

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТОКОЛОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Марина Владимировна Федорова¹, Елена Александровна Корочкина²

^{1,2}Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

¹студент 1-го курса

²д-р.ветеринар.наук, доц, e.kora@mail.ru

РЕФЕРАТ

Сперма быков производителей, обладающих выдающимися генетическими характеристиками, представляет собой ценнейший ресурс, который используется, главным образом, для искусственного осеменения коров и улучшения потомства. Результативность проведения данной технологии определяется эффективностью криоконсервации спермы. Целью данной работы является анализ эффективности различных протоколов криоконсервации спермы быков-производителей. Установлено, что для плодотворного осеменения коров необходимо наличие в размороженной спермадозе (соломинке) около 6×10^6 подвижных сперматозоидов. Для получения данного результата необходимо проведение подготовки образцов, которые включает в себя центрифугирование с дальнейшим удалением семенной плазмы, разбавление, охлаждение, а также соблюдение протокола глубокой заморозки (-196°C). Сахара, холестерин-циклодекстрин, антиоксиданты, входящие в состав разбавителей оказывают положительное влияние на эффективность протоколов криоконсервации. Одной из распространенных технологий является технология с использованием автоматического режима, который включает в себя охлаждение образцов при температуре $+4^\circ\text{C}$ до -10°C при $-3^\circ\text{C}/\text{мин}$ и от -10°C до -80°C при $-40^\circ\text{C}/\text{мин}$. Далее, при температуре -80°C соломинки со спермой погружают в жидкий азот. Оптимальной технологией оттаивания является 35°C в течение 30 секунд.

Ключевые слова: криоконсервация, быки- производители, сперма, искусственное осеменение.

Для цитирования: Федорова М.В., Корочкина Е.А. Сравнительный анализ протоколов криоконсервации спермы быков-производителей // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. 2025. №1. с 72-76. <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.1.72>

COMPARATIVE ANALYSIS OF SEMEN CRYOPRESERVATION PROTOCOLS OF BREEDING BULLS

Marina V.I. Fedorova¹, Elena A.I. Korochkina²

^{1,2}Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

¹1st year student

²Dr. of Veterinary Sciences, Assoc. Prof., e.kora@mail.ru

ABSTRACT

Sperm of breeding bulls with outstanding genetic characteristics is a valuable resource used mainly for artificial insemination of cows and improvement of offspring. The effectiveness of this technology is determined by the efficiency of sperm cryopreservation. The aim of this work is to analyze the effectiveness of various protocols for cryopreservation of bull sperm. It has been established that for fruitful insemination of cows, the presence of about 6×10^6 motile spermatozoa in a sperm dose (straw) after thawing is necessary. To obtain this result, it is necessary to carry out preliminary sample preparation, which includes centrifugation with subsequent removal of seminal plasma, dilution, cooling, and compliance with the deep freezing protocol (-196°C). Sugars, cholesterol-cyclodextrin, antioxidants included in the diluents have a positive effect on the effectiveness of cryopreservation protocols. One of the common technologies is the technology using an automatic mode, which includes cooling samples at a temperature of $+4^\circ\text{C}$ to -10°C at $-3^\circ\text{C}/\text{min}$ and from -10°C to -80°C at $-40^\circ\text{C}/\text{min}$. Then, at a temperature of -80°C , the straws with sperm are immersed in liquid nitrogen. The optimal thawing technology is 35°C for 30 seconds.

Key words: cryopreservation, breeding bulls, sperm, artificial insemination.

For citation: Fedorova M.V., Korochkina E.A. Comparative analysis of protocols for cryopreservation of semen of breeding bulls. Legal regulation in veterinary medicine. 2025;1:72-76. (in Russ) <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.1.72>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из главных задач животноводческого сектора экономики нашей страны является создание продовольственной безопасности, главным образом с помощью масштабирования высокопродуктивных коров и численности животноводческих хозяйств. Последнее достигается по средством использования вспомо-

гательных репродуктивных технологий (БРТ), главным образом искусственного осеменения сельскохозяйственных животных. Одним из ключевых факторов, определяющих успешность данной технологии является криоконсервация спермы, которая позволяет сохранять генетический материал на длительные сроки, что открывает широкие возможности для селекционного улуч-

шения пород и поддержания генетического разнообразия. На сегодняшний день существует огромное количество протоколов глубокой заморозки и оттаивания спермы производителей, главным образом – быков. Различные криопротекторы, скорости замораживания и размораживания, а также условия хранения могут оказывать значительное влияние на жизнеспособность и подвижность сперматозоидов после размораживания. Важно понимать, выбор оптимального протокола криоконсервации может существенно повлиять на результаты искусственного осеменения и эффективность всего животноводческого производства. В связи с этим, актуальным является анализ эффективности различных протоколов криоконсервации спермы быков-производителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами служили научно-практические исследования ученых из России и других стран, методами - структурный и системный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Технология заморозки семени

Как известно, процесс криоконсервации включает в себя центрифугирование с дальнейшим удалением семенной плазмы, разбавление, охлаждение, погружение в сверхнизкие температуры (-196°C). В настоящее время существует довольно большое количество протоколов глубокой заморозки спермы. Так, одной из распространенных является технология, разработанная во Франции. Процесс замораживания состоит из нескольких этапов. Вначале идет расфасовка свежей спермы в соломинки (чаще всего объемом 0,25). На каждой соломинке указываются название предприятия, кличка быка, его номер, порода и дата заморозки спермы, которая соответствует дате ее взятия. Этот этап автоматизирован. Информация с компьютера из базы данных поступает на станок по расфасовке и маркировке спермы. В дальнейшем соломинки размещают на специальные рамки. Здесь образцы находятся в течение 2–3 ч при температуре $3-5^{\circ}\text{C}$. При этом, происходит установка программы постепенного понижения температуры. После охлаждения до температуры $3-5^{\circ}\text{C}$ сперму помещают в специальные камеры, в которых происходит ее замораживание жидким азотом, сначала до -100°C , а затем до -140°C . После этого сперму помещают в банк хранения, где она находится в жидком азоте. При этом методе хранения спермы находятся в условиях полного анабиоза, когда сильно замедляются все биохимические процессы. Научными исследованиями установлена способность спермиев переносить низкотемпературное замораживание. Наиболее опасной для живых клеток и тканей температурной зоной является интервал от 0 до -30°C . В этом интервале образование и рост кристаллов льда происходит с наибольшей интенсивностью, что приводит к быстрой гибели (повреждение) клеток [12].

Таким образом, при сверхбыстром замораживании спермы до температур -79 , -183 и -196°C благодаря явлению витрификации можно длительное время сохранять ее оплодотворяющую способность и после оттаивания и искусственного осеменения самок получать нормально развитое

потомство сельскохозяйственных животных [7].

Характеристика протоколов криоконсервации

В своей статье Pürhan Barbaros Tuncer с соавтор. проводили замораживание спермы быка производителя с использованием различных сахаров (раффинозы, сахарозы и трегалозы). В исследовании использовались эякуляты трех быков породы Brown-Swiss (возрастом 3 и 4 года). Сперма была заморожена в пяти различных разбавителях: рафиноза 25 мМ + глутамин 3 мМ (RGO), сахароза 25 мМ + глутамин 3 мМ (SGO), трегалоза 25 мМ + глутамин 3 мМ (TGO), глутамин 3 мМ (GO) и контроль (O). Дозы для осеменения были обработаны таким образом, чтобы каждая соломинка объемом 0,25 мл содержала 15×10^6 сперматозоидов. После оттаивания данных образцов было установлено отсутствие положительного влияния данных компонентов на кинематические показатели сперматозоидов, а также результативность искусственного осеменения. Вместе с тем, было зарегистрировано, что GO и RGO обеспечили лучший защитный эффект для акросомы сперматозоидов ($4,0 \pm 0,5\%$ и $12,0 \pm 0,6\%$) и снижения морфологических дефектов ($5,0 \pm 0,3\%$ и $13,0 \pm 0,7\%$; $P < 0,001$) соответственно [5]. При значениях HOST добавки не дали защитного эффекта по сравнению с разбавителем Optydil без добавок ($P > 0,05$). По показателям наступления беременности существенных различий между группами не наблюдалось. Таким образом, сахара в разбавителе для замораживания, могут быть рекомендованы в качестве улучшения эффективности криоконсервации спермы быков.

Комбаров Н. А с соавтор. выясняли оптимальную температуру оттаивания спермы после криоконсервации. Сперму, полученную от быков-производителей голштинской породы в возрасте 3-7 лет, подвергали криоконсервации в полипропиленовых соломинках (72 дозы) на оборудовании фирмы «IMV», модель IS4 (Франция) и необлицованных гранулах (90 доз) на пластинах сухого льда. Использовали следующие режимы оттаивания: $35^{\circ}\text{C} - 30$ с; $38^{\circ}\text{C} - 10$ с (контроль); $50^{\circ}\text{C} - 5$ с; $70^{\circ}\text{C} - 3$ с (по 18 спермодоз в каждом варианте) [1]. При оттаивании спермы, замороженных в необлицованных гранулах, их быстро по одной извлекали из тубы стерильным, предварительно охлажденным в жидком азоте пинцетом и погружали в пенициллиновые флаконы с 0,8 мл разбавителя optiXcell либо с 2,9 % цитрата натрия. При сухом оттаивании гранулы переносили в чистые сухие флаконы. Сразу после оттаивания и далее через 5, 20 и 24 ч после инкубации *in vitro* при 38°C учитывали подвижность (%). Согласно полученным данным было установлено, что сравниваемые режимы оттаивания не оказывают существенного достоверного влияния на количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательными движениями (колебания в пределах 35-38 %). При этом, наибольшую скорость движения сперматозоидов отмечали в образцах, размороженных при 35°C , и она снижалась при деконсервации с ростом температуры водяной бани (при максимальной температуре наблюдали достоверные различия, $p < 0,001$).

Веконґи М. с соавтор. проводили криоконсервацию спермы быка с использованием экзогенного холестерина вместо яичного желтка, несущего риски биологической безопасности. Исследования были проведены на четырех быках мясной породы. Взятие спермы проводилось у каждого быка один раз в неделю с помощью процедуры электроэякуляции [7]. В ходе экспериментов спермадозы (соломинки объемом 0,5 мл), охлаждали от +4°C до -10°C при -3°C/мин и от -10°C до -80°C при -40°C/мин. При -80°C соломинки со спермой погружали в жидкий азот и хранили не менее 24 ч. В первом эксперименте все контрольные образцы ТСА, ТЕУГ и TG-наполнители содержали гентамицин (500 мкг/мл), тилан (100 мкг/мл) и линкоспектин (300/600 мкг/мл) и центрифугировались при режиме 12 000x g в течение 15 мин, далее охлаждались при 4°C в течение 2-х часов [11]. Во втором эксперименте сперма была заморожена в разбавителе СС+TG с различной концентрацией глицерина (от 7%). Качество спермы после размораживания снижалось с уменьшением концентрации глицерина в разбавителе TG, даже более высокая концентрация комплекса СС (3 или 4 мг/мл спермы) не оказывала протекторного эффекта при отсутствии глицерина в разбавителе TG. Характеристики движения спермы после размораживания были схожи между разбавителями СС+TG и контрольными разбавителями ТЕУГ, а также температурой добавления глицерина.

В третьем эксперименте были протестированы потенциалы оплодотворения *in vitro* спермы, замороженной в контрольном разбавителе ТЕУГ и разбавителях СС+TG. Скорость эмбрионального периода при осеменении образцами спермы, замороженной в контрольных разбавителях СС+TG и ТЕУГ, были одинаковыми. Холестерин-циклодекстрин заменил яичный желток из разбавителя спермы; глицерин оставался необходимым для криоконсервации спермы без яичного желтка; а разбавитель СС+TG не изменял плазматическую мембрану сперматозоидов СС+TG, тогда как разбавитель яичного желтка изменял состав плазматической мембраны спермы быка.

Serhat B y kleblebici с соавтор. в своем исследовании сравнивали влияние глицерина (G) и этиленгликоля (EG) в различных концентрациях, а также трегалозы (T) или цистеина (C; с/без) в разбавителе Tris для криоконсервации спермы быка. В исследовании были включены двадцать четыре эякулята, полученные от трех быков. Объем эякулятов измерялся в конической пробирке, градуированной с интервалом 0,1 мл. Каждый эякулят был разделен на четыре равные аликвоты и разбавлен с использованием обоих разбавителей Tris с G (5% или 7%) или EG (3% или 5%). После этого каждый разбавитель был разделен на три равные аликвоты и разбавлен с использованием как 5 мМ С, так и 25 мМ Т, а контроль (без добавок) был охлажден до 4 °С и заморожен в 0,25 мл французских соломинках. Добавление 3% и 5% EG без антиоксидантов привело к наименьшей подвижности по данным компьютерного анализа подвижности спермато-

зоидов (CASA) по сравнению с другими группами. Обработка 25 мМ Т в 3% EG оказала положительное действие на морфологию акросомы по сравнению с другими группами. Обработка 3% EG с 5 мМ С привела к наибольшей концентрации малонового диальдегида (MDA)[13]. Добавление EG 5% без Т или С привело к меньшим значениям подвижности сперматозоидов, чем в других группах ($P < 0,001$), а использование 3% EG привело к меньшей прогрессивной подвижности ($39,13 \pm 2,33\%$) по сравнению с другими группами ($P < 0,05$) [8].

Целью экспериментов Mu  o R. с соавтор. была оценка трех скоростей оттаивания спермы быка, замороженной в соломинках объемом 0,25 мл: помещение соломинок в водяную баню при 37°C на 40 с, при 50°C на 15 с или при 70°C на 5с. Использовалась замороженная сперма от 10 быков голштинской породы в возрасте от 15 до 24 месяцев. Эякуляты собирали с помощью искусственной вагины (внутренняя температура: 45 °С) и оценивали объем, концентрацию спермы с помощью фотометра и подвижность путем субъективной визуальной оценки [14]. В первом эксперименте три скорости оттаивания сравнивались по показателям подвижности сперматозоидов после оттаивания, определенной субъективно, и целостности плазмы спермы и акросомальной мембраны, исследованной с помощью проточной цитометрии, через 0 и 5 ч инкубации при 37 °С. Во втором эксперименте три скорости оттаивания оценивались по кинематическим характеристикам сперматозоидов после оттаивания, определенной с помощью системы CASA, через 0 и 2 ч инкубации при 37 °С. [17]. С точки зрения общей подвижности после размораживания или целостности плазматической и акросомальной мембран сперматозоидов не было выявлено существенных различий между тремя оцененными методами размораживания. Статистический анализ сгруппировал все подвижные сперматозоиды в четыре отдельные субпопуляции с определенными моделями движения: (1) умеренно медленные и прогрессивные сперматозоиды (27%); (2) «гиперактивированные» сперматозоиды (15,4%); (3) слабо подвижные непрогрессивные сперматозоиды (34,3%); (4) быстрые и прогрессивные сперматозоиды (23,3%). Более высокие доли сперматозоидов с быстрым и прогрессивным движением наблюдались через 2 ч инкубации после размораживания, когда размораживание происходило с более высокой скоростью (35 °С/40 с: 8,3%, 50 °С/15 с: 18,1% и 70 °С/5 с: 16,5%) [10].

Yimer N. с соавтор. провел много исследований для определения влияния жирных кислот, особенно полиненасыщенных, на качество охлажденной, замороженной и замороженной-размороженной спермы у разных видов животных [10]. Abavisani A. с соавтор. определили, что АЛК поддерживала подвижность сперматозоидов при 100 мкМ и жизнеспособность при 10 и 50 мкМ в разбавителе на основе цитрата в сперме быка, охлажденной в течение 7 дней. Пальмитиновая кислота и олеиновая кислота способствовали сохранению подвижности и жизнеспособно-

сти при 50 и 100 мкМ [2]. Abaiqar T. с соавтор. в своей работе сообщают, что добавление линолевой кислоты улучшало подвижность замороженных и размороженных сперматозоидов и жизнеспособность спермы быка. Также было установлено, что добавление ДГК улучшило качество замороженной и размороженной спермы быка. [4] Пищевая АЛК улучшила целостность плазматической мембраны, целостность акросомы и целостность ДНК замороженных и размороженных сперматозоидов. Индивидуальное добавление АЛК и ДГК в TRIS и Bioxcell разбавитель улучшило качество охлажденной и замороженной-размороженной спермы быка, в то время как сочетание АЛК и ДГК снизило качество спермы после замораживания. Baker M.A. и Kandelousi M.S. с соавтор. выяснили, что омега-3 ПНЖК не улучшили подвижность, прогрессивность, морфологию и жизнеспособность в цитратном разбавителе в замороженном-размороженном качестве спермы быка [6,11]. Как показывают исследования, добавление в разбавители спермы некоторых антиоксидантов, таких как витамин Е и его синтетического аналога, ВНТ, и жирных кислот, таких как альфа-линолевая кислота, полезно для спермы, чтобы выдерживать физические и биохимические изменения и проблемы, возникающие во время криоконсервации, и приводит к превосходному качеству после размораживания, доступному для искусственного осеменения [2]. Добавки работают лучше всего при определенной оптимальной концентрации, которая зависит от типа используемого разбавителя.

Abdussamad A.M. с соавтор. провели несколько экспериментов Эксперимент № 1 состоял в сравнении *in vitro* трех разбавителей спермы: два на основе яичного желтка (индивидуальный Три-яичный желток-глицерин и Triladyl®), третий (AndroMed®) на основе соевого лецитина. Что касается подвижности после размораживания, фиторазбавитель AndroMed® оказался лучше ($59 \pm 3\%$ против $53 \pm 2\%$ и $53 \pm 2\%$, $P < 0,05$). Ранее было показано, что добавление коммерческого препарата, включающего простагландин F 2 α , - Dinolytic® перед замораживанием ухудшает подвижность после размораживания; поэтому в эксперименте № 2 Dinolytic® добавляли после

размораживания. Замороженные-размороженные сперматозоиды переносили добавление Dinolytic® в концентрации 30% (об./об.) [2]. В ходе эксперимента №3 коровы были осеменены с использованием соломинок, в которых разбавленная сперма и Dinolytic® были заморожены в одной соломинке, разделенные воздушным пузырьком, поэтому смешивание могло произойти только в ходе осеменения [15]. Показатели стельности при дозировках Dinolytic® 0%, 30% или 60% составили 44%, 41% и 56% соответственно ($P > 0,05$).

В статье Foote R.H. прилагается краткий обзор факторов, определяющих количество сперматозоидов, необходимых для осеменения с целью получения высокой фертильности, а также способов продления жизнеспособности сперматозоидов. Повреждение спермы во время замораживания приводит к необходимости после размораживания сохранения около 6×10^6 подвижных сперматозоидов на плодотворное осеменение для достижения почти максимальной фертильности. Текущие исследования направлены на снижение катаболического метаболизма спермы и изучение изменений мембран во время замораживания и размораживания, а также во время инкубации с эпителиальными клетками маточных труб крупного рогатого скота [16]. Исследования, проведенные со спермой быка показывают, что компоненты фосфоглицерида холина и этаноламина в их мембранах представляют собой нестабильную конфигурацию. Воздействие липосом с холестерином стерола на сперму может изменить фосфолипидный слой и увеличить время капацитации. Аналогичные подходы могут производить сперму с более длительным сроком оплодотворения после осеменения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ различных методов криоконсервации показал, что индивидуальный подход к каждому производителю способен значительно повысить результаты искусственного осеменения. Дальнейшие исследования в этой области помогут оптимизировать существующие протоколы и разработать новые методы, что в конечном итоге приведет к улучшению результатов воспроизводства и повышению рентабельности животноводческих хозяйств.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Комбарова Н.А. Опыт использования спермоанализатора SFA-500 для оценки качественных характеристик семени быков-производителей на всех этапах технологического процесса. /Комбарова Н.А, Жаворонкова Н.В., Малиновский А.М., Попов Е.Г. // Практик. 2010. № 2. С. 56-61.
2. Abavisani A. Quality of cooled or frozen-thawed bull semen after addition of omega-3 fatty acids./ Abavisani, A., Arshami, J., Naserian, A.A., Kandelousi, M.A.S., Azizadeh, M. // International Journal of Fertility and Sterility. 2013. №7. С. 161.
3. Abaiqar T . Effect of antioxidants on SOD activity in bull semen./ Abaiqar, T., Martinez, E., Salas, S., et al. // International Biochemistry Journal. 1999. №23. С. 545–553.
4. Abaiqar T. . Effect of natural antioxidants on the preservation of frozen bull semen. / Abaiqar, T., Martinez, E., Salas, S., et al. // Theriogenology. 2001. №40. С. 841–851.
5. Bansal A.K. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation in bovine spermatozoa under oxidative stress./ Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S. // Animal Reproduction Science. 2009. №1. С. 5–14.
6. Baker M.A. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origin of genetic disease and infertility. /. Baker, M.A., Aitken, R.J. // Reproductive Biology and Endocrinology. 2005. №3. С. 67.
7. Bekonyi M. Effect of antioxidants on SOD activity in bull semen. / Bekonyi, M., Affranchino, M., Francia, K., Mora, N. // International Biochemistry Journal. 1991. №23. С. 545–553.
8. du Plessis S.S. Oxidative stress and IVF: a review./ du Plessis, S.S., Mckerlie, K., Desai, N.R., Agarwal,

A // Expert Opinion on Obstetrics Gynecology. 2008. № 3. C. 539–554.

9. Ijaz A. Inclusion of bottled hydroxytyrosol in extender improves the quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen after freezing. / Ijaz, A., Hussain, A., Aleem, M., Yousaf, M., Rehman, H. // Theriogenology. 2009. № 71. C. 1326–1329.

10. Yimer N. Transrectal ultrasonography and evaluation of breeding soundness of bulls in a herd with low reproductive performance. / Yimer, N., Rosnina, Y., Wahid, H., Sahari, A., Yap, K., Ganesamurti, P., Fahmi, M. Pertanika // Journal of Tropical Agricultural Science. 2011. №34. C. 217–228.

11. Kandelousi, M.S. Effect of adding omega-3 fatty acids on the quality of cooled and frozen-thawed bull semen. / Kandelousi, M.S., Arshami, J., Naserian, A., Abavisani, A. // Open Veterinary Journal. 2016. №3. C. 47–52.

12. Kalasichichi O. Study of antioxidant capacity of seminal plasma in cattle – the effect of omega-3 fatty acids. Doctor of Veterinary Medicine (dissertation). University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany. 2010.

13. Cremades L O. Influence of different extenders on cryopreservation of bull semen: a comparative study. / Cremades, L O., Gonzalez-Garcia, I., Gonzalez-Lopez, S., Rivera, R., Lopez-Garcia, S., Pineda-Garcia, // Theriogenology. 2005. №63(5). C. 1374–1387.

14. Nur A. The effect of different cryopreservation methods on bull semen quality: experimental results. / Nur, A., Shaukatullah Gulzar // Journal of Reproduction and Fertility Supplement. 2003. №53(2). C. 73–84.

15. Nunez-Martinez I. Influence of different extenders on cryopreservation of bull semen: a comparative study. / Nunez-Martinez, I., Rivera-Garcia et al. // Theriogenology. 2006. № 66(2). C. 321–329.

16. Hault S.V. Influence of different cryopreservation methods on bull semen quality: experimental results with cryopreservation at low temperatures. // Theriogenology. 1996. №46(4). C. 743–752.

17. Chinyong et al. The effect of different cryopreservation methods on bull semen quality: experimental results with cryopreservation at low temperatures. // Theriogenology. 2008. №69(5). C. 657–663.

REFERENCES

1. Kombarova N.A. Experience in using the SFA-500 sperm analyzer to assess the quality characteristics of the semen of sires at all stages of the technological process. / Kombarova N.A., Zhavoronkova N.V., Malinovsky A.M., Popov E.G. Practitioner, 2010, 2: 56–61

2. Abavisani A. Quality of cooled or frozen-thawed bull semen after addition of omega-3 fatty acids. / Abavisani, A., Arshami, J., Naserian, A.A., Kandelousi, M.A.S., Azizadeh, M. // International Journal of Fertility and Sterility. 2013;7: 161

3. Abaiqar T. Effect of antioxidants on SOD activity in bull semen. / Abaiqar, T., Martinez, E., Salas, S., et al. // International Biochemistry Journal. 1999;23: 545–553.

4. Abaiqar T. Effect of natural antioxidants on the preservation of frozen bull semen. / Abaiqar, T., Martinez, E., Salas, S., et al. // Theriogenology. 2001;40: 841–851.

5. Bansal A.K. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation in bovine spermatozoa under oxidative stress. / Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S. // Animal Reproduction Science. 2009;1: 5–14.

6. Baker M.A. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origin of genetic disease and infertility. / Baker, M.A., Aitken, R.J. // Reproductive Biology and Endocrinology. 2005;3: 67.

7. Bekonyi M. Effect of antioxidants on SOD activity in bull semen. / Bekonyi, M., Affranchino, M., Francia, K., Mora, N. // International Biochemistry Journal. 1991;23: 545–553.

8. du Plessis S.S. Oxidative stress and IVF: a review. / du Plessis, S.S., Mckerlie, K., Desai, N.R., Agarwal, A // Expert Opinion on Obstetrics Gynecology. 2008; 3: 539–554.

9. Ijaz A. Inclusion of bottled hydroxytyrosol in extender improves the quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen after freezing. / Ijaz, A., Hussain, A., Aleem, M., Yousaf, M., Rehman, H. // Theriogenology. 2009;71: 1326–1329.

10. Yimer N. Transrectal ultrasonography and evaluation of breeding soundness of bulls in a herd with low reproductive performance. / Yimer, N., Rosnina, Y., Wahid, H., Sahari, A., Yap, K., Ganesamurti, P., Fahmi, M. Pertanika // Journal of Tropical Agricultural Science. 2011;34: 217–228.

11. Kandelousi, M.S. Effect of adding omega-3 fatty acids on the quality of cooled and frozen-thawed bull semen. / Kandelousi, M.S., Arshami, J., Naserian, A., Abavisani, A. // Open Veterinary Journal. 2016;3: 47–52.

12. Kalasichichi O. Study of antioxidant capacity of seminal plasma in cattle – the effect of omega-3 fatty acids. Doctor of Veterinary Medicine (dissertation). University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany. 2010.

13. Cremades L O. Influence of different extenders on cryopreservation of bull semen: a comparative study. / Cremades, L O., Gonzalez-Garcia, I., Gonzalez-Lopez, S., Rivera, R., Lopez-Garcia, S., Pineda-Garcia, // Theriogenology. 2005; 63(5): 1374–1387.

14. Nur A. The effect of different cryopreservation methods on bull semen quality: experimental results. / Nur, A., Shaukatullah Gulzar // Journal of Reproduction and Fertility Supplement. 2003;53(2): 73–84.

15. Nunez-Martinez I. Influence of different extenders on cryopreservation of bull semen: a comparative study. / Nunez-Martinez, I., Rivera-Garcia et al. // Theriogenology. 2006;66(2): 321–329.

16. Hault S.V. Influence of different cryopreservation methods on bull semen quality: experimental results with cryopreservation at low temperatures. // Theriogenology. 1996;46(4): 743–752.

17. Chinyong et al. The effect of different cryopreservation methods on bull semen quality: experimental results with cryopreservation at low temperatures. // Theriogenology. 2008;69(5): 657–663.

Поступила в редакцию / Received: 03.02.2025

Поступила после рецензирования / Revised: 19.02.2025

Принята к публикации / Accepted: 31.03.2025