

УДК: 636.082.453.53

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.539

## ПЕРЕЖИВАЕМОСТЬ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ В РАЗНЫХ РАЗБАВИТЕЛЯХ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ ДО 4-5<sup>0</sup> С

Никиткина Е.В.\* – канд. биол. наук., лаборатория биологии развития  
(ORCHID 0000-0002-8496-5277)

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения  
сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ  
имени академика Л. К. Эрнста»

\* nikitkinae@mail.ru

**Ключевые слова:** сперма, жеребцы, разбавители, прогрессивная подвиж-  
ность, акросомы

**Keywords:** semen, stallions, extenders, progressive motility, acrosomes

**Финансирование:** Работа выполнена при финансовой поддержке Министер-  
ства образования и науки, проект № 124020200127-7

Поступила: 11.11.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



### РЕФЕРАТ

60 процентов искусственных осеменений лошадей в мире проводится с использованием охлажденной спермы, так как ее оплодотворяющая способность выше, чем криоконсервированной (источники). Однако, время хранения охлажденной спермы ограничено несколькими часами (источники). Использование разбавителей продлевает сохранность биологической полноценности спермы в охлажденном виде (источники). В проведенном исследовании оценивалась переживаемость и морфология охлажденной спермы жеребцов при использовании 4 разбавителей: ЛХЦЖ, рекомендованного ВНИИ коневодства; Кении, применяемый за рубежом; разбавитель для охлаждения спермы ВНИИГРЖ; опытный, на основе ТРИС и фруктозы. В результате обнаружена достоверная разница показателей общей и прогрессивной подвижности спермы, разбавленной опытной и остальными средами при хранении 24, 48 ( $P<0,05$ ) и 72 часа ( $P<0,01$ ). После хранения в течении 72 часов сперма, разбавленная опытным разбавителем, имела общую подвижность в среднем выше 50%, а прогрессивную  $48,2\pm3,67\%$ , (тогда как ГОСТ имеет следующие показатели: XXXXXX), что позволяет использовать ее для искусственного осеменения. Оценка морфологии сперматозоидов показала сохранность спермиев при хранении 72 часов охлажденном виде при использовании 4-х разбавителей. Результаты исследования показали, что возможно сохранение показателей качества спермы необходимых для искусственного осеменения с применением существующих разбавителей в течении 48 часов, а при разбавлении опытным разбавителем в течении 72 часов.

## ВВЕДЕНИЕ/ INTRODUCTION

В настоящее время наиболее популярным методом сохранения спермы в скотоводстве, кроме КРС является охлаждение [1,2]. Хотя разбавители для охлаждения спермы используются на протяжении многих лет, возможность улучшить их качественные показатели еще не исчерпаны. Различными исследователями предпринято множество попыток изменения состава разбавителей, которые привели к улучшениям [1], однако срок хранения охлажденной спермы остается намного меньше, чем у криоконсервированной спермы [2].

Несмотря на отсутствие популярности и неприятие репродуктивных технологий представителями конной индустрии, искусственные осеменение лошадей растет на протяжении последних двадцати пяти лет [3]. Примерно 60 процентов искусственных осеменений лошадей в мире проводится с использованием охлажденной спермы при температуре охлаждения (4-5 °C), но ее необходимо использовать в течение 24 часов, после чего качество спермиев ухудшается [3].

Разбавители спермы должны содержать компоненты, поддерживающие pH на уровне 6,8-7,2; компоненты, обеспечивающие энергию; антиоксиданты для снижения окислительного стресса; антибиотики для предотвращения контаминации [2,4-8]. Эти свойства поддерживают хранение и транспортировку спермы и позволяют использовать ее в искусственном осеменении. В настоящее время в разбавителях используют такие составляющие как: яичный желток, обезжиренное молоко и растительный источник энергии (соевый лецитин) [2,9].

Разбавители спермы на основе яичного желтка используются в лабораторных и полевых работах из-за доступной цены и удовлетворительных результатов [2]. Обезжиренное молоко и яичный желток используют как непроницающие криопротекторы для сохранения спермы млекопитающих [9,10].

Целью работы было провести оценку подвижности и морфологии спермы же-

ребцов при хранении в охлажденном виде при использовании разбавителей с различным составом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Сперма получена при помощи кобыл в охоте и на фантоме с использованием искусственной вагины Hannover (Minitube, Германия). Эякулят у каждого жеребца собран не менее двух раз. Проанализировано 30 эякулятов 8 жеребцов в возрасте 5-15 лет. В анализ включены эякуляты с такими характеристиками: объем эякулята не менее 30 мл, концентрация сперматозоидов не менее 150 млн/мл, общая подвижность не менее 70%, прогрессивная подвижность не менее 60%. Для анализа влияния разбавителя на качество спермы при охлаждении каждый эякулят разделен на 4 части и каждая часть разведена разбавителем в пропорции 1:2. Использовано 4 разбавителя: Лактозо-хелато-цитрат-желточный (ЛХЦЖ); разбавитель ВНИИГРЖ (на основе сухого молока) [11]; Кенни (на основе сухого молока) и опытный (на основе ТРИС и фруктозы). Все 4 разбавителя содержат гентамицин (5 мг/100 мл) и 5% желтка куриного яйца.

Объем эякулята измерялся мерным стаканом. Концентрация клеток, общая и прогрессивная подвижность определена с помощью компьютерного анализатора качества спермы «Аргус-CASA» (ООО Аргуссофт, Россия) и микроскопа Motic BA 410 (Motic, Китай). Морфология оценивалась окраской Дифф-Квик (НПФ Абрис+, Россия) и «Аргус-CASA». Просмотрено не менее 200 клеток в каждом образце.

Статистический анализ проведен в программе IBM SPSS Statistics 19. Данные были проанализированы с помощью ANOVA. Результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Все парные множественные сравнения между средними значениями проводились с помощью t-тестов. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ/RESULTS

Успех использования охлажденной спермы зависит от таких факторов как: температура хранения, состав разбавителя, количество спермиев в одной дозе осеменения, количества осеменений, времени осеменений и т.д. [3,8]. В своей работе основное внимание я уделила составу разбавителя.

Существует много разбавителей для хранения спермы жеребцов при плюсовых температурах, например, несколько коммерческих производства IMV (Франция), Minitube (Германия) и др. В данной работе проведена оценка подвижности спермиев в процессе хранения при 4-5°C с использованием 4 разбавителей. В качестве контроля выбран разбавитель ЛХЦЖ, рекомендованный ВНИИ коневодства для замораживания и охлаждения спермы жеребцов и разбавитель на основе сухого молока Kenney (Кенни), который используется европейскими и американскими репродуктологами. Также использовался разбавитель ВНИИГРЖ и новый разбавитель на основе ТРИС и фруктозы. Результаты подвижности сперматозоидов приведены в таблице 1.

Из таблицы видно, что сразу при разбавлении достоверных различий по общей и прогрессивной подвижности между разбавителями не наблюдалось. После 2-х часов хранения подвижность снизилась, обнаружена достоверная разница между спермой, разбавленной ЛХЦЖ и опытной средой ( $P<0,05$ ). При хранении 24 и 48 часов достоверная разница обнаружена между опытным и остальными разбавителями, при хранении 72 часа достоверность разницы достигла уровня  $P<0,01$ . После хранения в течении 72 часов сперма, разбавленная опытным разбавителем, имела в среднем общую подвижность выше 50%, а прогрессивную  $48,2\pm3,67\%$ , что делает возможным использовать ее для искусственного осеменения. Анализ полученных результатов показал индивидуальные различия между жеребцами при хранении спермы в охлажденном виде при 4-5 °C. Так у двух жеребцов сперма, разбавленная всеми разбавителями, имела

прогрессивную подвижность выше 20% после хранения в течении 72 часов и оказалась пригодна к осеменению. У одного жеребца прогрессивная подвижность спермы в разбавителях ЛХЦЖ, Кенни и ВНИИГРЖ была ниже 10% при хранении 48 часов и 20% при разбавлении опытной средой и хранении 72 часа.

Молоко и разбавители на основе молока практичны и эффективны для защиты сперматозоидов лошадей во время хранения перед искусственным осеменением [12]. Однако молоко представляет собой биологическую жидкость со сложным составом и содержит компоненты, которые могут быть как полезны так вредны для выживания спермиев. Среди протестированных фракций нативный фосфоказеинат (NPPC), состоящий из общих мицеллярных казеинов, и  $\beta$ -лактоглобулин, оказались защитными, в то время как  $\alpha$ -лактальбумин, оказался вредным [13]. Из полученных результатов видно, что разбавители на основе молока уступали разбавителю на основе фруктозы по сохранению подвижности сперматозоидов при хранении в охлажденном виде. Потребление энергии отвечает за продолжение развития и функционирование клеток, и гаметы не исключение. Два метаболических пути – окислительное фосфорилирование и гликолиз производят аденозинтрифосфат (АТФ), который поставляет энергию для функций сперматозоидов [14,15]. Сахар, такой как фруктоза и глюкоза, считается источником энергии в сперматозоидах. Однако фруктоза предпочтительный сахар для поддержания функциональной целостности мембраны, адекватной подвижности сперматозоидов и тонизирующего эффекта после размораживания [16]. В последнее время большинство коммерческих разбавителей производятся на основе фруктозы. Разработанный мной разбавитель для спермы жеребцов на основе фруктозы и ТРИС показал более высокий результат общей и прогрессивной подвижности спермиев после хранения при 4-5°C в течении 72 часов.

Таблица 1 – Подвижность сперматозоидов жеребцов при хранении спермы в разбавителях при 4-5 °С

| Время хранения, ч | Подвижность      | Разбавитель            |                        |                        |                        |
|-------------------|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                   |                  | ЛХЦЖ                   | ВНИИГРЖ                | Кенни                  | Опытный                |
| 0                 | Общая, %         | 79,3±2,54              | 79,3±2,54              | 79,3±2,54              | 79,3±2,54              |
|                   | Прогрессивная, % | 69,4±2,81              | 69,4±2,81              | 69,4±2,81              | 69,4±2,81              |
| 2                 | Общая, %         | 62,5±2,33 <sup>a</sup> | 68,3±2,77              | 69,5±3,23              | 70,1±3,68 <sup>b</sup> |
|                   | Прогрессивная, % | 50,8±3,21 <sup>a</sup> | 62,5±6,55              | 63,3±5,57              | 68,9±2,88 <sup>b</sup> |
| 24                | Общая, %         | 43,4±3,98 <sup>a</sup> | 55,3±2,45 <sup>a</sup> | 41,6±4,23 <sup>a</sup> | 67,6±3,11 <sup>b</sup> |
|                   | Прогрессивная, % | 38,6±4,40 <sup>a</sup> | 47,6±5,95 <sup>a</sup> | 35,1±6,97 <sup>a</sup> | 60,8±3,67 <sup>b</sup> |
| 48                | Общая, %         | 30,5±4,23 <sup>a</sup> | 40,4±3,67 <sup>a</sup> | 36,4±3,97 <sup>a</sup> | 59,3±4,12 <sup>b</sup> |
|                   | Прогрессивная, % | 25,7±6,21 <sup>a</sup> | 34,0±4,71 <sup>a</sup> | 25,2±4,00 <sup>a</sup> | 51,3±3,33 <sup>b</sup> |
| 72                | Общая, %         | 17,8±4,23 <sup>c</sup> | 20,1±3,67 <sup>c</sup> | 18,6±3,46 <sup>c</sup> | 52,5±4,23 <sup>d</sup> |
|                   | Прогрессивная, % | 14,0±5,33 <sup>c</sup> | 15,7±4,52 <sup>c</sup> | 14,3±5,81 <sup>c</sup> | 48,2±3,67 <sup>d</sup> |

<sup>ab</sup>*P*<0,05; <sup>cd</sup>*P*<0,01

Таблица 2 – Морфология сперматозоидов жеребцов при хранении в спермы в разбавителях при 4-5 °С

| Время хранения, ч | Показатели качества      | Разбавитель            |           |                        |                        |
|-------------------|--------------------------|------------------------|-----------|------------------------|------------------------|
|                   |                          | ЛХЦЖ                   | ВНИИ-ГРЖ  | Кенни                  | Опытный                |
| 0                 | Набухшие акросомы, %     | 8,0±1,01               | 8,0±0,98  | 8,6±0,89               | 8,0±0,99               |
|                   | Сморщенные акросомы, %   | 0,7±0,23               | 0,7±0,25  | 0,5±0,14               | 0,7±0,21               |
|                   | Отсутствие акросом, %    | 1,5±0,40               | 0,6±0,33  | 0,9±0,42               | 0,9±0,31               |
|                   | Патологические хвосты, % | 28,8±3,88              | 27,0±2,83 | 29,7±3,46              | 27,4±2,76              |
| 2                 | Набухшие акросомы, %     | 9,8±1,50               | 9,7±1,20  | 8,4±1,65               | 8,1±2,11               |
|                   | Сморщенные акросомы, %   | 0,9±0,37               | 0,8±0,29  | 0,5±0,18               | 0,7±3,23               |
|                   | Отсутствие акросом, %    | 1,7±0,64               | 1,1±0,37  | 1,7±0,53               | 1,0±0,34               |
|                   | Патологические хвосты, % | 35,0±6,41              | 28,0±5,24 | 29,5±7,55              | 27,1±5,24              |
| 24                | Набухшие акросомы, %     | 11,7±1,25              | 10,4±0,89 | 10,2±1,11              | 9,5±2,12               |
|                   | Сморщенные акросомы, %   | 1,0±0,34               | 0,8±0,18  | 0,9±0,53               | 0,8±0,54               |
|                   | Отсутствие акросом, %    | 2,0±0,37               | 1,1±0,27  | 1,7±0,11               | 1,0±0,31               |
|                   | Патологические хвосты, % | 36,7±5,30              | 28,6±3,11 | 36,7±3,77              | 27,6±3,76              |
| 48                | Набухшие акросомы, %     | 12,7±1,68              | 10,5±1,42 | 10,3±1,45              | 9,9±1,61               |
|                   | Сморщенные акросомы, %   | 1,2±0,48               | 0,8±0,12  | 0,9±0,14               | 0,8±0,17               |
|                   | Отсутствие акросом, %    | 2,1±0,58               | 1,1±0,46  | 1,7±0,16               | 1,0±0,18               |
|                   | Патологические хвосты, % | 36,2±4,57              | 32,6±3,29 | 43,3±4,30 <sup>a</sup> | 28,9±3,76 <sup>b</sup> |
| 72                | Набухшие акросомы, %     | 13,6±1,99              | 11,3±1,47 | 13,6±2,93              | 10,0±1,81              |
|                   | Сморщенные акросомы, %   | 1,2±0,49               | 0,8±0,38  | 0,9±0,69               | 0,8±0,19               |
|                   | Отсутствие акросом, %    | 2,3±0,51               | 1,1±0,19  | 1,7±0,52               | 1,0±0,17               |
|                   | Патологические хвосты, % | 40,6±3,61 <sup>a</sup> | 32,6±2,60 | 43,9±3,65 <sup>a</sup> | 29,5±3,44 <sup>b</sup> |

<sup>ab</sup>*P*<0,05.

Известно, что оценка только прогрессивной подвижности не достаточна при оценке качества спермы [17]. Данные по морфологии сперматозоидов при хранении в охлажденном виде представлены в таблице 2.

При оценке морфологии сперматозоидов выделены такие повреждения клеток как: состояние акросомного чехлика – набухание, сморщивание и отсутствие; патологические хвосты. Нарушения в области шейки, отсутствие хвостов, обломанные или скрученные, двойные хвосты объединены в графу патологические хвосты. Нарушений в области головки сперматозоида было мало, они не учтены в этом исследовании.

Из данных таблицы видно, что в первые сутки хранения морфология сперматозоидов не изменялась. В течении 72 часов хранения выросло число клеток с набухшими акросомами с 8 до 10-13% при использовании всех разбавителей. Число клеток со сморщенными и отсутствующими акросомами не изменялось. Набухание акросом связано с холодовым шоком, одной из причин начала акросомной реакции. Но полученное в нашем исследовании число клеток с набухшей акросомой (10-13 %) при хранении спермы в охлажденном виде в течении 72 часов не мешает использовать сперму в искусственном осеменении. Искусственное осеменение кобыл такой спермой дало положительный результат (75 % оплодотворяемости). Наиболее заметно проходило увеличение числа клеток с патологическими хвостами, особенно при разбавлении средами ЛЦХЖ и Кенни и через 72 часа хранения наблюдались достоверные различия с опытным разбавителем.

#### ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, наблюдалось влияние разбавителя на переживаемость спермы жеребцов при охлаждении до 4-5°C. Более высокие показатели общей и прогрессивной подвижности спермиев при хранении в охлажденном виде в течении 72 ч были у спермы разбавленной опытной средой на основе ТРИС и фруктозы. Для

увеличения периода сохранения подвижности спермиев, интактности акросом и снижения повреждений в области хвоста и шейки необходимо доработать состав разбавителя.

#### STALLION SPERM SURVIVAL IN VARIOUS EXTENDERS WHEN COOLING AT 4-5°C

Nikitkina E.V.\* – Ph.D. biological sciences, laboratory of developmental biology (ORCHID 0000-0002-8496-5277)

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

\* nikitkinae@mail.ru

**Funding:** The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science, project No. 124020200127-7

#### ABSTRACT

Most equine artificial insemination is now carried out using chilled semen, as its fertilizing capacity is higher than cryopreserved semen. However, the possibility of long-term storage of chilled sperm is limited. The use of extenders allows to prolong the preservation of the biological value of chilled sperm. In this study, the survival rate and morphology of chilled stallion sperm were assessed using different extenders. Four extenders were used: LHCZh, recommended by the All-Russian Research Institute of Horse Breeding, Kanny, widely used abroad, extender for cooling sperm of the All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, and an experimental extender based on TRIS and fructose. A reliable difference was observed in the total and progressive motility of sperm diluted with the experimental and other media during storage for 24, 48 ( $P<0.05$ ) and 72 hours ( $P<0.01$ ). After storage for 72 hours, sperm diluted with the experimental extender had an average total motility over 50% and a progressive motility  $48.2\pm3.67\%$ , which makes it possible to use it for artificial in-

semination. Evaluation of sperm morphology showed good preservation of cells during 72-hour storage at 4-5°C when using all extenders. The results of this study showed preservation of sperm quality necessary for artificial insemination for 48 hours, and when diluted with the experimental extender for 72 hours.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Henry, A.M.S. Factors associated with successful homologous artificial insemination / A.M.S. Henry, O.E. Raphael, and A.M.M. Carmen // *Gynecol. Reprod. Health.* – 2019. – № 3(2). – С. 1-5. [www.scivisionpub.com/pdfs/factors-associated-to-successful-homologous-artificial-insemination-682.pdf](http://www.scivisionpub.com/pdfs/factors-associated-to-successful-homologous-artificial-insemination-682.pdf)
2. Bustani, G.S. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders / G.S. Bustani, F.H. Baiee // *Veterinary World.* – 2021. – № 14(5). – С. 1220-1233. [www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233](http://www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233)
3. Kowalczyk, A. Factors Influencing the Popularity of Artificial Insemination of Mares in Europe / A. Kowalczyk, E. Czerniawska-Piątkowska, M. Kuczaj // *Animals.* – 2019. – №9. – С. 460. <https://doi.org/10.3390/ani9070460>
4. Liu, C.H. Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential / C.H. Liu, H.B. Dong, D.L. Ma, Y.W. Li, D. Han, M.J. Luo, J.H. Tan // *Anim. Reprod. Sci.* – 2016. – № 164 (1). – С. 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.011>
5. Mousavi, S.M. Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation / S.M. Mousavi, A. Towhidi, M. Zhandi, G. Amoabediny, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, M. Sharafi, S.M.H. Hussaini // *Anim. Reprod. Sci.* – 2019. – № 209(10). – С. 106171. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106171>
6. Mohamed, M.Y. Influence of adding different energy sources to the bull and ram spermatozoa exposed to different refrigerating times / M.Y. Mohamed, A.M. Abd El-Hafeez, A.M. Shaarawy // *Egypt. J. Sheep Goats Sci.* – 2019. – № 14(2). – С. 1-18
7. Schulze, M. Antibiotics and their alternatives in artificial breeding in livestock / M. Schulze, E. Nitsche-Melkus, B. Hensel, M. Jung, U. Jakop // *Anim. Reprod. Sci.* – 2020. – № 220(9). – С. 106284. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106284>
8. Hameed, N. Effects of different extenders, storage temperatures, and antioxidant supplementation on chilled semen quality: a review / N. Hameed, S. Akhter, J.M.G. Souza-Fabjan, M. Zubair, M. Irfan-Ur-Rehman Khan // *Trop Anim Health Prod.* – 2024. – № 56(2). – С. 85. doi: 10.1007/s11250-024-03930-2. PMID: 38386220.
9. Filho, I.C.B. Skim milk-egg yolk-based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation / I.C.B. Filho, C.D. Pederzoli, A.M. Sgaravatti, R.M. Gregory, C.S.D. Filho, M.I.M. Jobim, R.C. Mattos // *Anim. Reprod.* – 2018. – № 6(2). – С. 392-399.
10. Neuhauser, S. Comparison of the effects of five semen extenders on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm / S. Neuhauser, H. Bollwein, M. Siuda, J. Handler // *J. Equine Vet. Sci.* – 2019. – № 79(8). – С. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.05.002>
11. Никиткина Е.В. Разбавитель (среда) ВНИИГРЖ для хранения спермы жеребцов при 4-5°C Патент на изобретение RU 2610554 С, 13.02.2017. Заявка № 2015149452 от 17.11.2015.
12. Batellier, F. Advances in cooled semen technology / F. Batellier, M. Vidament, J. Fauquant, G. Duchamp, G. Arnaud, J.M. Yvon, M. Magistrini // *Animal Reproduction Science.* – 2001. – № 68 (3-4). – С. 181-190. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00155-5)
13. Batellier, F. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. / F. Batellier, M. Magistrini, J. Fauquant, E. Palmer // *Theriogenology.* – 1997. – № 48 (3). – С. 391-410. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00250-1)
14. du Plessis, S.S. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do sperma-

- tozoa use? / S.S. du Plessis, A. Agarwal, G. Mohanty, M. Van der Linde // *Asian J. Androl.* – 2015. – №17(2). – C.230-235. doi: 10.4103/1008-682X.135123.
15. Nikitkina, E. Assessment of Semen Respiratory Activity of Domesticated Species before and after Cryopreservation: Boars, Bulls, Stallions, Reindeers and Roosters / E. Nikitkina, I. Shapiev, A. Musidray, A. Krutikova, K. Plemyashov, S. Bogdanova, V. Leibova, G. Shiryaev, J. Turlova // *Vet. Sci.* – 2022. – № 9. – C.513. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100513>
16. Cantanhêde, L.F. Use of alternative extender added of fructose aiming the cryopreservation of boar semen / L.F. Cantanhêde, E.N. de Freitas, T.B. Barros, D.B. Guimarães, A.V. Dias, R. Toniolli // *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* – 2018. – №55(1) – C.1-10. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.115739>
17. Атрощенко М.М., Калашников В.В., Брагина Е.Е., Зайцев А.М. Сравнительное изучение ультраструктуры сперматозоидов в эпидидимальной, эякулированной и криоконсервированной сперме жеребцов / М.М. Атрощенко, В.В. Калашников, Е.Е. Брагина, А.М. Зайцев // *Сельскохозяйственная биология.* – 2017. – Т. 52. – № 2. – С. 274-281. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.2.274rus>
- REFERENCES**
1. Henry, A.M.S. Factors associated with successful homologous artificial insemination / A.M.S. Henry, O.E. Raphael, and A.M.M. Carmen // *Gynecol. Reprod. Health.* 2019: 3(2):1-5. [www.scivisionpub.com/pdfs/factors-associated-to-successful-homologous-artificial-insemination-682.pdf](http://www.scivisionpub.com/pdfs/factors-associated-to-successful-homologous-artificial-insemination-682.pdf)
2. Bustani, G.S. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders / G.S. Bustani, F.H. Baiee // *Veterinary World.* 2021:14(5):1220-1233. [www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233](http://www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233)
3. Kowalczyk, A. Factors Influencing the Popularity of Artificial Insemination of Mares in Europe / A. Kowalczyk, E. Czerniawska-Piątkowska, M. Kuczaj // *Animals.* 2019:9:460. <https://doi.org/10.3390/ani9070460>
4. Liu, C.H. Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential / C.H. Liu, H.B. Dong, D.L. Ma, Y.W. Li, D. Han, M.J. Luo, J.H. Tan // *Anim. Reprod. Sci.* 2016:164(1):47-56. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.011>
5. Mousavi, S.M. Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation / S.M. Mousavi, A. Towhidi, M. Zhandi, G. Amoabediny, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, M. Sharafi, S.M.H. Hussaini // *Anim. Reprod. Sci.* 2019:209(10):106171. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106171>
6. Mohamed, M.Y. Influence of adding different energy sources to the bull and ram spermatozoa exposed to different refrigerating times / M.Y. Mohamed, A.M. Abd El-Hafeez, A.M. Shaarawy // *Egypt. J. Sheep Goats Sci.* 2019:14(2):1-18
7. Schulze, M. Antibiotics and their alternatives in artificial breeding in livestock / M. Schulze, E. Nitsche-Melkus, B. Hensel, M. Jung, U. Jakop // *Anim. Reprod. Sci.* 2020: 220(9):106284. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106284>
8. Hameed, N. Effects of different extenders, storage temperatures, and antioxidant supplementation on chilled semen quality: a review / N. Hameed, S. Akhter, J.M.G. Souza-Fabjan, M. Zubair, M. Irfan-Ur-Rehman Khan // *Trop Anim Health Prod.* 2024:56(2):85. doi: 10.1007/s11250-024-03930-2. PMID: 38386220.
9. Filho, I.C.B. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation / I.C.B. Filho, C.D. Pederzoli, A.M. Sgaravatti, R.M. Gregory, C.S.D. Filho, M.I.M. Jobim, R.C. Mattos // *Anim. Reprod.* 2018:6(2): 392-399.
10. Neuhauser, S. Comparison of the effects of five semen extenders on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm / S. Neuhauser, H. Bollwein, M. Siuda, J. Handler // *J. Equine Vet. Sci.* 2019:79(8):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.05.002>

- 
11. Nikitkina E.V. Extender (medium) VNII-GRZH for storing stallion sperm at 4-5 °C Patent for invention RU 2610554 C, 13.02.2017. Application No. 2015149452 dated 17.11.2015.
12. Batellier, F. Advances in cooled semen technology / F. Batellier, M. Vidament, J. Fauquant, G. Duchamp, G. Arnaud, J.M. Yvon, M. Magistrini // *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).
13. Batellier, F. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. / F. Batellier, M. Magistrini, J. Fauquant, E. Palmer // *Theriogenology*. 1997:48 (3):391-410. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00250-1).
14. du Plessis, S.S. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do spermatozoa use? / S.S. du Plessis, A. Agarwal, G. Mohanty, M. Van der Linde // *Asian J. Androl*. 2015:17(2):230-235. doi: 10.4103/1008-682X.135123.
15. Nikitkina, E. Assessment of Semen Respiratory Activity of Domesticated Species before and after Cryopreservation: Boars, Bulls, Stallions, Reindeers and Roosters / E. Nikitkina, I. Shapiey, A. Musidray, A. Krutikova, K. Plemyashov, S. Bogdanova, V. Leibova, G. Shiryayev, J. Turlova // *Vet. Sci*. 2022:9:513. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100513>
16. Cantanhêde, L.F. Use of alternative extender added of fructose aiming the cryopreservation of boar semen / L.F. Cantanhêde, E.N. de Freitas, T.B. Barros, D.B. Guimarães, A.V. Dias, R. Toniolli // *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 2018:55:1-10. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.115739>
17. Atroschenko M.M., Kalashnikov V.V., Bragina E.E., Zaitsev A.M. Comparative study of sperm ultrastructure in epididymal, ejaculated and cryopreserved sperm of stallions / M.M. Atroschenko, V.V. Kalashnikov, E.E. Bragina, A.M. Zaitsev // *Agricultural biology*. 2017: 52:2:274-281. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.2.274eng>