до 1,3 млн и до 300 тыс. гол. (1-3). Например, из 12 официально зарегистрированных украинских пород только для трех сохраняется минимально необходимая численность племенных жеребцов и кобыл (4). Поэтому повышение характеристик спермы жеребцов и расширение возможностей прогнозирования результативности криоконсервирования имеет большое научно-практическое значение.

В современной физиологии больше исследуется влияние микроорганизмов на основные характеристики спермы после криоконсервирования, что объясняется последующим применением заготовленных спермодоз в системе искусственного осеменения лошадей (5-7). Изучается большое число других факторов, которые могут влиять на основные показатели спермограмм жеребцов: гормональный фон, порода, возраст, время года, общее физиологическое состояние, микотоксины, общая хромосомная нестабильность и др. (8-12). Ведутся работы по оценке эффективности криоконсервирования эпидидимального семени жеребцов (1).

В то же время ассоциированная связь эритроцитарных антигенов с показателями эякулятов после криоконсервирования практически не изучается (13-15), несмотря на то, что еще в 1940-х годах была доказана их ассоциация с фертильным потенциалом лошадей (16-18); лишь некоторые исследователи указывают на необходимость подобных работ (19-22). Если у человека сегодня официально признано 29 систем групп крови из 35 существующих (23), то у лошадей — лишь 9 подобных систем, из них наибольшее практическое значение имеют четыре: А, С, D, К, ассоциированная связь которых с показателями спермограмм после криоконсервирования не исследовалась. Показана возможность повышения оплодотворяемости кобыл при случке на основе учета влияния иммуногенетических маркеров, однако связь этих маркеров с показателями спермограмм жеребцов авторы не изучали (24). Единственное исследование биологических характеристик нативной спермы жеребцов в сочетании с антигенным профилем эритроцитов показало, что эти характеристики ассоциированы, но их связь с результативностью криоконсервирования не рассматривалась (4).

Мы впервые сопоставили антигенные характеристики эритроцитов А, С, D, К систем групп крови лошадей с основными свойствами спермы после криоконсервирования и показали, что высокая подвижность и выживаемость спермиев после криоконсервирования отмечается у особей с определенным набором эритроцитарных антигенов системы D, а отсутствие антигенов системы группы крови А сопровождается достоверным повышением биологического качества спермы после криоконсервирования.

Целью представленного исследования было установление ассоциированности между эритроцитарными антигенами А, С, D, К систем групп крови жеребцов и характеристиками их спермы после криоконсервирования.

*Методика.* Исследование выполняли на 1676 свежеполученных эякулятах, из которых 1413 проявили криорезистентность. Сперму получали от 69 жеребцов-производителей 9 заводских пород (украинская верховая, чистокровная верховая, тракененская, ганноверская, бельгийская, вестфальская, арабская, орловская рысистая и русская рысистая) конных заводов, племенных репродукторов, конно-спортивных клубов Харьковской, Полтавской, Запорожской, Луганской, Киевской, Житомирской, Днепропетровской областей (Украина) на протяжении 10 лет, начиная с 2005 года. Эякуляты отбирали на стерильную искусственную вагину со стерильным спермоприемником после санитарной обработкой жеребцов, при отборе и криоконсервировании спермы использовали харьковскую технологию (4, 9). В размороженной сперме общепринятыми методами (25) определяли активность спермиев в баллах (1 балл — 10 % спермиев с прямолинейно-поступательным движением) визуалью в световом микроскопе Jenaval («Carl Zeiss», Германия) при увеличении объектива  $\times 10-20$ , переживаемость спермиев (в часах) — в термостате при 37 °С, абсолютный показатель переживаемости (в условных единицах), сохранность спермиев в процентах от исходной в нативной сперме. Показатели размороженной спер-

мы анализировали по отдельности для аллелей каждой из систем групп крови (D, A, C, K). Иммуногенетическое генотипирование по эритроцитарным антигенам систем групп крови жеребцов проводили в реакции прямой агглютинации (РА) с применением стандартных моноспецифических сывороток-реагентов, которые верифицированы международными стандартными реагентами и произведены в лаборатории генетики Института животноводства НААН Украины (Aa, Ad, Ca, Da, Db, Dc, Dd, De, Dg, Dk, Ka), по общепринятым методикам (13). При определении генотипов жеребцов по группам крови в каждой системе определяли оба аллеля, унаследованные от родителей. Обозначали генотипы через черту: аллель до черты унаследован от отца, аллель после черты — унаследован от матери.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методиками вариационной статистики, достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента (26). В таблицах приведены средние (*M*) и средние отклонения ( $\pm$ SEM). Дисперсионный анализ выполняли с использованием специализированного пакета прикладных программ SPSS for Windows (непараметрическая статистика) («IBM», США).

**Результаты.** Экспериментальные данные по установлению ассоциаций эритроцитарных антигенов системы группы крови D с характеристиками спермы после криоконсервирования представлены в таблице 1.

**1. Ассоциированность аллелей эритроцитарных антигенов системы группы крови D (ЭА D) с характеристиками спермы жеребцов после криоконсервирования ( $M \pm SEM$ ,  $n = 1413$ )**

ЭА D	Число проб	Активность спермиев, балл	Переживаемость спермиев		Сохранность спермиев, %
			при 37 °С, ч	абсолютная, усл. ед.	
Низкое качество спермы					
<i>ad/bcm</i>	17	2,12 $\pm$ 0,23	2,12 $\pm$ 0,23	4,62 $\pm$ 0,66	42,94 $\pm$ 4,57
<i>ad/cgm</i>	12	2,37 $\pm$ 0,26	2,79 $\pm$ 0,32	5,79 $\pm$ 0,67	47,22 $\pm$ 5,42
<i>ad/d</i>	16	1,93 $\pm$ 0,29	1,93 $\pm$ 0,29	4,50 $\pm$ 0,71	38,54 $\pm$ 5,91
<i>ad/de</i>	36	2,06 $\pm$ 0,23	2,01 $\pm$ 0,21	5,26 $\pm$ 0,68	37,68 $\pm$ 4,11
<i>ad/dk</i>	14	1,39 $\pm$ 0,27	1,50 $\pm$ 0,31	3,32 $\pm$ 0,71	27,65 $\pm$ 5,42
<i>cgm/ceg</i>	15	1,53 $\pm$ 0,33	1,63 $\pm$ 0,35	3,53 $\pm$ 0,81	28,32 $\pm$ 5,72
<i>cgm/dk</i>	45	2,51 $\pm$ 0,09	2,84 $\pm$ 0,12	7,57 $\pm$ 0,47	47,52 $\pm$ 1,90
<i>de/cgm</i>	8	2,10 $\pm$ 0,29	2,25 $\pm$ 0,34	5,1 $\pm$ 0,79	40,90 $\pm$ 6,10
<i>dg/cgm</i>	14	2,11 $\pm$ 0,29	2,46 $\pm$ 0,35	5,11 $\pm$ 0,75	42,90 $\pm$ 5,45
<i>dg/di</i>	16	1,47 $\pm$ 0,31	1,50 $\pm$ 0,32	3,63 $\pm$ 0,85	26,14 $\pm$ 5,10
Среднее качество спермы					
<i>bcm/cgm</i>	103	3,60 $\pm$ 0,19**	3,00 $\pm$ 0,15**	9,91 $\pm$ 0,61**	50,13 $\pm$ 2,47*
<i>bcm/de</i>	91	3,53 $\pm$ 0,17**	3,11 $\pm$ 0,14**	9,59 $\pm$ 0,48**	52,57 $\pm$ 2,17*
<i>bcm/dg</i>	65	3,38 $\pm$ 0,13**	3,43 $\pm$ 0,19**	10,40 $\pm$ 0,68***	52,84 $\pm$ 1,43*
<i>bcm/dk</i>	115	3,59 $\pm$ 0,11**	3,70 $\pm$ 0,11**	11,80 $\pm$ 0,46***	54,30 $\pm$ 1,36*
<i>ceg/cgm</i>	27	3,24 $\pm$ 0,11**	3,68 $\pm$ 0,16**	9,87 $\pm$ 0,43**	54,63 $\pm$ 1,27**
<i>ceg/d</i>	20	3,25 $\pm$ 0,11**	3,55 $\pm$ 0,13**	10,70 $\pm$ 0,47***	52,60 $\pm$ 0,84*
<i>ceg/dg</i>	27	3,18 $\pm$ 0,12**	3,67 $\pm$ 0,15**	9,67 $\pm$ 0,45**	55,50 $\pm$ 1,54**
<i>ceg/dk</i>	37	3,33 $\pm$ 0,17**	3,54 $\pm$ 0,25**	10,90 $\pm$ 0,91***	57,31 $\pm$ 2,46**
<i>cgm/cgm</i>	72	2,92 $\pm$ 0,11*	3,37 $\pm$ 0,15**	8,10 $\pm$ 0,38**	51,87 $\pm$ 1,79*
<i>cgm/d</i>	29	3,93 $\pm$ 0,47**	2,17 $\pm$ 0,19*	8,27 $\pm$ 0,99**	49,80 $\pm$ 5,70*
<i>cgm/dg</i>	58	2,98 $\pm$ 0,17*	3,24 $\pm$ 0,20*	9,49 $\pm$ 0,73**	48,18 $\pm$ 2,57*
<i>de/d</i>	27	3,80 $\pm$ 0,48***	2,02 $\pm$ 0,21*	7,59 $\pm$ 0,95*	47,20 $\pm$ 6,05
<i>de/dk</i>	88	3,18 $\pm$ 0,13**	3,47 $\pm$ 0,15**	10,24 $\pm$ 0,55***	51,90 $\pm$ 1,70*
<i>dk/d</i>	67	3,37 $\pm$ 0,11**	3,60 $\pm$ 0,14**	10,61 $\pm$ 0,49***	53,30 $\pm$ 1,54**
<i>dk/de</i>	25	3,34 $\pm$ 0,12**	3,44 $\pm$ 0,16**	11,36 $\pm$ 0,73***	58,27 $\pm$ 1,77**
<i>dk/dk</i>	30	3,74 $\pm$ 0,17***	3,15 $\pm$ 0,15**	12,35 $\pm$ 0,91***	59,23 $\pm$ 2,08**
Высокое качество спермы					
<i>bcm/d</i>	27	4,33 $\pm$ 0,11***	5,03 $\pm$ 0,12***	14,94 $\pm$ 2,67***	67,12 $\pm$ 0,87***
<i>cgm/de</i>	48	4,67 $\pm$ 0,18***	5,19 $\pm$ 0,21***	16,45 $\pm$ 0,75***	61,90 $\pm$ 2,29***
<i>dg/dk</i>	19	4,34 $\pm$ 0,33***	4,71 $\pm$ 0,36***	15,90 $\pm$ 1,32***	56,34 $\pm$ 4,30**

\*, \*\*, \*\*\* Различия с вариантом для спермы низкого качества статистически значимы соответственно при  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ .

Из полученных данных (см. табл. 1) видно, что наличие у обследованных лошадей аллелей эритроцитарных антигенов *ad/bcm*, *ad/cgm*, *ad/d*, *ad/de*, *ad/dk*, *cgm/ceg*, *cgm/dk*, *de/cgm*, *dg/cgm*, *dg/di* системы группы крови

Д сопровождалось проявлением низкого качества спермы после криоконсервирования (подвижность сперматозоидов после оттаивания менее 2,5 балла и низкая выживаемость — менее 2,5 ч). Средние физиологические характеристики спермы (подвижность спермиев от 2,5 балла и выживаемость до 4 ч) отмечали при наличии у жеребцов украинской селекции аллелей эритроцитарных антигенов *bcm/cgm*, *bcm/de*, *bcm/dg*, *bcm/dk*, *cegm/cgm*, *cegm/d*, *cegm/dg*, *cegm/dk*, *cgm/cgm*, *cgm/d*, *cgm/dg*, *de/d*, *de/dk*, *dk/d*, *dk/de*, *dk/dk* системы группы крови D. Высокую результативность криоконсервирования спермы (подвижность более 4 баллов и выживаемость 4 ч) наблюдали у жеребцов с аллелями эритроцитарных антигенов *bcm/d*, *cgm/de*, *dg/dk* системы группы крови D.

Установлено, что степень влияния эритроцитарных антигенов системы группы крови D на криорезистентность спермы составила 32,5 % ( $P < 0,001$ ), на подвижность размороженных спермиев — 18,2 % ( $P < 0,01$ ), на их выживаемость — 25,2 % ( $P < 0,001$ ), на абсолютный показатель переживаемости размороженной спермы — 24,5 % ( $P < 0,01$ ) и на сохранность оттаянной спермы — 12,2 % ( $P < 0,05$ ).

## 2. Ассоциированность аллелей эритроцитарных антигенов системы группы крови A (ЭА А) с характеристиками спермы жеребцов после криоконсервирования ( $M \pm SEM$ , $n = 1413$ )

ЭА А	Число проб	Активность спермиев, балл	Переживаемость спермиев		Сохранность спермиев, %
			при 37 °С, ч	абсолютная, усл. ед.	
О п ы т					
-/-	101	3,42±0,11*	3,45±0,11**	10,88±0,49*	54,97±1,38*
a/-	8	2,06±0,29*	2,25±0,34	5,06±0,78**	40,88±6,09
ad/-	1059	3,25±0,05	3,26±0,05*	9,72±0,17*	50,92±0,60
К о н т р о л ь					
Не определяли	245	2,91±0,09	2,71±0,08	8,09±0,31	46,21±1,27

\*, \*\*, \*\*\* Различия с контролем статистически значимы соответственно при  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ .

Анализ основных характеристик криоконсервированной спермы у лошадей украинской селекции в сопоставлении с аллелями системы группы крови А (табл. 2) позволяет заключить, что биологическое качество такой спермы достоверно повышалось при отсутствии у жеребцов эритроцитарных антигенов этой системы. Так, активность спермиев была больше на 0,51 балла ( $P < 0,05$ ), чем в контроле, на 1,36 балла ( $P < 0,01$ ) — в сравнении с таковой у носителей *a/-* аллеля и на 0,17 балла — в сравнении с производителями с *ad/-* аллелями. Переживаемость размороженной спермы оказалась наибольшей у жеребцов с отсутствием антигенов А системы — на 0,74 ч больше контрольной ( $P < 0,05$ ), на 1,2 ч ( $P < 0,001$ ) — в сравнении с носителями *a/-* аллеля и на 0,19 ч — для носителей *ad/-* аллеля. Наследование жеребцами *a/-* эритроцитарного антигена системы группы крови А сопровождалось худшей сохранностью спермиев (менее 41 %).

Степень влияния эритроцитарных антигенов системы группы крови А на криорезистентность спермы составила 3,4 % ( $P < 0,05$ ), на подвижность спермиев после размораживания — 1,2 % ( $P < 0,05$ ), на выживаемость оттаянных спермиев — 2,4 % ( $P < 0,05$ ), на абсолютный показатель переживаемости размороженной спермы — 2,1 % ( $P < 0,05$ ) и на сохранность оттаянной спермы — 1,4 % ( $P < 0,05$ ).

Результаты исследования основных физиологических характеристик спермы жеребцов в зависимости от наличия эритроцитарных антигенов системы группы крови С (табл. 3) свидетельствуют, что присутствие *a/-* сопровождается достоверным ( $P < 0,05$ ) ухудшением активности (на 0,33 балла), переживаемости (на 0,78 ч), абсолютного показателя переживаемости (на 1,84 усл. ед.), сохранности спермиев (на 6,26 %) в сравнении с

аналогичными показателями жеребцов, у которых отсутствуют эритроцитарные антигены этой системы группы крови.

### 3. Ассоциированность аллелей эритроцитарных антигенов системы группы крови С (ЭА С) с характеристиками спермы жеребцов после криоконсервирования ( $M \pm SEM$ , $n = 1413$ )

ЭА С	Число проб	Активность спермиев, балл	Переживаемость спермиев		Сохранность спермиев, %
			при 37 °С, ч	абсолютная, усл. ед.	
-/-	940	3,32±0,05*	О п ы т		52,42±0,57*
a/-	227	2,99±0,12	3,42±0,05*	10,15±0,17*	46,16±1,61
			К о н т р о л ь		
Не определяли	245	2,91±0,09	2,71±0,08	8,09±0,31	46,21±1,27

\*, \*\*, \*\*\* Различия с контролем статистически значимы соответственно при  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ .

Установлено, что степень влияния эритроцитарных антигенов системы группы крови С на активность спермиев жеребцов украинской селекции после размораживания составила 1,4 % ( $P < 0,05$ ), на переживаемость спермы — 5,6 % ( $P < 0,05$ ), на абсолютный показатель переживаемости — 3,1 % ( $P < 0,05$ ) и на сохранность спермиев — 2,4 % ( $P < 0,05$ ).

При отсутствии у жеребцов антигенов системы группы крови К активность размороженной спермы была выше на 0,35 балла ( $P < 0,05$ ), чем у носителей аллеля a/- антигена К системы, и на 0,40 балла ( $P < 0,05$ ), чем у контрольных лошадей, у которых не определяли антигенный профиль эритроцитов. Степень влияния эритроцитарных антигенов системы группы крови К на активность спермиев после размораживания составила 1,4 % ( $P < 0,05$ ), на переживаемость спермы — 2,0 % ( $P < 0,05$ ), на абсолютный показатель переживаемости — 1,5 % ( $P < 0,05$ ) и на сохранность спермиев — 1,2 % ( $P < 0,05$ ).

Обобщающий дисперсионный анализ полученных данных показал, что степень влияния антигенных характеристик эритроцитов на криорезистентность спермы жеребцов украинской селекции составляет для системы группы крови D — 38,7 % ( $P < 0,001$ ), для A — 1,7 % ( $P < 0,05$ ), для С — 16,6 % ( $P < 0,01$ ) и для системы К — 12,9 % ( $P < 0,01$ ).

Таким образом, у лошадей украинской селекции впервые проведены исследования ассоциированности эритроцитарных антигенов систем А, С, D, К с основными характеристиками спермы после криоконсервирования. Показано, что наличие у обследованных животных аллелей эритроцитарных антигенов *ad/bcm*, *ad/cgm*, *ad/d*, *ad/de*, *ad/dk*, *cgm/ceg*, *cgm/dk*, *de/cgm*, *dg/cgm*, *dg/di* системы группы крови D сопровождалось низкой подвижностью спермиев (менее 2,5 балла) и низкой выживаемостью (менее 2,5 ч). Среднюю по качеству криоконсервированную сперму (подвижность от 2,5 балла и выживаемость до 4 ч) получали у жеребцов с аллелями эритроцитарных антигенов *bcm/cgm*, *bcm/de*, *bcm/dg*, *bcm/dk*, *ceg/cgm*, *ceg/d*, *ceg/dg*, *ceg/dk*, *cgm/cgm*, *cgm/d*, *cgm/dg*, *de/d*, *de/dk*, *dk/d*, *dk/de*, *dk/dk* системы группы крови D. Высокие характеристики спермы после криоконсервирования (подвижность спермиев более 4 баллов и выживаемость более 4 ч) отмечали у жеребцов с генотипом по эритроцитарным антигенам системы группы крови D *bcm/d*, *cgm/de*, *dg/dk*. Доля влияния антигенных характеристик системы группы крови D на криорезистентность сперматозоидов жеребцов составила 32,5 % ( $P < 0,001$ ), на подвижность — 18,2 % ( $P < 0,01$ ), на выживаемость оттаянной спермы — 25,2 % ( $P < 0,001$ ), на абсолютный показатель переживаемости — 24,5 % ( $P < 0,01$ ) и на сохранность оттаянной спермы — 12,2 % ( $P < 0,05$ ). В отсутствие антигенов системы группы крови К активность размороженной спермы была выше на 0,35 балла ( $P < 0,05$ ), чем у носителей аллеля a/- К системы, и

на 0,40 балла ( $P < 0,05$ ), чем у контрольных производителей, у которых не определяли антигенный профиль эритроцитов. Наличие аллеля  $a/-$  (система группы крови С) сопровождалось достоверным ( $P < 0,05$ ) снижением активности (на 0,33 балла), переживаемости (на 0,78 ч), абсолютного показателя переживаемости (на 1,84 усл. ед.), сохранности спермиев (на 6,26 %) в сравнении с показателями жеребцов, у которых отсутствуют эритроцитарные антигены этой системы группы крови. Отсутствие антигенов системы группы крови А приводило к достоверному повышению биологических характеристик спермы после криоконсервирования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Атрошенко М.М., Калашников В.В., Брагина Е.Е., Зайцев А.М. Сравнительное изучение ультраструктуры сперматозоидов в эпидидимальной, эякулированной и криоконсервированной сперме жеребцов. *Сельскохозяйственная биология*, 2017, 52(2): 274-281 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.274rus).
2. Tait B.D., Hudson F., Cantwell L., Brewin G., Holdsworth R., Bennett G., Jose M. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology (Carlton)*, 2009, 14(2): 247-254 (doi: 10.1111/j.1440-1797.2008.01074.x).
3. Калашников В.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М., Зайцева М.А., Калинкова Л.В. Полиморфизм микросателлитной ДНК у лошадей заводских и локальных пород. *Сельскохозяйственная биология*, 2011, 2: 41-45.
4. Tkachev A.V., Sheremeta V.I., Tkacheva O.L., Rossokha V. I. Physiological relationship of erythrocyte antigens with indicators of horse spermogram. *Fiziol. Zh.*, 2017, 63(1): 84-90 (doi: 10.15407/fz63.01.084).
5. Лебедева Л.Ф., Атрошенко М.М., Бурмистрова С.А. Основные факторы, влияющие на результативность осеменения кобыл спермой, криоконсервированной по российским и зарубежным технологиям. *Сельскохозяйственная биология*, 2015, 50(4): 476-485 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.476rus).
6. Ellerbrock R.E., Honorato J., Curcio B.R., Stewart J.L., Souza J.A.T., Love C.C., Lima F.S., Canisso I.F. Effect of urine contamination on stallion semen freezing ability. *Theriogenology*, 2018, 1(117): 1-6 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.05.010).
7. Gibb Z., Lambourne S.R., Curry B.J., Hall E.S., Aitken R.J. Aldehyde dehydrogenase plays a pivotal role in the maintenance of stallion sperm motility. *Biol. Reprod.*, 2016, 94(6): 133 (doi: 10.1095/biolreprod.116.140509).
8. Ducro B.J., Koenen E.P.C., Tartwijk J.M.F.M., Bovenhuis H. Genetic relations of movement and free-jumping traits with dressage and show-jumping performance in competition of Dutch Warmblood horses. *Livestock Science*, 2007, 107(2-3): 227-234 (doi: 10.1016/j.livsci.2006.09.018).
9. Al-Kass Z., Spersger J., Aurich C., Kuhl J., Schmidt K., Johannisson A., Morrell J.M. Sperm quality during storage is not affected by the presence of antibiotics in EquiPlus semen extender but is improved by single layer centrifugation. *Antibiotics*, 2018, 7(1): 1-13 (doi: 10.3390/antibiotics7010001).
10. Ellerbrock R., Canisso I., Feijo L., Lima F., Shipley C., Kline K. Diagnosis and effects of urine contamination in cooled-extended stallion semen. *Theriogenology*, 2016, 85(7): 1219-1224 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.12.002).
11. Pojprasath T., Lohachit C., Techakumphu M., Stout T., Tharasanit T. Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. *Theriogenology*, 2011, 75(9): 1742-1749 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.014).
12. Ткачѳв А.В., Ткачѳва О.Л., Россоха В.И. Цитогенетический статус кобыл украинской верховой породы в связи с оплодотворяемостью. *Сельскохозяйственная биология*, 2018, 53(2): 302-308 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.302rus).
13. Avanzi B.R., Ramos R.S., Araujo G.H., Fioratti E.G., Trinca L.A., Dell'Aqua J.A., Melo E Oca C.M., Zahn F.S., Martin I., Alvarenga M.A., Papa F.O. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions? *Theriogenology*, 2015, 83(9): 1389-1393 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.007).
14. Curik I., Zechner P., Stlkner J., Achmann R., Bodo I., Dovic P., Kavari T., Marti E., Brem G. Inbreeding, microsatellite heterozygosity, and morphological traits in Lipizzan horses. *J. Hered.*, 2003, 94(2): 125-132.
15. Young Y.J., Cho G.J. Factors concerning cell survival. In the same time, the rate of chromosomal early embryonic death in thoroughbred mares in aberrations was relatively low which is insufficient alone South Korea. *J. Vet. Med. Sci.*, 2007, 69: 787-792.
16. Ezzo O.H., Farghaly A.A., El-Maaty A.M.A., Mahmoud K.Gh.M. Hormonal and cytogenetic investigations in mares with early embryonic death. *Global Veterinaria*, 2011, 7(3): 211-218.
17. Aitken R.J., Whiting S., Deluiliis G.N., McClymont S., Mitchell L.A., Baker M.A. Electro-

- philic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287: 33048-33060 (doi: 10.1074/jbc.M112.366690).
18. Dias G.M., Lopez M.L., Ferreira A.T., Chapeaurouge D.A., Rodrigues A., Perales J., Retamal C.A. Thiol-disulfide proteins of stallion epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2014, 145: 29-39 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.12.007).
  19. Koppers A.J., Mitchell L.A., Wang P., Lin M., Aitken R.J. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem. J.*, 2011, 436(3): 687-698 (doi: 10.1042/BJ20110114).
  20. Baker M.A., Weinberg A., Hetherington L., Villaverde I., Velkov T., Baell J., Gordon C.P. Defining the mechanisms by which the reactive oxygen species by-product, 4-hydroxynonenal, affects human sperm cell function. *Biol. Reprod.*, 2015, 92(4): 108-115 (doi: 10.1095/biolreprod.114.126680).
  21. Auger J., Eustache F., Maceiras P., Broussard C., Chafey P., Lesaffre C., Vaiman D., Camoin L., Auer J. Modified expression of several sperm proteins after chronic exposure to the antiandrogenic compound vinclozolin. *Toxicol. Sci.*, 2010, 117(2): 475-484 (doi: 10.1093/toxsci/kfq199).
  22. Gibb Z., Lambourne S.R., Aitken R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol. Reprod.*, 2014, 91(3): 77, 1-10 (doi: 10.1095/biolreprod.114.118539).
  23. Arnold M.L., Dechant M., Doxiadis I.I., Spriewald B.M. Prevalence and specificity of immunoglobulin G and immunoglobulin A non-complement-binding anti-HLA alloantibodies in retransplant candidates. *Tissue Antigens*, 2008, 72(1): 60-66 (doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01067.x).
  24. Lazary S., de Weck A.L., Bullen S., Straub R., Gerber H. Equine leukocyte antigen system. I. Serological studies. *Transplantation*, 1980, 30(3): 203-209.
  25. Filannino A., Stout T., Gadella B.M. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2011, 9: 134-140 (doi: 10.1186/1477-7827-9-134).
  26. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников. М., 1969.

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет,

61002 Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, 53,

e-mail: sasha\_sashaola@mail.ru ✉;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина,

308503 Россия, Белгородская обл., Белгородский р-н.,

пос. Майский, ул. Вавилова, 1,

e-mail: sasha\_sashaola@mail.ru ✉;

<sup>3</sup>Институт животноводства Национальной академии аграрных наук Украины,

61120 Украина, г. Харьков, ул. 7-й Гвардейской Армии, 3,

e-mail: tkacheva.olga2017@gmail.com, rossokha.v@ukr.net

Поступила в редакцию

10 июля 2017 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 4, pp. 735-742

## ASSOCIATED CONNECTION OF ERYTHROCITARY ANTIGENS WITH CHARACTERISTICS OF STALLION SEMEN AFTER CRYOCONSERVATION

A.V. Tkachev<sup>1, 2</sup>, O.L. Tkacheva<sup>3</sup>, V.I. Rossokha<sup>3</sup>

<sup>1</sup>National University of Pharmacy, 53, vul. Pushkinskaya, Kharkov, Ukraine 61002, e-mail sasha\_sashaola@mail.ru (✉ corresponding author);

<sup>2</sup>Gorin Belgorod State Agricultural University, 1, ul. Vavilova, pos. Maiskii, Belgorod Region, Belgorod Province, 308503 Russia, e-mail sasha\_sashaola@mail.ru (✉ corresponding author);

<sup>3</sup>Institute of Animal Science of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 3, vul. 7-i Gvardeiskoi Armii, Kharkov, Ukraine 61120, e-mail tkacheva.olga2017@gmail.com, rossokha.v@ukr.net

ORCID:

Tkachev A.V. orcid.org/0000-0002-7721-5742

Rossokha V.I. orcid.org/0000-0001-8709-7535

Tkacheva O.L. orcid.org/0000-0002-5573-6117

The authors declare no conflict of interests

Received July 10, 2017

doi: 10.15389/agrobiology.2018.4.735eng

### Abstract

Cryopreservation of animal sperm is the most important way to preserve endangered breeds and species. This is of particular relevance in the horse breeding of Russia and Ukraine given the critical decrease in the livestock of pedigree animals to 1.3 million and up to 300 thousand heads, respectively. For example, in Ukraine only 3 out of 12 officially registered breeds have the minimum required number of breeding stallions and mares. Therefore, the increase in the characteristics of

stallion sperm and the improvement of the ability to predict the effectiveness of cryopreservation are of great scientific and practical importance. This article presents the results of the studies on the associated dependence of erythrocyte antigens A, C, D and K of the blood groups of horses of Ukrainian selection. The associated relationship of the efficiency of cryopreservation of stallion sperm has been revealed depending on the antigenic characteristics of erythrocytes according to A, C, D, and K blood group systems. It has been shown that the obtaining of the average parameters of stallion spermatozoa motility and survival after cryopreservation of 2.5 points and 4 hours, respectively, was accompanied by the presence of alleles of erythrocyte antigens *bcm/cgm*, *bcm/de*, *bcm/dg*, *bcm/dk*, *cegm/cgm*, *cegm/d*, *cegm/dg*, *cegm/dk*, *cgm/cgm*, *cgm/d*, *cgm/dg*, *de/d*, *de/dk*, *dk/d*, *dk/de*, *dk/dk* of the blood group D system. High semen characteristics after cryopreservation, i.e. the motility more than 4 points and survival spermatozoa more than 4 hours were obtained from the stallions with alleles of erythrocyte antigens *bcm/d*, *cgm/de*, *dg/dk* of the blood group D. The degree of the influence of erythrocyte antigens of the blood group D on the cryoresistance of the stallion semen is 32.5 % ( $P < 0.001$ ), on the motility of the thawed semen — 18.2 % ( $P < 0.01$ ), and on the survival rate of the thawed spermatozoa — 25.2 % ( $P < 0.001$ ). The absence of the blood group A antigens in the stallions was accompanied by a significant increase in the biological characteristics of the semen after cryopreservation. In the absence of erythrocyte antigens of the blood group A, the activity of the sperm in stallions was higher by 0.51 points ( $P < 0.05$ ) as compared to the control, by 1.36 points ( $P < 0.01$ ) as compared to the carriers of *a/-*, by 0.17 points as compared to the stallions with *ad/-*. It has been shown that the presence of *a/-* of the blood group C contributed to a significant ( $P < 0.05$ ) impairment of the activity (by 0.33 points), of the survival (by 0.78 hours) and of the semen durability (by 6.26 %) as compared to the stallions in which there were no alleles of this blood group system. If the antigens of the blood group K were not inherited by stallions, the activity of the thawed sperm was 0.35 points higher ( $P < 0.05$ ) than in the carriers of *a/-* of the K system, and by 0.40 points ( $P < 0.05$ ) higher than in the control stallions in which the antigenic profile of erythrocytes was not determined. It has been found out that the degree of the influence of the alleles of the blood group K on the activity of spermatozoa after thawing was 1.4 % ( $P < 0.05$ ), on the semen durability — 2.0 % ( $P < 0.05$ ), on the absolute value of durability — 1.5 % ( $P < 0.05$ ), on the spermatozoa preservation — 1.2 % ( $P < 0.05$ ). The generalized dispersion analysis of the obtained data has shown that the degree of the influence of the antigenic characteristics of erythrocytes on sperm cryoresistance in the stallions of Ukrainian selection was 38.7 % ( $P < 0.001$ ) for blood group D, 1.7 % ( $P < 0.05$ ) for blood group A, 16.6 % ( $P < 0.01$ ) for blood group C, and 12.9 % ( $P < 0.01$ ) for blood group K.

Keywords: erythrocyte antigens, alleles of systems of blood groups, cryopreservation of semen, horses, stallions.

---

**Научные собрания**  
**ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ**  
**«СОВРЕМЕННЫЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ В ОБЛАСТИ**  
**КОРМОПРОИЗВОДСТВА»**  
**(20 ноября 2018 года, г. Москва)**

**Организаторы:** ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (ИБМХ), Российский научный фонд.

**Основные направления работы конференции:**

- инновационные, ресурсосберегающие экологически безопасные технологии производства кормов и продукции в птицеводстве;
- техническое обеспечение и модернизация кормовой и производственной базы;
- новые технологии прижизненного формирования сырья с заданными технологическими и потребительскими свойствами в области птицеводства;
- вопросы стандартизации и сертификации;
- инновации в производстве кормовых добавок (белки, жиры, углеводы, L-аминокислоты, витамины, макро- и микроэлементы);
- инновации в области экономики, организации и управления сельскохозяйственным производством, замкнутый цикл производства

**Контакты и информация:** [ibmch-bio@inbox.ru](mailto:ibmch-bio@inbox.ru), [ibmcagris@inbox.ru](mailto:ibmcagris@inbox.ru)

**12th ANNUAL MEETING EPIZONE 2018**  
which will be held jointly with the  
**11th INTERNATIONAL CONGRESS FOR VETERINARY VIROLOGY — ESVV**  
**(August 27-30, 2018, Vienna, Austria)**

An exciting programme is compiling, which is covering all aspects of veterinary virology with a focus on current hot topics.

**Information:** <https://epizone-eu.net/en/Home/show/12th-Annual-Meeting-EPIZONE-2018-1.htm>