УДК 636.082.453.53
DOI: 10.52419/issn2782-6252.2025.3.55

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ В РАЗНЫХ РАЗБАВИТЕЛЯХ

Елена Владимировна Никиткина[1]

[1]*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», Российская Федерация*

[1]*канд. биол.наук., лаборатория биологии развития, e-mail: nikitkinae@mail.ru, orcid.org/0000-0002-8496-5277*

РЕФЕРАТ

Криоконсервация наносит вред выживаемости и фертильности сперматозоидов из-за физического и химического стресса, оказываемого на клетки во время замораживания. Сперма жеребцов обладает низкой криоустойчивостью. Совершенствование протокола криоконсервации, включая состав разбавителя является актуальным. В данном исследовании проведен анализ использования двух разбавителей для центрифугирования и криоконсервации спермы жеребцов. Было проанализировано 27 эякулятов от 9 жеребцов. Анализ показал достоверное различия (P<0,05) по оценке подвижности и числу клеток без повреждений после центрифугирования в разных разбавителях. Лучше оказался опытный разбавитель. Достоверных различий по количеству сперматозоидов с повреждениями хвоста, акросомы, ДНК и по уровню стимуляции дыхания 2,4 ДНФ не наблюдалось. Использование опытного разбавителя лучше сохраняло подвижность (P<0,05), морфологию сперматозоидов (P<0,01), акросомы (P<0,05) и сопряженность дыхания и фосфорилирования (2,4 ДНФ тест) (P<0,01) при выбранном протоколе криоконсервации спермы по сравнению с разбавителем ЛЦХЖ.

Ключевые слова: сперма, жеребцы, разбавители, центрифугирование, криоконсервация, прогрессивная подвижность, акросомы.

Для цитирования: Никиткина Е.В. Криоконсервация спермы жеребцов в разных разбавителях. Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. 2025;3:55-58. https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.3.55

CRYOPRESERVATION OF STALLION SPERM IN DIFFERENT EXTENDERS

Elena Vl. Nikitkina[1]

[1]*All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center for Animal Husbandry – All-Russian Research Institute of Livestock Husbandry named after Academician L.K. Ernst," Russian Federation*

[1]*Candidate of Biological Science, Developmental Biology Laboratory, e-mail: nikitkinae@mail.ru, orcid.org/0000-0002-8496-5277*

ABSTRACT

Cryopreservation compromises sperm viability and fertility due to the physical and chemical stress placed on cells during freezing. Stallion sperm have low cryopreservation stability. Improving cryopreservation protocols, including extender composition, is essential. This study analyzed the use of two extenders for centrifugation and cryopreservation of stallion sperm. Twenty-seven ejaculates from nine stallions were analyzed. The analysis revealed significant differences (P < 0.05) in motility assessment and the number of intact cells after centrifugation in the different extenders. The experimental extender proved superior. No significant differences were observed in the number of spermatozoa with tail, acrosome, or DNA damage, or in the 2.4 DNF respiration stimulation level. The use of the experimental extender better preserved sperm motility (P<0.05), morphology (P<0.01), acrosomes (P<0.05) and the coupling of respiration and phosphorylation (2.4 DNP test) (P<0.01) in the selected sperm cryopreservation protocol compared to the LCHZ extender.

Key words: semen, stallions, extenders, centrifugation, cryopreservation, progressive motility, acrosomes.

For citation: Nikitkina E.V. Cryopreservation of stallion sperm in different extenders. Legal regulation in veterinary medicine. 2025; 3:55-58. (in Russ) https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.3.55

ВВЕДЕНИЕ

Искусственное осеменение является одним из основных методов интенсивного использования лучших производителей. Использование криоконсервированной спермы расширяет возможности селекции в коневодстве, позволяя использовать в разведении нужных жеребцов, не смотря на расстояния до кобыл и даже после смерти [1]. Однако селекционеры предпочитают использовать свежую или охлажденную сперму. Оплодотворяющая способность спермы лошадей после криоконсервации сильно понижается. Замораживание спермы осложняется различной устойчивостью к замораживанию у разных производителей и даже разных эякулятов от одного и того же самца [2]. (Tvrdá E. et. al., 2023). Криоконсервация наносит вред выживаемости и фертильности сперматозоидов из-за физического и химического стресса, оказываемого на клетки во время замораживания. Этот стресс связан с несколькими факторами: прогрессивное увеличение осмолярности разбавителя из-за превращения свободной воды в кристаллы льда [2,6], механическое по-

вреждение целостности клеточных мембран, других клеточных структур и генетического материала, вызванное образованием кристаллов льда, высокая осмолярность разбавителя замораживания из-за добавления криопротекторов и другие факторы [2,5]. Улучшение и оптимизация протоколов криоконсервации спермы являются приоритетом для всех видов домашнего скота [9].

Удаление семенной плазмы из эякулята это обязательный этап криоконсервации спермы лошадей, принятый в других странах. В нашей стране сперма жеребцов замораживается в 20 мл тубах, без удаления семенной плазмы. Семенная плазма обычно удаляется центрифугированием, но это может привести к механическому повреждению спермы. Поиск и оптимизация существующих разбавителей для центрифугирования сглаживающего или предотвращающего эти повреждения является очень актуальным. Актуален и поиск оптимального разбавителя, комбинации разбавителей и протокола замораживания спермы жеребцов.

Целью работы было провести оценку качества спермы жеребцов при центрифугировании и криоконсервации при использовании разбавителей с различным составом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сперму от 9 жеребцов в возрасте от 9 до 21 года получали с использованием искусственной вагины Hannover (Minitube, Германия) на кобыл в охоте или фантом. От каждого жеребца сперма была получена не менее двух раз, всего было получено 31 эякулят, проанализировано 27 эякулятов. 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 центрифугировании, охлаждении и замораживании каждый эякулят был разделен на 2 части и каждая часть разведена разбавителем в пропорции 1:2. Использовано 2 разбавителя для центрифугирования: Лактозо-хелато-цитрат-желточный (ЛХЦЖ) и опытный (на основе лактозы и глюкозы и раствора солей магния, натрия и калия). Для криоконсервации спермы в оба раствора добавляли 20% свежеприготовленного яичного желтка, 3% глицерина и 0,4 мг/мл гентамицина.

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. Дыхательную активность оценивали полярографическим методом, с помощью тестирующего вещества – 2,4 динитрофенол (2,4 ДНФ). Оценку скорости дыхания проводили с помощью иономера «Эксперт -001МТХ» и электрода Кларка (НПФ «Эконикс-Эксперт», г. Москва, Россия). Далее в камеру с 1 мл 11% лактозы добавляли 100 мкл спермы и измеряли скорость снижения концентрации кислорода. Затем добавляли 10 мкл 2,4-ДНФ. Находили отношение скорости дыхания с 2,4-ДНФ к скорости дыхания до добавления 2,4-ДНФ. Окислительное фосфорилирование можно считать хорошим, если скорость клеточного дыхания увеличивается в два и более раз после добавления 2,4-ДНФ. Для анализа фрагментации ДНК в сперме мы использовали тест дисперсии хроматина спермы (SCD). Для теста SCD использовался набор Gold-Cyto DNA (Гуанчжоу, Китай). Всего было измерено 100 сперматозоидов на образец с помощью CASA (ArgusSoft–модуль фрагментации ДНК).

Разбавленную сперму центрифугировали при 600 g 8 минут, удаляли супернатант и разбавляли опытным или ЛЦХЖ до концентрации 200 млн/мл. Заполняли 0,5 мл соломинки и закупоривали шариками. Проводили эквилибрацию спермы при 40С не менее 2-х часов и замораживали 10 мин при -1100С. Далее опускали в жидкий азот.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследуемые показатели качества спермы (общая и прогрессивная подвижность, морфология, включая акросому, фрагментация ДНК и сопряженность дыхания и фосфорилирования) значительно не изменились после центрифугирования, что свидетельствует о допустимом режиме – 600g 8 минут. Наши исследования показали достоверные различия ($P<0,05$) по оценке подвижности и числу клеток без повреждений после центрифугирования в разных разбавителях (рис. 1-3). Более высокие показатели наблюдались при использовании опытного разбавителя.

Достоверных различий по количеству сперматозоидов с повреждениями хвоста, акросомы, ДНК и по уровню стимуляции дыхания 2,4 ДНФ не наблюдалось. Однако, почти все эти показатели были хуже в сперме, центрифугированной в разбавителе ЛЦХЖ.

Разработанный нами разбавитель для центрифугирования спермы жеребцов показал возможность использования его при охлаждении и криоконсервации. Было получено достоверное влияние опытного разбавителя на общую и прогрессивную подвижность ($P<0,05$), морфологию сперматозоидов ($P<0,05$) и стимуляцию дыхания 2,4 ДНФ ($P<0,01$) после криоконсервации спермы по сравнению с ЛЦХЖ разбавителем (табл.1).

Сахар, такой как фруктоза и глюкоза, считается источником энергии в сперматозоидах. В состав разбавителя ЛЦХЖ входит только лактоза, в опытный разбавитель и лактоза и глюкоза. Для обеспечения подвижности клеток необходимо достаточное количество аденозинтрифосфата (АТФ), который поставляет энергию для функций сперматозоидов [3,4]. АТФ производится за счет двух метаболических путей – окислительного фосфорилирование и гликолиза. В сперме ло-

Таблица 1. Показатели жизнеспособности в образцах спермы жеребцов после оттаивания.

Показатель качества	Разбавитель	
	Опытный	ЛЦХЖ
Общая подвижность, %	44,5 ± 1,74[a]	34,6 ± 0,78[b]
Прогрессивная подвижность, %	38,3 ± 2,17[a]	30,4 ± 1,23[b]
Сперматозоиды нормальной морфологии, %	68,4 ± 2,10[c]	59,4 ± 1,52[d]
Сперматозоиды с повреждениями хвоста,%	20,5 ± 0,67[a]	26,5 ± 0,79[b]
Сперматозоиды с поврежденной акросомой,%	11,1 ± 0,67[a]	13,2 ± 1,12[b]
Стимуляция дыхания 2,4 ДНФ, раз	2,16 ± 0,07[c]	1,82 ± 0,04[d]
Сперматозоиды с поврежденной ДНК, %	27,6 ± 6,19	28,3 ± 4,45

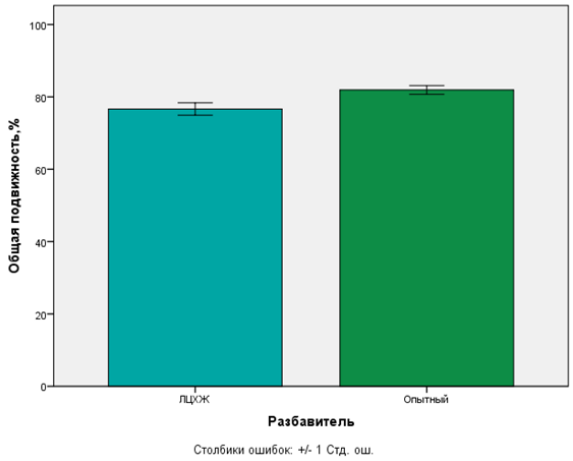

Рисунок 1. Общая подвижность сперматозоидов при центрифугировании в разных разбавителях.

Figure 1. Overall sperm motility during centrifugation in different extenders.

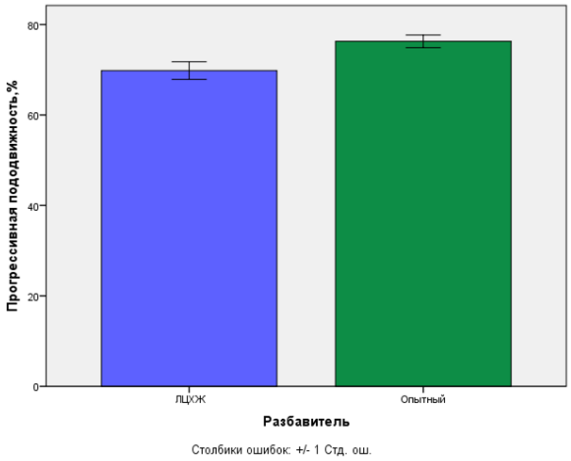

Рисунок 2. Прогрессивная подвижность сперматозоидов при центрифугировании в разных разбавителях.

Figure 2. Progressive motility of spermatozoa during centrifugation in different extenders.

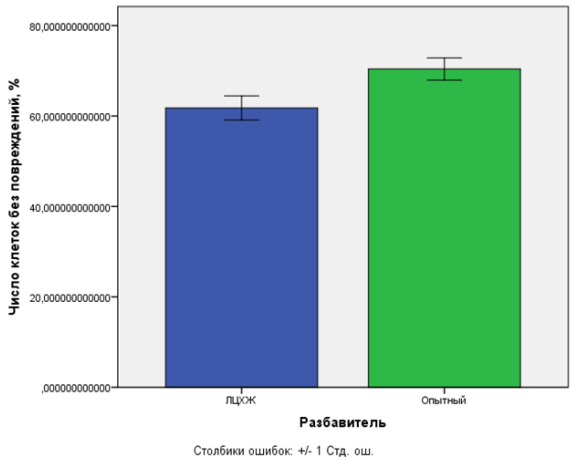

Рисунок 3. Число клеток без повреждений при центрифугировании в разных разбавителях.

Figure 3. Number of cells without damage during centrifugation in different diluents.

шадей преобладает окислительное фосфорилирование, для которого необходима глюкоза или фруктоза. Введение в состав опытного разбавителя глюкозы, позволило лучше сохранить подвижность сперматозоидов и сопряженность дыхания и фосфорилирования (тест 2,4-ДНФ). Однако фруктоза более предпочтительный сахар для поддержания функциональной целостности мембраны, адекватной подвижности сперматозоидов и тонизирующего эффекта после размораживания [8], поэтому планируется улучшить состав разбавителя, путем замены сахаров (глюкозы и лактозы) на фруктозу. В большинстве коммерческих разбавителей в состав входит фруктоза. Тест 2,4 ДНФ на сопряженность дыхания и фосфорилирования показал ее хорошую сохранность после криоконсервации при использовании опытного разбавителя. Стимуляции дыхания 2,4 ДНФ в среднем в 2,16±0,07 раз является высокой и свидетельствует о хорошем производстве АТФ сперматозоидами. Наши ранние исследования показали высокую корреляцию этого показателя с оплодотворяющей способностью спермы хряков и петухов [7]. В дальнейшем проведение искусственного осеменения позволит оценить оплодотворяющую способность спермы жеребцов, криоконсервированной по данному протоколу с использованием разных разбавителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наблюдалось влияние разбавителя на качество спермы жеребцов при центрифугировании и криоконсервации. Использование опытного разбавителя лучше сохраняло подвижность, морфологию сперматозоидов и сопряжен-

ность дыхания и фосфорилирования (2,4 ДНФ тест) при выбранном протоколе криоконсервации спермы по сравнению с разбавителем ЛЦХЖ. Для выяснения сохранения оплодотворяющей способности необходимо провести искусственное осеменение кобыл спермой, замороженной с использованием разных разбавителей. Совершенствование состава разбавителя (например, замена сахаров на фруктозу или введение антиоксидантов) также является задачей дальнейшего исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки, проект № 124020200127-7.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Атрощенко М.М., Калашников В.В., Брагина Е.Е., Зайцев А.М. Сравнительное изучение ультраструктуры сперматозоидов в эпидидимальной, эякулированной и криоконсервированной сперме жеребцов. Сельскохозяйственная биология. 2017;52(2): 274-281. https://doi.org/10.15389/agrobiology. 2017.2.274rus
2. Boni R., Ruggiero R., Di PalmaT., Ferrara M.A., Preziosi G., Cecchini Gualandi S. Stallion Sperm Freezing with Different Extenders: Role of Antioxidant Activity and Nitric Oxide Production. Animals. 2024;14:2465. https://doi.org/10.3390/ani14172465
3. Bustani G.S., Baiee F.H. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. Veterinary World. 2021;14(5):1220-1233. www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233
4. du Plessis S.S., Agarwal A., Mohanty G., Van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do spermatozoa use? Asian J. Androl. 2015;17(2):230-235. doi: 10.4103/1008-682X.135123
5. Fahy G.M., Lilley T.H., Linsdell H., Douglas M.S., Meryman H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. Cryobiology. 1990;27:247–268
6. Mazur P. Principles of Cryobiology. In Life in the Frozen State; Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; 2004.
7. Nikitkina E., Shapiev I., Musidray A., Krutikova A., Plemyashov K., Bogdanova S., Leibova V., Shiryaev G., Turlova J. Assessment of Semen Respiratory Activity of Domesticated Species before and after Cryopreservation: Boars, Bulls, Stallions, Reindeers and Roosters. Vet. Sci. 2022;9:513. https://doi.org/10.3390/vetsci9100513
8. Tvrdá E., Árvay J., Ďuračka M., Kačániová M. Mitochondria-Stimulating and Antioxidant Effects of Slovak Propolis Varieties on Bovine Spermatozoa. Oxygen. 2023;3: 179-189. https://doi.org/10.3390/oxygen3020013
9. Zuidema D., Kerns K., Sutovsky P. An Exploration of Current and Perspective Semen Analysis and Sperm Selection for Livestock Artificial Insemination. Animals. 2021;11: 3563. https://doi.org/10.3390/ani11123563

REFERENSES

1. Atroshchenko M.M., Kalashnikov V.V., Bragina E.E., Zaitsev A.M. Comparative study of sperm ultrastructure in epididymal, ejaculated, and cryopreserved sperm of stallions. Agricultural biology. 2017; 52(2): 274–281. (in Russ) https://doi.org/10.15389/agrobiology. 2017.2.274rus
2. Boni R., Ruggiero R., Di PalmaT., Ferrara M.A., Preziosi G., Cecchini Gualandi S. Stallion Sperm Freezing with Different Extenders: Role of Antioxidant Activity and Nitric Oxide Production. Animals. 2024;14:2465. https://doi.org/10.3390/ani14172465
3. Bustani G.S., Baiee F.H. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. Veterinary World. 2021;14(5):1220-1233. www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233
4. du Plessis S.S., Agarwal A., Mohanty G., Van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do spermatozoa use? Asian J. Androl. 2015;17(2):230-235. doi: 10.4103/1008-682X.135123
5. Fahy G.M., Lilley T.H., Linsdell H., Douglas M.S., Meryman H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. Cryobiology. 1990;27:247–268
6. Mazur P. Principles of Cryobiology. In Life in the Frozen State; Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; 2004.
7. Nikitkina E., Shapiev I., Musidray A., Krutikova A., Plemyashov K., Bogdanova S., Leibova V., Shiryaev G., Turlova J. Assessment of Semen Respiratory Activity of Domesticated Species before and after Cryopreservation: Boars, Bulls, Stallions, Reindeers and Roosters. Vet. Sci. 2022;9:513. https://doi.org/10.3390/vetsci9100513
8. Tvrdá E., Árvay J., Ďuračka M., Kačániová M. Mitochondria-Stimulating and Antioxidant Effects of Slovak Propolis Varieties on Bovine Spermatozoa. Oxygen. 2023;3: 179-189. https://doi.org/10.3390/oxygen3020013
9. Zuidema D., Kerns K., Sutovsky P. An Exploration of Current and Perspective Semen Analysis and Sperm Selection for Livestock Artificial Insemination. Animals. 2021;11: 3563. https://doi.org/10.3390/ani11123563

Поступила в редакцию / Received: 23.09.2025
Поступила после рецензирования / Revised: 29.09.2025
Принята к публикации / Accepted: 30.09.2025