

УДК 636.082.453

Научная статья



Открытый доступ

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-387-10-91-95

Е.В. Никиткина ✉

Н.В. Плешанов

С.С. Богданова

Ю.Г. Турлова

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста», Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ nikitkinae@mail.ru

Поступила в редакцию: 14.06.2024

Одобрена после рецензирования: 16.09.2024

Принята к публикации: 30.09.2024

© Никиткина Е.В., Плешанов Н.В., Богданова С.С., Турлова Ю.Г.

Research article



Open access

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-387-10-91-95

Elena V. Nikitkina ✉

Nikolay V. Pleshanov

Sofia S. Bogdanova

Julia G. Turlova

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia

✉ nikitkinae@mail.ru

Received by the editorial office: 14.06.2024

Accepted in revised: 16.09.2024

Accepted for publication: 30.09.2024

© Nikitkina E.V., Pleshanov N.V., Bogdanova S.S., Turlova Y.G.

Сохранение биологической полноценности сперматозоидов быков при хранении спермы в охлажденном виде

РЕЗЮМЕ

Цель работы — оценка биологической полноценности спермы быков при охлаждении до 5 °С и хранении в течение времени.

Охлаждение спермы менее травматично для клеток, чем глубокое замораживание. Оплодотворяющая способность охлажденной спермы выше, чем криоконсервированной, но сохраняется она в течение нескольких суток, чем ограничивает использование. Исследование проводилось с использованием нативной спермы быков черно-пестрой ($n = 6$) и айрширской пород ($n = 3$). В опыте использовали два варианта разбавителей: в качестве контроля применяли коммерческий разбавитель OptiXcell (IMV) (Франция), в качестве опыта — разработанный экспериментальный разбавитель на основе Триса. Не было достоверной разницы по общей и прогрессивной подвижности между исследуемыми разбавителями. В большинстве случаев сперматозоиды были живы в течение 10 суток. Если учитывать прогрессивную подвижность 40% как минимально допустимую для искусственного осеменения, в среднем у исследуемых быков она была при хранении 120 часов. В то же время были отдельные эякуляты, которые имели прогрессивную подвижность (40% и выше) и после 168 часов хранения. Не было достоверных различий по сохранности мембран при разбавлении исследуемыми разбавителями. При хранении в течение 72 часов практически не было снижения количества интактных клеток при использовании экспериментального разбавителя. Приготовление и применение экспериментального разбавителя экономически более выгодно, чем использование западного аналога — OptiXcell (IMV). При этом разработанный авторами разбавитель не уступает по характеристикам (качественным показателям сперматозоидов), а даже превосходит иностранный.

Ключевые слова: быки, охлажденная сперма, разбавитель, прогрессивная подвижность, мембраны

Для цитирования: Никиткина Е.В., Плешанов Н.В., Богданова С.С., Турлова Ю.Г. Сохранение биологической полноценности сперматозоидов быков при хранении спермы в охлажденном виде. *Аграрная наука*. 2024; 387(10): 91–95.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-387-10-91-95>

Preserving of the bovine chilled semen viability

ABSTRACT

The aim of the work is to assess the biological usefulness of bull semen when cooled to 5 °C and stored for a period of time.

Sperm cooling is less traumatic for cells than deep freezing. The fertilizing capacity of chilled sperm is higher than cryopreserved sperm, but it persists for several days, which limits its use. The study was conducted using native sperm from black-and-white ($n = 6$) and Ayrshire bulls ($n = 3$). Two diluents were used in the experiment: OptiXcell commercial diluent (IMV) (France) was used as a control, and an experimental diluent based on Tris was developed as an experiment. There was no significant difference in overall and progressive mobility between the studied diluents. In most cases, the spermatozoa were alive for 10 days. If we take into account the progressive mobility of 40% as the minimum permissible for artificial insemination, on average, the studied bulls had it during storage for 120 hours. At the same time, there were individual ejaculates that had progressive mobility (40% and higher) even after 168 hours of storage. There were no significant differences in membrane safety when diluted with the studied diluents. When stored for 72 hours, there was practically no decrease in the number of intact cells when using an experimental diluent. The preparation and application of an experimental diluent are economically more profitable than using a Western analogue — OptiXcell (IMV). At the same time, the diluent developed by the authors is not inferior in characteristics (qualitative indicators of spermatozoa), and even surpasses the foreign one.

Key words: bulls, chilled semen, extender, progressive motility, membranes

For citation: Nikitkina E.V., Pleshanov N.V., Bogdanova S.S., Turlova J.G. Preserving of the bovine chilled semen viability. *Agrarian science*. 2024; 387(10): 91–95 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-387-10-91-95>

Введение/Introduction

Ключевым аспектом искусственного осеменения коров является практическая разработка долгосрочного сохранения спермы. Криоконсервация спермы часто возможна лишь в ограниченной степени из-за различной криотолерантности у разных видов животных и самцов одного вида^{1, 2}.

Охлаждение спермы менее травматично для клеток, чем глубокое замораживание. Оплодотворяющая способность охлажденной спермы выше, чем криоконсервированной, но сохраняется она в течение нескольких суток, чем ограничивает использование^{3, 4}.

Применение разбавителей для хранения спермы в охлажденном виде имеет ряд преимуществ:

- Сохранение морфофункциональной полноценности репродуктивных клеток длительное время с возможностью транспортировки семени на дальние расстояния, не прибегая к криоконсервации.
- Получение высокого процента жизнеспособных сперматозоидов по сравнению с замороженно-оттаянным семенем и, как следствие, высокий уровень продуктивных осеменений.
- Использование генетического материала быков особо ценных, редких и исчезающих пород крупного рогатого скота с низкой криорезистентностью семени для искусственного осеменения и восстановления поголовья.

Охлажденная сперма может использоваться при осеменении коров с удаленной охотой и задержкой овуляции. Так, исследования показали, что в случаях задержки овуляции использование охлажденной спермы приводило к более высокой оплодотворяемости (46,8%) по сравнению с осеменением замороженной спермой (27,7%, $p = 0,017$) [1].

Авторы пришли к выводу, что оплодотворяющая способность охлажденной спермы в длительных интервалах от искусственного осеменения до овуляции может быть выше по сравнению с криоконсервированной и может быть эффективным инструментом для повышения плодovitости лактирующих молочных коров с задержкой овуляции.

Когда свежееякулированные сперматозоиды быстро охлаждаются от температуры тела до температуры ниже 15 °С, применяемый холодовой шок приводит к разной степени потери жизнеспособности сперматозоидов в зависимости от вида, особенно если охлаждение продолжается очень быстро — до плюс 1–2 °С [2, 3].

Чтобы предотвратить старение сперматозоидов во время консервации, необходимы специальные меры. Это включает в себя снижение метаболизма сперматозоидов с помощью снижения температуры. Принципы сохранения охлажденной спермы основаны на добавлении метаболических буферов (ЭДТА, HEPES, хлорид калия, цитрат натрия, бикарбонат натрия и др.), питательных веществ (глюкоза, фруктоза и др.) и защитных веществ (яичный желток, лецитин, молоко и т. д.), на подавлении роста бактерий путем добавления антибиотиков [4–7].

Условия хранения спермы могут влиять на ее качество в зависимости от типа используемого разбавителя, температуры хранения и продолжительности хранения. Сохраняемость разбавителей спермы при температуре охлаждения зависит от того, содержат ли они криопротекторы даже при кратковременном хранении [8].

Проникающие криопротекторы, такие как глицерин, проходят через клеточную мембрану и защищают клетку от повреждений, вызванных медленным замораживанием. Другие вещества могут действовать как криопротекторы по различным механизмам, включая желток, молочные белки, альбумин и липосомы. Эти вещества изменяют липидный состав клеточной мембраны, повышая ее проницаемость для проникающих криопротекторов и обеспечивая большую устойчивость к температурному шоку [9].

Было показано, что хранение при комнатной температуре в течение 72 часов влияет на подвижность в зависимости от используемого разбавителя [10]. Несколько исследований были сосредоточены на влиянии замораживания и оттаивания на качество спермы [11, 12], но лишь немногие исследователи изучали, как условия хранения влияют на ключевые параметры спермы при хранении в охлажденном виде, а не криоконсервированной [13].

Цель работы — оценка общей и прогрессивной подвижности и жизнеспособности спермы быков при охлаждении до 5 °С и хранении в коммерческом и экспериментальном разбавителях.

Материалы и методы исследования / Materials and methods

Исследование проводилось в 2024 г с использованием нативной спермы девяти быков черно-пестрой ($n = 6$) и айрширской пород ($n = 3$), содержащихся в АО «Невское» (г. Санкт-Петербург, Россия).

В опыте использовали быков-производителей в возрастной категории не моложе 3 лет.

Сперма быков отвечала стандартам ГОСТ 23745-2014⁵, концентрация сперматозоидов в эякулятах составляла ≥ 700 млн/мл (фотометр, IMV Technologies, Франция).

Сперму получали на искусственную вагину⁶. После получения каждый индивидуальный эякулят делился на две равные аликвоты для последующего внесения разбавителя. Разбавление проводили в соотношении 1:5 (одна часть спермы и пять частей разбавителя).

В опыте использовали два варианта разбавителей: в качестве контроля применяли коммерческий разбавитель OptiXcell (IMV) (Франция) (не содержит белков животного происхождения, промышленного производства, быстро готовится в производственных условиях и пользуется большой популярностью на племенных станциях), в качестве опыта — разработанный авторами экспериментальный разбавитель (на основе Триса).

После разбавления сперма помещалась в холодильную камеру при температуре 4 °С для экспонирования и последующей оценки переживаемости спермиев.

¹ Иващенко М.Н. Исследование структурно-функционального статуса сперматозоидов быков-производителей при действии молекулярного водорода и создание инновационной среды для криоконсервации спермы. НИР: грант № 23-26-00205. Российский научный фонд. 2023.

² Никиткина Е.В. Генетические основы криоустойчивости спермы животных. Отчет о НИР № 18-16-00071. Российский научный фонд. 2020.

³ Племашов К.В., Смышляев И.В., Нечаев А.Ю., Ладанова М.А., Никитин Г.С., Меболия Е.Г., Анищенко П.С. Оценка качества спермы животных. Учебно-методическое пособие. Санкт-Петербург. 2020. EDN: IIVEUB

⁴ Атрощенко М.М. Изучение влияния гуморального и клеточного биохимического статуса на формирование криорезистентности спермы жеребцов для создания системы сохранения генофонда пород лошадей российской селекции. НИР: грант № 23-16-45001. Российский научный фонд. 2023.

⁵ ГОСТ 23745-2014 Средства воспроизводства. Сперма быков неразбавленная свежеполученная. Технические условия.

⁶ Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. М.: Издательство сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов. 1962; 695.

Оценку проводили через 2 часа после разбавления и затем каждые 24 часа до полной гибели клеток в образце.

Исходя из графика временного распределения, образцы забирали на анализ для оценки качественных показателей репродуктивных клеток. Оценку проводили по показателям общей и прогрессивной подвижности сперматозоидов при помощи анализатора «Аргус-CASA» (Россия), оценку жизнеспособности спермиев — при помощи суправитального окрашивания клеток эозином и нигрозином [14].

Данный метод позволяет по цветовому распределению выявить процент клеток с интактными (бесцветными) и поврежденными (красными) мембранами.

В каждом образце оценивались не менее 200 клеток.

Эксперимент проводился с соблюдением требований, изложенных в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 года о защите животных, использующихся для научных целей⁷, и принципов обращения с животными согласно статье 4 ФЗ РФ N 498-ФЗ⁸.

Статистическую обработку проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 19 (США).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Удлинение срока жизни сперматозоидов при понижении температуры связано с замедлением обмена веществ. Характерная черта сперматозоида — узкая специализация его функций. Созревший сперматозоид не может пополнять разрушения клеточных структур, вызванные обменом веществ.

Правильно подобранный разбавитель спермы и температура хранения смогут продлить жизнь половых клеток [15, 16]. Оплодотворяющая способность охлажденной спермы выше, чем криоконсервированной, поскольку клетки в цикле «замораживание — оттаивание» подвергаются негативному влиянию сверхнизких температур [17–19].

В России охлажденная сперма быков практически не применяется, разбавители для нее давно не совершенствовались. Однако в инструкциях по применению многих разбавителей зарубежного производства для замораживания спермы быков, например Minitube (Германия) и IMV (Франция), имеется пункт о возможности использования для охлажденной спермы.

Авторы провели оценку переживаемости и сохранности мембран сперматозоидов быков при разбавлении экспериментальным разбавителем и OptiXcell (IMV, Франция) при охлаждении и хранении при 5 °С.

Результаты оценки переживаемости представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 видно, что нет достоверной разницы по общей и прогрессивной подвижности между исследуемыми разбавителями. В большинстве случаев сперматозоиды были живы в течение 10 суток.

Если учитывать прогрессивную подвижность 40% как минимально допустимую⁹ для искусственного осеменения, в среднем у исследуемых быков она оставалась такой при хранении до 120 часов. В то же время были отдельные эякуляты, которые имели прогрессивную подвижность 40% и выше и после 168 часов хранения.

При анализе литературных данных максимальное время хранения при 4–5 °С и применения для

Таблица 1. Качественные показатели спермы быков ($n = 9$) в зависимости от времени переживаемости в исследуемых разбавителях при 5 °С

Table 1. Parameters of bull sperm ($n = 9$), depending on the survival time in the studied extenders at 5 °С

Переживаемость, ч.	Экспериментальная среда-разбавитель (опыт)		OptiXcell (IMV) (Франция) (контроль)	
	подвижность общая, %	подвижность прогрессивная, %	подвижность общая, %	подвижность прогрессивная, %
2	82,00 ± 3,11	79,89 ± 2,76	82,00 ± 3,11	79,11 ± 2,62
24	81,67 ± 4,77	77,50 ± 4,23	80,83 ± 4,55	76,67 ± 3,57
48	78,00 ± 4,51	67,50 ± 7,16	77,17 ± 4,13	67,50 ± 6,15
72	78,00 ± 3,11	66,44 ± 5,09	75,89 ± 3,13	62,56 ± 4,61
96	67,00 ± 7,00	62,00 ± 7,00	59,33 ± 9,33	54,33 ± 9,33
120	58,67 ± 11,86	55,00 ± 11,84	58,33 ± 9,35	51,33 ± 8,83
144	53,67 ± 9,07	41,78 ± 7,65	45,56 ± 6,84	35,00 ± 7,71
168	43,56 ± 7,99	30,78 ± 6,84	40,89 ± 5,24	26,78 ± 5,66
192	38,33 ± 8,03	26,67 ± 7,03	26,17 ± 4,28	14,50 ± 3,45
216	23,17 ± 7,56	15,17 ± 5,25	14,67 ± 3,84	7,00 ± 1,98
240	0,67 ± 0,66	0,0	10,33 ± 9,83	5,17 ± 4,92

Таблица 2. Оценка жизнеспособности сперматозоидов быков ($n = 9$) в зависимости от времени переживаемости в исследуемых разбавителях при 5 °С

Table 2. Assessment of the viability of bull sperm ($n = 9$), depending on the survival time in the studied extenders at 5 °С

Переживаемость, ч.	% интактных клеток	
	экспериментальный разбавитель	OptiXcell (IMV) (Франция)
2	61,67 ± 2,92	59,44 ± 3,22
72	61,23 ± 4,92	55,78 ± 4,63
144	46,17 ± 2,61	43,00 ± 3,04
168	46,33 ± 3,84	42,67 ± 3,38

искусственного осеменения — 48 часов [3, 20]. При хранении спермы, разбавленной в экспериментальном разбавителе в течение 144 часов, средняя прогрессивная подвижность была $41,78 \pm 7,65\%$, что соответствует допустимым параметрам для искусственного осеменения. Средняя прогрессивная подвижность в сперме, разбавленной OptiXcell, при хранении в течение 144 часов в данном опыте составила $35,00 \pm 7,71\%$, что является допустимым параметром использования быков с высокой племенной ценностью, если в дозе для осеменения не менее 10 млн сперматозоидов с прогрессивной подвижностью⁵.

Полученные данные по сохранности мембран сперматозоидов при хранении в охлажденном виде представлены в таблице 2.

Из представленных данных видно, что нет достоверных различий по этому показателю при разбавлении исследуемыми разбавителями. При хранении в течение 72 часов практически не было снижения количества интактных клеток при использовании экспериментального разбавителя. При хранении в течение 168 часов количество интактных клеток в обоих разбавителях было выше 41%.

Повышение показателей подвижности и количества сперматозоидов с интактными плазматическими мембранами напрямую влияет на фертильность гамет и последующее плодотворное оплодотворение [21–23].

⁷ Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf

⁸ Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ (ред. от 24.07.2023) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации».

⁹ ГОСТ 26030-2015 Средства воспроизводства. Сперма быков замороженная. Технические условия.

Выводы/Conclusions

Результаты исследования показали сохранение биологической полноценности спермы в охлажденном виде при температуре 5 °С в течение 120 часов в двух разбавителях. В среднем прогрессивная подвижность была 55,00 ± 11,84% при разбавлении в экспериментальном экстендере, 51,33 ± 8,83% — в OptiXcell.

При хранении в течение 144 часов средняя прогрессивная подвижность сперматозоидов при использовании экспериментального разбавителя была 41,78 ± 7,65%, OptiXcell — 35,00 ± 7,71%, интактность клеток

сохранялась на уровне 46,17 ± 2,61% и 43,00 ± 3,04% соответственно. При этом разброс значений по прогрессивной подвижности был от 0 до 68% в экспериментальном разбавителе, от 10 до 70% — в OptiXcell.

Установлено, что сперма одного быка при хранении в течение 192 часов имела прогрессивную подвижность 40% в обоих разбавителях. Это может свидетельствовать о положительной тенденции сохранения полноценности репродуктивных клеток при использовании экспериментального экстендера как среды для разбавления и хранения при 5 °С.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные. Все авторы внесли равный вклад в работу. Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data. All authors made an equal contribution to the work. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проведены в части выполнения работ, предусмотренных государственным заданием Министерства науки и высшего образования РФ по теме № 124020200127-7.

FUNDING

The research was carried out in part to carry out the work provided for by the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation on topic No. 124020200127-7.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Wiebke M., Pieper L., Gürlер H., Janowitz U., Jung M., Schulze M. Effect of using liquid semen on fertility in German Holstein Friesian dairy cattle: A randomized controlled clinical trial. *Theriogenology*. 2023; 199: 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.01.012>
2. Fiser P.S., Fairfull R.W. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*. 1986; 23(6): 518–524. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(86\)90061-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(86)90061-1)
3. Wiebke M., Hensel B., Nitsche-Melkus E., Jung M., Schulze M. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science*. 2022; 246: 106822. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>
4. Alghamdi A.S., Troedsson M.H.T., Xue J.L., Crabo B.G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American Journal of Veterinary Research*. 2002; 63(6): 880–885. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.880>
5. Никиткина Е.В., Шапиев И.Ш., Племяшов К.В., Харитонов С.А. Сверхмалые концентрации производных бензимидазола повышают устойчивость сперматозоидов быков и жеребцов при криоконсервации и действии вредных факторов. *Сельскохозяйственная биология*. 2017; 52(2): 298–305. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.2.298rus>
6. Nikitkina E., Musidray A., Krutikova A., Anipchenko P., Plemyashov K., Shiryayev G. Efficiency of Tris-Based Extender Steridyl for Semen Cryopreservation in Stallions. *Animals*. 2020; 10(10): 1801. <https://doi.org/10.3390/ani10101801>
7. Contreras M.J. et al. Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020; 55(2): 229–239. <https://doi.org/10.1111/rda.13611>
8. Papa P.M. et al. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*. 2015; 83(1): 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.009>
9. Batellier F. et al. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*. 2001; 68(3–4): 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00155-5)
10. Murphy E.M. et al. A comparison of semen diluents on the *in vitro* and *in vivo* fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(2): 1541–1554. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11646>
11. Lonergan P. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*. 2018; 12(S1): s4–s18. <https://doi.org/10.1017/S175173111800071X>
12. Атрощенко М.М., Брагина Е.Е. Влияния криоконсервации спермы жеребцов на морфологические и ультраструктурные показатели сперматозоидов. *Зоотехния*. 2011; (8): 34–35. <https://www.elibrary.ru/ogdckt>
13. Murphy E.M., Eivers B., O'Meara C.M., Lonergan P., Fair S. Effect of storage temperature, nitrogen gassing and sperm concentration on the *in vitro* semen quality and *in vivo* fertility of liquid bull semen stored in INRA96. *Theriogenology*. 2018; 108: 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.012>
14. Agarwal A., Gupta S., Sharma R. Eosin-Nigrosin Staining Procedure. Agarwal A., Gupta S., Sharma R. (eds.). *Andrological Evaluation of Male Infertility. A Laboratory Guide*. Cham: Springer. 2016; 73–77. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5_8
15. Fernandez-Novo A. et al. Effect of Extender, Storage Time and Temperature on Kinetic Parameters (CASA) on Bull Semen Samples. *Biology*. 2021; 10(8): 806. <https://doi.org/10.3390/biology10080806>
16. Fernandez-Novo A. et al. Effects of Extender Type, Storage Time, and Temperature on Bull Semen Parameters. *Biology*. 2021; 10(7): 630. <https://doi.org/10.3390/biology10070630>

REFERENCES

1. Wiebke M., Pieper L., Gürlер H., Janowitz U., Jung M., Schulze M. Effect of using liquid semen on fertility in German Holstein Friesian dairy cattle: A randomized controlled clinical trial. *Theriogenology*. 2023; 199: 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.01.012>
2. Fiser P.S., Fairfull R.W. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*. 1986; 23(6): 518–524. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(86\)90061-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(86)90061-1)
3. Wiebke M., Hensel B., Nitsche-Melkus E., Jung M., Schulze M. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science*. 2022; 246: 106822. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>
4. Alghamdi A.S., Troedsson M.H.T., Xue J.L., Crabo B.G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American Journal of Veterinary Research*. 2002; 63(6): 880–885. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.880>
5. Nikitkina E.V., Shapiey I.Sh., Plemyashov K.V., Kharitonov S.A. Ultra-low concentrations of benzimidazole derivatives can increase bull and horse semen resistance at cryopreservation and under the influence of damaging factors. *Agricultural Biology*. 2017; 52(2): 298–305. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.2.298eng>
6. Nikitkina E., Musidray A., Krutikova A., Anipchenko P., Plemyashov K., Shiryayev G. Efficiency of Tris-Based Extender Steridyl for Semen Cryopreservation in Stallions. *Animals*. 2020; 10(10): 1801. <https://doi.org/10.3390/ani10101801>
7. Contreras M.J. et al. Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020; 55(2): 229–239. <https://doi.org/10.1111/rda.13611>
8. Papa P.M. et al. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*. 2015; 83(1): 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.009>
9. Batellier F. et al. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*. 2001; 68(3–4): 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00155-5)
10. Murphy E.M. et al. A comparison of semen diluents on the *in vitro* and *in vivo* fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(2): 1541–1554. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11646>
11. Lonergan P. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*. 2018; 12(S1): s4–s18. <https://doi.org/10.1017/S175173111800071X>
12. Atroshchenko M.M., Bragina E.E. Influence of stallion sperm cryoconservation on spermatozoan characteristics. *Zootekhnika*. 2011; (8): 34–35 (in Russian). <https://www.elibrary.ru/ogdckt>
13. Murphy E.M., Eivers B., O'Meara C.M., Lonergan P., Fair S. Effect of storage temperature, nitrogen gassing and sperm concentration on the *in vitro* semen quality and *in vivo* fertility of liquid bull semen stored in INRA96. *Theriogenology*. 2018; 108: 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.012>
14. Agarwal A., Gupta S., Sharma R. Eosin-Nigrosin Staining Procedure. Agarwal A., Gupta S., Sharma R. (eds.). *Andrological Evaluation of Male Infertility. A Laboratory Guide*. Cham: Springer. 2016; 73–77. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5_8
15. Fernandez-Novo A. et al. Effect of Extender, Storage Time and Temperature on Kinetic Parameters (CASA) on Bull Semen Samples. *Biology*. 2021; 10(8): 806. <https://doi.org/10.3390/biology10080806>
16. Fernandez-Novo A. et al. Effects of Extender Type, Storage Time, and Temperature on Bull Semen Parameters. *Biology*. 2021; 10(7): 630. <https://doi.org/10.3390/biology10070630>

17. Colombo M. *et al.* Freezability of Dog Semen after Collection in Field Conditions and Cooled Transport. *Animals*. 2022; 12(7): 816. <https://doi.org/10.3390/ani12070816>

18. Усольтцева М.С., Чепуштанова О.В. Криоконсервация спермы козлов. Современные технологии птицеводства и мелкого животноводства. Сборник материалов круглого стола. Екатеринбург: Уральский государственный аграрный университет. 2023; 147–148. <https://www.elibrary.ru/fcwvsu>

19. Горяинова Ю.В. Влияние криоконсервации на качество сперматозоидов у кобелей (обзор иностранной литературы). Теоретические и прикладные основы ветеринарной науки. Сборник трудов научно-практической конференции студентов института ветеринарной медицины и биотехнологии Новосибирского ГАУ. Новосибирск: Издательский центр Новосибирского государственного аграрного университета «Золотой колос». 2023; 78–81. <https://www.elibrary.ru/slhepz>

20. Silva J.C.B. *et al.* Bovine chilled semen by 24h or 48h in two different commercial extenders for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal Reproduction*. 2020; 17(3).

21. Волошина С.О. Факторы, влияющие на становление репродуктивной системы. 75-я итоговая научная конференция студентов Ростовского государственного медицинского университета. Сборник материалов научной конференции. Ростов-на-Дону: Ростовский государственный медицинский университет. 2021; 50–51. <https://www.elibrary.ru/ogcbkf>

22. Багиров В.А. и др. Оценка репродуктивного потенциала производителей с помощью лабораторных исследований спермы. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2015; (1–2): 51–54. <https://www.elibrary.ru/tgevtut>

23. Щербаклова В.В. Значение акросомы в оплодотворяющей способности сперматозоидов. Научные проблемы производства продукции животноводства и улучшения ее качества. Материалы XXXVI научно-практической конференции студентов и аспирантов. Кокино: Брянский государственный аграрный университет. 2021; 141–144. <https://www.elibrary.ru/pdrrkl>

ОБ АВТОРАХ

Елена Владимировна Никиткина

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
nikitkinae@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8496-5277>

Николай Вячеславович Плешанов

научный сотрудник
klaus-90@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4634-7515>

София Сергеевна Богданова

младший научный сотрудник
sonikbogdanova@mail.ru

Юлия Григорьевна Турлова

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
jturlova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-9845-1421>

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московское шоссе, 55А, Пушкин, Санкт-Петербург, 196601, Россия

17. Colombo M. *et al.* Freezability of Dog Semen after Collection in Field Conditions and Cooled Transport. *Animals*. 2022; 12(7): 816. <https://doi.org/10.3390/ani12070816>

18. Usoltseva M.S., Chepushtanova O.V. Cryopreservation of goat sperm. *Modern technologies of poultry farming and small livestock farming. Collection of materials*. Yekaterinburg: Ural State Agrarian University. 2023; 147–148. <https://www.elibrary.ru/fcwvsu>

19. Goryainova Yu.V. The effect of cryopreservation on the quality of spermatozoa in males (review of foreign literature). *Theoretical and applied foundations of veterinary science. Collection of works of the scientific and practical conference of students of the Institute of Veterinary Medicine and Biotechnology of the Novosibirsk State Agrarian University*. Novosibirsk: Publishing center of the Novosibirsk State Agrarian University "Zolotoy kolos". 2023; 78–81. <https://www.elibrary.ru/slhepz>

20. Silva J.C.B. *et al.* Bovine chilled semen by 24h or 48h in two different commercial extenders for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal Reproduction*. 2020; 17(3).

21. Voloshina S.O. Factors influencing the development of the reproductive system. 75th Final Scientific Conference of Students of Rostov State Medical University. Collection of materials of the scientific conference. Rostov-on-Don: Rostov State Medical University. 2021; 50–51. <https://www.elibrary.ru/ogcbkf>

22. Bagirov V.A. *et al.* Evaluation of reproductive potential of producers using laboratory studies of sperm. *Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2015; (1–2): 51–54. <https://www.elibrary.ru/tgevtut>

23. Shcherbakova V.V. The Importance of the Acrosome in the Fertilizing Ability of Spermatozoa. *Scientific Problems of Livestock Production and Improving Its Quality. Proceedings of the XXXVI Scientific and Practical Conference of Students and Postgraduates*. Kokino: Bryansk State Agrarian University. 2021; 141–144. <https://www.elibrary.ru/pdrrkl>

ABOUT THE AUTHORS

Elena Vladimirovna Nikitkina

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher
nikitkinae@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8496-5277>

Nikolai Vyacheslavovich Pleshanov

Research Associate
klaus-90@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4634-7515>

Sofia Sergeevna Bogdanova

Junior Research Assistant
sonikbogdanova@mail.ru

Julia Grigorievna Turlova

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher
jturlova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-9845-1421>

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 55A Moscow highway, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russia