



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТОКОЛОВ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ ДЛЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ СПЕРМЫ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Елена Александровна Корочкина¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Российская Федерация
¹д-р.ветеринар.наук, доц., email: e.kora@mail.ru, SPIN-код: 8620-0458, orcid.org/0000-0002-7011-4594

РЕФЕРАТ

В современном животноводстве репродуктивные биотехнологии, такие как искусственное осеменение (ИО), играют ключевую роль в повышении продуктивности и улучшении генетического потенциала сельскохозяйственных животных. ИО позволяет не только максимально эффективно использовать генетический материал выдающихся производителей на большем количестве самок, но и снизить риск распространения инфекционных заболеваний, передающихся половым путем. Успех ИО во многом определяется качеством используемой спермы, которое зависит от методов обработки и хранения эякулята. Среди существующих методов селекции сперматозоидов, центрифугирование занимает одно из ведущих мест. Это метод основан на разделении компонентов эякулята под воздействием центробежной силы. В практике центрифугирования выделяют два основных подхода: стандартное и коллоидное центрифугирование. Стандартное центрифугирование представляет собой однократное разделение компонентов эякулята, при этом режим центрифугирования подбирается в соответствии с видовыми особенностями сперматозоидов: 200–400 об/мин в течение 5–12 мин для грызунов, 720 об/мин в течение 5 мин для собак, 2400 об/мин в течение 5 мин для жеребцов, 5000 об/мин в течение 5 мин для быков, 3000 об/мин в течение 3 мин для козлов, 2400 об/мин в течение 3 мин для кабанов. Коллоидное центрифугирование предусматривает использование специальных коллоидных растворов (Percoll™, Isolate®, Porcicoll®, Bovicoll®, Equipure Bottom Layer®, PureSperm®) для более эффективного отделения сперматозоидов с наилучшими морфологическими и функциональными характеристиками. Коллоидное центрифугирование позволяет получить эякулят более высокого качества, поскольку с его помощью можно отделить не только семенную плазму, но и дефектные, малоподвижные сперматозоиды, а также клетки с поврежденной ДНК.

Ключевые слова: центрифугирование, протоколы, среды, эякулят, производители.

Для цитирования: Корочкина Е.А. Сравнительный анализ эффективности протоколов центрифугирования для предварительной обработки спермы производителей. Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. 2025;3:48–54. <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.3.48>

A COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF CENTRIFUGATION PROTOCOLS FOR PRE-TREATMENT OF SPERM

Elena Al. Korochkina¹

¹Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russian Federation
¹Dr. of Veterinary Sciences, Assoc. Prof., email: e.kora@mail.ru, SPIN code: 8620-0458, orcid.org/0000-0002-7011-4594

ABSTRACT

In modern animal husbandry, reproductive biotechnologies such as artificial insemination (AI) play a key role in increasing productivity and improving the genetic potential of farm animals. AI allows not only to use agricultural material issued by producers in a larger amount of the male animal as efficiently as possible, but also to reduce the risk of spreading sexually transmitted diseases. The success of AI is largely determined by the quality of the sperm used, which depends on the methods of processing and storing the ejaculate. Among the existing methods of sperm selection, centrifugation occupies one of the leading places. This method is based on the separation of the power components of the ejaculate under the influence of centrifugal. As an example of centrifugation, two main combinations were found: standard and colloidal centrifugation. Standard centrifugation is a single separation of the ejaculate components, with this centrifugation mode under transformations in accordance with the species characteristics of spermatozoa: 200–400 rpm for 5–12 min for rodents, 720 rpm for 5 min for dogs, 2400 rpm for 5 min for stallions, 5000 rpm for 5 min for bulls, 3000 rpm for 3 minutes for goats, 2400 rpm for 3 minutes for boars. Colloid centrifugation involves the use of special colloidal solutions (Percoll™, Isolate®, Porcicoll®, Bovicoll®, Equipure Bottom Layer®, PureSperm®) for more effective separation of spermatozoa formed with morphological and functional forms. Colloid centrifugation allows you to obtain higher quality ejaculate, since it can separate not only seminal plasma, but also defective, low-motility spermatozoa, as well as cells with damaged DNA.

Key words: centrifugation, protocols, solutions, ejaculate, male.

For citation: Korochkina E.A. Comparative analysis of the effectiveness of centrifugation protocols for pre-treatment of sperm. Legal regulation in veterinary medicine. 2025;3:48–54. (in Russ) <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.3.48>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных научно-производственных направлений животноводства является вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), эффективность использования которых во многом зависит от качества спермы. Согласно многочисленным исследованиям, причиной низкого качества семени производителей является присутствие дефектных сперматозоидов, клеточного детрита, лейкоцитов, а также веществ, ингибирующих подвижность сперматозоидов или повреждающих их ДНК [3]. В этой связи учеными разработаны методы предварительной обработки эякулята, направленные на селекцию подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов. Одним из основных методов, используемых в настоящее время является центрифугирование (как с использованием коллоидных сред, так и без них). Необходимо отметить, что центрифугирование спермы некоторых производителей с целью удаления семенной плазмы является одним из обязательных этапов подготовки спермы перед проведением криоконсервации. Учитывая частоту использования данных методов в протоколах ВРТ, актуальным является анализ эффективности существующих протоколов, а также сред для фракционного разделения спермы. Данный обзор направлен на обобщение и критический анализ современных исследований в области ВРТ, в частности протоколов предварительной обработки спермы производителей. Данная работа позволит выявить перспективные направления для дальнейших исследований и разработки практических предложений в животноводстве, в частности, применения сред и протоколов центрифугирования спермы для повышения эффективности применения ВРТ.

Целью данной работы явилось проведение сравнительного анализа эффективности протоколов различных видов центрифугирования спермы производителей сельскохозяйственных животных, а также существующих сред для проведения данных протоколов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск научных источников российских и зарубежных авторов был выполнен по следующим ключевым словам и словосочетаниям: сперматозоиды, обработка эякулята, коллоидное центрифугирование. Поиск литературы в рамках данной темы проводился с использованием поисковых систем Google (<https://www.google.ru>) и Yandex (<https://ya.ru/>); онлайн-каталога Google Scholar (<https://scholar.google.ru/>); библиотечных ресурсов и баз данных PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); eLIBRARY.RU (<http://elibrary.ru/defaultx.asp>); ResearchGate (<https://www.researchgate.net/>); CyberLeninka (<https://cyberleninka.ru/>); Scopus (<https://www.scopus.com/>); Web of Science (<https://apps.webofknowledge.com/>). Всего было рассмотрено не менее 100 научных работ, из которых для анализа и составления научной работы включили 34 источника.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Центрифугирование – это метод обработки,

используемый в следующих случаях: 1. когда эякулят имеет низкую начальную концентрацию половых клеток; 2. когда семенная плазма производителя (например, жеребцы, бараны и козлы) оказывает отрицательное влияние на жизнеспособность сперматозоидов, при этом данный метод является важным этапом предварительной обработки эякулята к глубокой заморозке; 3. когда необходимо провести отбор прогрессивно подвижных сперматозоидов с целью повышения эффективности искусственного осеменения самки. Центрифугирование позволяет сконцентрировать сперматозоиды в осадок, и в дальнейшем ресуспендировать в подходящем разбавителе до желаемой концентрации [1]. Существует два основных варианта центрифугирования: стандартное и коллоидное [2].

Протоколы стандартного центрифугирования с целью удаления семенной плазмы.

Результаты исследований Brinsko S.P. с соавтор. (2000), указывают на негативное воздействие на сперматозоиды жеребцов и актуализируют важность проведения центрифугирования с целью удаления семенной плазмы. Gary W. (2009) с соавтор. проводили изучение влияния трёх методов центрифугирования на подвижность сперматозоидов жеребцов после хранения. Две аликвоты каждого эякулята развели разбавителем на основе обезжиренного молока и глюкозы (SKMG), помещали в конические пробирки объёмом 50 мл и центрифугировали при 700 об/мин в течение 15 минут или при 600 об/мин в течение 12 минут. Третью аликвоту разбавляли в соотношении 1:1 с SKMG, помещали в конические пробирки объёмом 15 мл и центрифугировали при 400 об/мин в течение 7 минут. После центрифугирования образцы из каждой аликвоты хранили при температуре 5°C для оценки через 24 и 48 часов или замораживали в жидком азоте. Согласно результатам сравнительного анализа, наиболее эффективным было использование протокола стандартного центрифугирования при 400 об/мин в течение 7 минут.

Современные протоколы криоконсервации спермы хряков также включают в себя предварительную подготовку, в частности – обязательное удаление семенной плазмы, которое достигается при кратковременном центрифугировании - 2400 об/мин в течение 3 минут. Как отмечает Carvajal G. с соавтор. (2004), использование данного протокола способствует отбору жизнеспособных сперматозоидов и их более высокой переживаемости в процессе криоконсервации.

Hopkins H. (2023) в своей работе использовали центрифугирование с целью отбора подвижных сперматозоидов жеребцов. При этом проводили центрифугирование при 1000 об/мин в течение 20 минут с буферным раствором Red Cushion™ (Botupharma), а также при 400 об/мин в течение 10 минут без буфера. Было установлено, что наибольший процент выделения жизнеспособных сперматозоидов достигается при разбавлении с буферным раствором и протоколом, вклю-

чающим 1000 об/мин - 20 минут.

В исследованиях, проведенных Gloria A. с соавтор. (2024) было установлено, что оптимальным протоколом центрифугирования спермы кошачьих с целью выделения жизнеспособных сперматозоидов является 1000 об/мин в течение 10 минут.

Нельзя не отметить установленный негативный эффект стандартного центрифугирования на качественные характеристики сперматозоидов. Так, по данным Neila-Montero M. с соавтор. (2021), использование более высоких центробежных сил и более длительного времени центрифугирования приводит к более интенсивному осаждению сперматозоидов, но оказывает пагубное влияние на сперму, снижая её подвижность и жизнеспособность [11,12]. В этой связи, режим центрифугирования должен обеспечивать баланс между эффективностью центрифугирования (чистоты отбора) и его влиянием на качество спермы. Поэтому актуальным является подбор протоколов с учетом видовых особенностей сперматозоидов [7]. У некоторых млекопитающих, таких как грызуны, собаки и человек сперма очень чувствительна к механическим и центробежным силам, поэтому многочисленными исследованиями рекомендованы следующие протоколы: 200-400 об/мин в течение 5-12 мин для грызунов [20], 720 об/мин в течение 5 мин для собак [33] и 300-600 об/мин в течение 10-20 минут для человека [24]). Кроме того, общей рекомендацией является использование центробежной силы не более 800 об/мин. Сперма других видов животных (лошади, козлы, быки, свиньи, медведи) менее чувствительна к центрифугированию, что позволяет использовать центробежные силы до 2400 об/мин в течение 5 мин у жеребца [18], 5000 об/мин в течение 5 мин у быка [23], 3000 об/мин в течение 3 мин у козы [26], 2400 об/мин в течение 3 мин у кабана [7] и 9600 об/мин в течение 6 мин у бурого медведя [20].

Таким образом, стандартное центрифугирование спермы это метод, позволяющий провести выделение/селекцию подвижных сперматозоидов (формирование осадка), а также является обязательной процедурой с последующим удалением семенной плазмы, предшествующей охлаждению/заморозке спермы. Протокол центрифугирования и цель применения зависит от вида производителя.

Коллоидное центрифугирование: протоколы и среды.

Механизм коллоидного центрифугирования

Коллоидное центрифугирование (центрифугирование в градиенте плотности) – один из распространенных методов, используемый для обработки эякулята. Данный метод позволяет эффективно выделить функционально активные сперматозоиды из эякулята, что в последующем определяет успешность проведения ВРТ. Сущность метода заключается в разделении спермы в коллоидной суспензии частиц диоксида кремния, стабилизированных гидрофильным силаном [3]. Градиент образуется в результате создания верхней и нижней фаз, при этом образец спермы наслаивается в верхнюю часть пробирки. Далее

образцы подвергаются различным режимам центрифугирования, результатом чего является получение субпопуляции сперматозоидов с прогрессивной подвижностью и нормальной морфологией без усиления оксидативного стресса, а также с меньшей частотой анеуплоидии и диплоидии. Кроме того, лейкоциты, сперматозоиды с дефектами в строении, продукты деградации клеток остаются в верхних слоях [16]. Механизм работы данного метода заключается в следующем: морфологически нормальные и функционально активные сперматозоиды имеют плотность более 1,1 г/мл, сперматозоиды с наличием дефектов и других клеток - 1,06-1,09 г/мл [29].

Среды и протоколы коллоидного центрифугирования спермы производителей

На сегодняшний день проведено большое количество исследований на тему эффективности использования коллоидного центрифугирования спермы с различными средами. Основными задачами применения коллоидного центрифугирования являются селекция прогрессивно подвижных сперматозоидов, повышение качества спермы до и после криоконсервации, альтернатива использования антибиотиков, входящих в состав разбавителя, способ лечения бактериоспермии

Технология коллоидного центрифугирования сперматозоидов была впервые разработана в 1996 г. с использованием среды Percolltm («KABI Pharmacia», Швеция) только для исследовательских целей, без возможности клинического использования [28]. Данный факт является причиной исследований данной среды, проведенные в научно-исследовательских центрах, занимающихся вопросами репродуктологии человека с 1996 по 2000 годы. Percolltm это среда, в состав которой входит двуокись кремния, связанная с поливинилпирролидоном (ПВП) в воде. Перед использованием Percolltm необходимо добавлять специальный солевой раствор. Согласно данным Strehler E. (1998), поливинилпирролидон (ПВП) является причиной субмикроскопических изменений, его применение с целью замедления движения сперматозоидов в рамках программ ВРТ (в частности – ИКСИ) вызывает несвоевременную деконденсацию хроматина сперматозоидов [10], что негативно отражается на оплодотворении [17].

Что касается применения среды Percolltm в животноводстве, то доказана эффективность ее применения в аспекте селекции неповрежденных сперматозоидов: незначительно выше, чем при использовании среды BoviPure [4]. По данным Sepúlveda B. (2017), отбор прогрессивно подвижных сперматозоидов быков можно проводить как с помощью среды Percolltm, так и со средой Isolate®

Еще одной распространенной в применении средой является PureSperm®, которая представляет собой коллоидный раствор двуокиси кремния в сбалансированном, буферном растворе солей (HEPES). Рекомендацией производителей является использование двухслойного градиента, включающего 40 и 80% среды PureSperm®. при использовании следующего режима центрифугирования - 300 об/мин в течение 20 мин. Исследования, проведенные Dorado J. с соавтор. (2011)

позволили установить положительное влияние центрифугирования с использованием градиента плотности PureSperm на качество размороженного семени собак и получение суспензии сперматозоидов с улучшенной подвижностью и жизнеспособностью ($P < 0,001$).

Согласно данным Al-Kass Z. с соавтор.(2025), применение среды Equicoll® с низкой и высокой плотностью в соотношении 10 мл разбавленной спермы и 15 мл среды и режимом центрифугирования – 300 об/мин в течение 20 минут подходит для подготовки спермы жеребцов к криоконсервации. Однако метод с использованием среды Equicoll® с низкой плотностью более перспективен, поскольку позволяет извлечь большее количество сперматозоидов и снижает окислительный стресс. Вместе с тем стоит отметить, что при использовании среды с высокой плотностью после разморозки образцы имели более высокую степень целостности ДНК, хотя потери сперматозоидов были выше.

Исследования Morrell J.M. (2019) указывают на эффективность применения однослойного коллоидного центрифугирования (SLC, из расчета 0,25 мл спермы на 1 мл коллоида) спермы хряков в аспекте удлинения срока хранения и повышения выживаемости сперматозоидов при криоконсервации. В работе Gutiérrez-Cepeda L. с соавтор. (2023) отражено использование коллоидного центрифугирования для оптимизации протоколов криоконсервации спермы жеребцов. Исследователи проводили сравнительный анализ двух разных протоколов коллоидного центрифугирования: 1-й протокол (10мл разбавленной спермы и 10 мл среды Equipure Bottom Layer® плотностью 80 %) , 2-й протокол (5 мл необработанной спермы и 5 мл среды Equipure Bottom Layer®). Оба образца выдерживали при температуре 22 °C и центрифугировали при 300 об/мин в течение 20 минут, как описано в работе с соавтор. [15]. Было установлено, что коллоидное центрифугирование спермы низкого качества с последующей криоконсерва-

цией позволяет сохранить жизнеспособность сперматозоидов, при этом качество полученных образцов соответствует результату заморозки спермы высокого качества.

Morrell J.M. (2019) в своем исследовании отмечает, что использование SLC способствует удалению бактерий и в этой связи является возможной альтернативой добавления антибиотиков в разбавители спермы. Полученные результаты Lacalle E. с соавтор. (2023) также подтверждают данный факт. Использование однослойного коллоидного центрифугирования (SLC, 20 % и 30 % Porcicoll®) является альтернативой применения антибиотиков при хранении образцов спермы хряков при температуре 17 °C. По данным Cojkić A. (2024) однослойное коллоидное центрифугирование с использованием среды Bovicoll® (ранее известной как Androcoll-B [13]) скорректирован с помощью буфера B [36] для обеспечения плотности 1,104 г/мл (высокая плотность) или 1,0325 г/мл (низкая плотность) является эффективным способом лечения бактериоспермии быков-производителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ результатов научных исследований указывает на эффективность применения протоколов центрифугирования в качестве предварительной обработки эякулята. При этом стандартное центрифугирование используется для удаления семенной плазмы перед проведением криоконсервации, протокол зависит от видовых особенностей сперматозоидов. Коллоидное центрифугирование применяется для отбора прогрессивно подвижных сперматозоидов, повышения качества спермы до и после криоконсервации, а также является способом лечения бактериоспермии. Наиболее распространенными коллоидными средами являются Percolltm, Isolate®, Porcicoll®, Bovicoll®, Equipure Bottom Layer®, PureSperm®.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Бычкова О.В., Хлебкова Л.П. Сельскохозяйственная биотехнология : учебное пособие. СПб. : Троицкий мост; 2023: 244 с.
2. Al-Kass Z., Morrell J.M., Ntallaris T. Effect of Centrifugation of Stallion Semen Through a Low Density Colloid Prior to Freezing on Sperm Cryosurvival. *Animals*. 2025;15:1881.
3. Al-Kass Z., Brown A., Johannisson A., Ntallaris T., Morrell J.M. Variation among stallions in sperm quality after single layer centrifugation. *Reprod. Domest. Anim*. 2021;56:848–856.
4. Arias M.E., Andara K., Briones E., Felmer R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol*. 2017 Jun;17(2):126-132. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28363502. doi: 10.1016/j.repbio.2017.03.002
5. Brinsko S.P., Crockett E.C., Squires E.L.. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*. 2000;54(1):129-136,
6. Boulton V.N., Braude P.R. Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilisation by isopycnic centrifugation of self-generating density gradients. *Arch Androl*. 1984; 13: 176-176.
7. Carvajal G., Cuello C., Ruiz M., Vázquez J.M., Martínez E.A., Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl*. 2004;25:389–96. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02805.x>
8. Cojkić A., Hansson I., Johannisson A., Axner E., Morrell J.M. Single layer centrifugation as a method for bacterial reduction in bull semen for assisted reproduction. *Vet Res Commun*. 2024 Feb;48(1):39-48. doi: 10.1007/s11259-023-10178-y. Epub 2023 Jul 22. PMID: 37479850; PMCID: PMC10811171.
9. Dorado J., Alcaráz L., Duarte N., Portero J.M., Acha D., Demyda S., Muñoz-Serrano A., Hidalgo M. Centrifugation on PureSperm(®) density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*. 2011. Jul 15;76(2):381-5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.026. Epub 2011 Apr

15. PMID: 21497393.
10. Dozortsev D., Rybouchkin A., De Sutter P., Dhont M. Sperm Plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 2960-2964.
11. Webb G.W., Dean M.M. Effect of Centrifugation Technique on Post-storage Characteristics of Stallion Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science.* 2009;29(9):675-680.
12. Gloria A., Cunto M., Zambelli D., Bracco C., Ballotta G., Contri A. Cushioned and high-speed centrifugation improve sperm recovery rate but affect the quality of fresh and cryopreserved feline spermatozoa. *Theriogenology*, 2024;215:195-204.
13. Goodla L., Morrell J.M., Yusnizar Y. Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. *J Dairy Sci.* 2014;97(4):2204–2212. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7607>
14. Gutiérrez-Cepeda L., Crespo F., Blazquez J.C., Serres C. Optimization of the Equine-Sperm Freeze Test in Purebred Spanish Horses by Incorporating Colloidal Centrifugation. *Animals (Basel)*. 2023 Jan 22;13(3):382. doi: 10.3390/ani13030382. PMID: 36766271; PMCID: PMC9913238.
15. Gutiérrez-Cepeda L., Fernández S., Crespo F., Gósalvez J., Serres C. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated to the clinical equine sperm processing procedure. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, 124, 85–89
16. Henkel R.R., Schill W.B. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 1: 108. <https://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-1-108>
17. Hlinka D., Herman M., Vesela J., Hredzak R., Horvath S., Pacin J. A modified method of intracytoplasmic sperm injection without the use of polyvinylpyrrolidone. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 1922-1927.
18. Hoogewijs M., Rijsselaere T., De Vlieghe S., Vanhaesebrouck E., De Schauwer C., Govaere J. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology*. 2010;74:118–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.022>
19. Hopkins H.S. Centrifugation Cushion vs. Spermfilter™: Effects On % Recovery". Graduate Theses. 2023. Dissertations. 3924.
20. Katkov I.I., Mazur P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. *J. Androl.* 1998;19:232–41. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb01993.x>.
21. Knop K., Hofmann N., Rath D., Sieme H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim Reprod Sci.* 2005;89:294–7.
22. Lacalle E., Fernández-Alegre E., Soriano-Úbeda C., Martínez-Martínez S., Domínguez J.C., González-Montaña J.R., Morrell J.M., Martínez-Pastor F. Single layer centrifugation (SLC) for bacterial removal with Percicoll positively modifies chromatin structure in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2023 Apr 15;201:95-105. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.02.017. Epub 2023 Feb 20. PMID: 36857978.
23. Machado G.M., Carvalho J.O., Filho E.S., Caixeta E.S., Franco M.M., Rumpf R. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*. 2009;71:1289–97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.002>
24. Mack S.R., Zaneveld L.J.D. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. *Gamete Res.* 1987;18:375–83. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120180411>
25. Morrell J.M. Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function in *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 2019 Oct 1;137:122-126. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.046. Epub 2019 May 31. PMID: 31176492.
26. Naing W.S., Haron W.A., Goriman M.A.K., Yusof R., Bakar M.Z.A., Sarsaif K. Effect of seminal plasma removal, washing solutions, and centrifugation regimes on boer goat semen cryopreservation. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 2011;34:271–9.
27. Neila-Montero M., Riesco M.F., Alvarez M., Montes-Garrido R., Boixo J.C., de Paz P., Anel-Lopez L., Anel L. Centrifugal force assessment in ram sperm: identifying species-specific impact. *Acta Vet Scand.* 2021 Nov 4;63(1):42. doi: 10.1186/s13028-021-00609-8. PMID: 34736507; PMCID: PMC8567708.
28. Nicolas M., Alvarez M., Gomes-Alves S., Mata-Campuzano M., Borragán S., Martinez-Pastor F. Effects on brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation. *Eur J Wildl Res.* 2011;57:259–66. <https://doi.org/10.1007/s10344-010-0420-y>
29. Quinn M.M., Jalalian L., Ribeiro S., Ona K., Demirci U., Cedars M.I., Rosen M.P. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum. Reprod.* 2018; 33(8): 1388-93. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/dey239>
30. Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*. 2002;57:1669–81. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00663-5)
31. Sepúlveda B., Arias M.E., Aguila L., Zambrano F., Sánchez R., Felmer R. Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? *Andrologia*. 2018 Apr;50(3). doi: 10.1111/and.12921. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29164653.
32. Sepúlveda B., Arias M.E., Aguila L., Zambrano F., Sánchez R., Felmer R. Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? *Andrologia*. 2018 Apr;50(3). doi: 10.1111/and.12921. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29164653.
33. Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*. 2002;57:1669–81. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00663-5)

34. Varner D.D., Love C.C., Blanchard T.L. Breeding-management strategies and semen-handling techniques for stallions. *Proc Annu Conv Am Assoc Eq Pract* . 2010;56: 215–26.

REFERENCES

1. Bychkova O.V., Khlebova L.P. *Agricultural biotechnology: a textbook*. St. Petersburg: Troitsky Most; 2023: 244 p. (in Russ)
2. Al-Kass Z., Morrell J.M., Ntallaris T. Effect of Centrifugation of Stallion Semen Through a Low Density Colloid Prior to Freezing on Sperm Cryosurvival. *Animals*. 2025;15:1881.
3. Al-Kass Z., Brown A., Johannisson A., Ntallaris T., Morrell J.M. Variation among stallions in sperm quality after single layer centrifugation. *Reprod. Domest. Anim.* 2021;56:848–856.
4. Arias M.E., Andara K., Briones E., Felmer R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol.* 2017 Jun;17(2):126-132. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28363502. doi: 10.1016/j.repbio.2017.03.002
5. Brinsko S.P., Crockett E.C., Squires E.L.. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*. 2000;54(1):129-136,
6. Boulton V.N., Braude P.R. Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilisation by isopycnic centrifugation of self-generating density gradients. *Arch Androl.* 1984; 13: 176-176.
7. Carvajal G., Cuello C., Ruiz M., Vázquez J.M., Martínez E.A., Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.* 2004;25:389–96. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02805.x>
8. Cojkcic A., Hansson I., Johannisson A., Axner E., Morrell J.M. Single layer centrifugation as a method for bacterial reduction in bull semen for assisted reproduction. *Vet Res Commun.* 2024 Feb;48(1):39-48. doi: 10.1007/s11259-023-10178-y. Epub 2023 Jul 22. PMID: 37479850; PMCID: PMC10811171.
9. Dorado J., Alcaráz L., Duarte N., Portero J.M., Acha D., Demyda S., Muñoz-Serrano A., Hidalgo M. Centrifugation on PureSperm® density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*. 2011. Jul 15;76(2):381-5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.026. Epub 2011 Apr 15. PMID: 21497393.
10. Dozortsev D., Rybouchkin A., De Sutter P., Dhont M. Sperm Plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 2960-2964.
11. Webb G.W., Dean M.M. Effect of Centrifugation Technique on Post-storage Characteristics of Stallion Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2009;29(9):675-680,
12. Gloria A., Cunto M., Zambelli D., Bracco C., Ballotta G., Contri A. Cushioned and high-speed centrifugation improve sperm recovery rate but affect the quality of fresh and cryopreserved feline spermatozoa. *Theriogenology*, 2024;215:195-204.
13. Goodla L., Morrell J.M., Yusnizar Y. Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. *J Dairy Sci.* 2014;97(4):2204–2212. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7607>
14. Gutiérrez-Cepeda L., Crespo F., Blázquez J.C., Serres C. Optimization of the Equine-Sperm Freeze Test in Purebred Spanish Horses by Incorporating Colloidal Centrifugation. *Animals (Basel)*. 2023 Jan 22;13(3):382. doi: 10.3390/ani13030382. PMID: 36766271; PMCID: PMC9913238.
15. Gutiérrez-Cepeda L., Fernández S., Crespo F., Gósalvez J., Serres C. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated to the clinical equine sperm processing procedure. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, 124, 85–89
16. Henkel R.R., Schill W.B. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 1: 108. <https://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-1-108>
17. Hlinka D., Herman M., Vesela J., Hredzak R., Horvath S., Pacin J. A modified method of intracytoplasmic sperm injection without the use of polyvinylpyrrolidone. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 1922-1927.
18. Hoogewijs M., Rijsselaere T., De Vlieghe S., Vanhaesebrouck E., De Schauwer C., Govaere J. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology*. 2010;74:118–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.022>
19. Hopkins H.S. Centrifugation Cushion vs. Spermfilter™: Effects On % Recovery". Graduate Theses. 2023. Dissertations. 3924.
20. Katkov I.I., Mazur P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. *J. Androl.* 1998;19:232–41. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb01993.x>.
21. Knop K., Hofmann N., Rath D., Sieme H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim Reprod Sci.* 2005;89:294–7.
22. Lacalle E., Fernández-Alegre E., Soriano-Úbeda C., Martínez-Martínez S., Domínguez J.C., González-Montaña J.R., Morrell J.M., Martínez-Pastor F. Single layer centrifugation (SLC) for bacterial removal with Percoll positively modifies chromatin structure in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2023 Apr 15;201:95-105. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.02.017. Epub 2023 Feb 20. PMID: 36857978.
23. Machado G.M., Carvalho J.O., Filho E.S., Caixeta E.S., Franco M.M., Rumpf R. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*. 2009;71:1289–97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.002>
24. Mack S.R., Zaneveld L.J.D. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human

- spermatozoa. Gamete Res. 1987;18:375–83. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120180411>
25. Morrell J.M. Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function in *in vitro* fertilization. Theriogenology. 2019 Oct 1;137:122–126. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.046. Epub 2019 May 31. PMID: 31176492.
26. Naing W.S., Haron W.A., Goriman M.A.K., Yusof R., Bakar M.Z.A., Sarsaif K. Effect of seminal plasma removal, washing solutions, and centrifugation regimes on boer goat semen cryopreservation. Pertanika J Trop Agric Sci. 2011;34:271–9.
27. Neila-Montero M., Riesco M.F., Alvarez M., Montes-Garrido R., Boixo J.C., de Paz P., Anel-Lopez L., Anel L. Centrifugal force assessment in ram sperm: identifying species-specific impact. Acta Vet Scand. 2021 Nov 4;63(1):42. doi: 10.1186/s13028-021-00609-8. PMID: 34736507; PMCID: PMC8567708.
28. Nicolas M., Alvarez M., Gomes-Alves S., Mata-Campuzano M., Borragán S., Martinez-Pastor F. Effects on brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation. Eur J Wildl Res. 2011;57:259–66. <https://doi.org/10.1007/s10344-010-0420-y>
29. Quinn M.M., Jalalian L., Ribeiro S., Ona K., Demirci U., Cedars M.I., Rosen M.P. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. Hum. Reprod. 2018; 33(8): 1388–93. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/dey239>
30. Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A. Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. Theriogenology. 2002;57:1669–81. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00663-5)
31. Sepúlveda B., Arias M.E., Aguila L., Zambrano F., Sánchez R., Felmer R. Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? Andrologia. 2018 Apr;50(3). doi: 10.1111/and.12921. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29164653.
32. Sepúlveda B., Arias M.E., Aguila L., Zambrano F., Sánchez R., Felmer R. Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? Andrologia. 2018 Apr;50(3). doi: 10.1111/and.12921. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29164653.
33. Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A. Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. Theriogenology. 2002;57:1669–81. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00663-5)
34. Varner D.D., Love C.C., Blanchard T.L. Breeding-management strategies and semen-handling techniques for stallions. Proc Annu Conv Am Assoc Eq Pract. 2010;56: 215–26.

Поступила в редакцию / Received: 11.08.2025

Поступила после рецензирования / Revised: 12.09.2025

Принята к публикации / Accepted: 30.09.2025