

ОБЗОРЫ/REVIEWS

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.2.223-238>
УДК 636.082.453.53



Применение разбавителей спермы быков: современное состояние (обзор)

© 2025. Д. А. Старикова✉, О. Ю. Баркова, И. В. Чистякова,
Н. В. Плешанов, А. В. Габова

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

В последние годы вспомогательные репродуктивные технологии в животноводстве включают искусственное оплодотворение, нуждающееся в высококачественной криоконсервированной сперме быков. Качественная заморозка зависит от оптимально подобранных параметров разбавителя спермы. Цель данного обзора – распространение знаний об использовании различных типов разбавителей и добавок к ним при криоконсервации спермы быков для улучшения её качества. В данной статье приведен обзор 64 научных работ отечественных и зарубежных исследователей по моделированию разбавителей для обеспечения максимального выхода качественной спермы после разморозки. Разработки создания оптимального разбавителя спермы для защиты сперматозоидов и сохранения качественной спермы от криповреждения в течение длительного времени, которая может сохранять свои свойства в условиях жидкого азота продолжительное время, ведутся с середины XX века. В связи с этим для разбавления спермы быков перед криоконсервацией применяются как классические среды с известным составом (ЛЖГ, Tris, MOPS и др.), так и коммерческие среды (Andromed, BullXcell, OptiXcell и др.). Использование разнообразных вариантов разбавителей спермы быков исследователями разных стран предоставляет важную информацию о влиянии составов разбавителей на показатели качества мужских гамет, таких как подвижность, жизнеспособность, процент аномальных сперматозоидов и другие, после длительной криоконсервации. Кроме того, в последнее время широко применяется внесение в состав разбавителей для оптимизации их свойств добавок, имеющих природное или синтетическое происхождение и, соответственно, различное воздействие на сперму и сперматозоиды. Данный обзор может быть полезен для организаций и лабораторий, занимающихся разработкой технологий создания разбавителей спермы быков.

Ключевые слова: сперматозоид, криоконсервация спермы, витрификация, крупный рогатый скот, *Bos taurus*

Благодарности: работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-76-10041 (<https://rscf.ru/project/22-76-10041/>).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Старикова Д. А., Баркова О. Ю., Чистякова И. В., Плешанов Н. В., Габова А. В. Применение разбавителей спермы быков: современное состояние (обзор). *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2025;26(2):223–238. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.2.223-238>

Поступила: 14.11.2024

Принята к публикации: 07.03.2025

Опубликована онлайн: 29.04.2025

Use of bull sperm extenders: current status (review)

© 2025. Daria A. Starikova✉, Olga Yu. Barkova, Irena V. Chistyakova,
Nikolay V. Pleshanov, Alina V. Gabova

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding –
Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry,
Saint Petersburg, Pushkin, Russian Federation

In recent years, assisted reproductive technologies in animal production have included artificial insemination in need of high-quality cryopreserved bull sperm. High-quality freezing depends on the optimally selected parameters of the semen diluent. In this connection, the purpose of this review is to spread the knowledge about the use of various types of diluents and additives to them in the cryopreservation of bull semen to improve its quality. This article provides an overview of 64 scientific papers of domestic and foreign researchers on modeling diluents in order to ensure the maximum yield of high-quality sperm after thawing. Research into the creation of an optimal sperm diluent to ensure sperm protection and save high-quality sperm

from cryoinjury during a long time, which can long preserve its properties in liquid nitrogen has been carried out since the mid-20th century. Classic media with a known composition (LPG, Tris, MOPS, etc.) and commercial media (Andromed, BullXcell, OptiXcell, etc.) are used to dilute bull sperm before cryopreservation. The use of different variants of bull sperm extenders by researchers from different countries provides important information on the effect of extender compositions on sperm quality parameters, such as motility, viability, percentage of abnormal sperm, etc., after long-term cryopreservation. Also, recently, the inclusion of additives of natural or synthetic origin in extenders, which exhibit different effects on sperm and spermatozoa, has been widely used. This review may be useful for organizations and laboratories engaged in the development of technologies for creating bull sperm extenders.

Keywords: spermium, sperm cryopreservation, diluents vitrification, bovine, *Bos taurus*

Acknowledgements: the research was funded by the Russian Science Foundation No. 22-76-10041 (<https://rscf.ru/project/22-76-10041/>).

The authors thank the reviewers for their contribution to the expert assessment of this work.

Conflict of interest: the authors stated that there was no conflict of interest.

For citation: Starikova D. A., Barkova O. Yu., Chistyakova I. V., Pleshanov N. V., Gabova A. V. Use of bull sperm extenders: current status (review). *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2025;26(2):223–238. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.2.223-238>

Received: 14.11.2024

Accepted for publication: 07.03.2025

Published online: 29.04.2025

В настоящее время вспомогательные репродуктивные технологии в животноводстве не обходятся без процедуры искусственного оплодотворения, требующего использования высококачественной криоконсервированной спермы быков, в том числе и от элитных особей [1]. Обеспечение в качественной сперме для осеменения маточного поголовья ответственность несут станции осеменения и селекции, которые являются производителями сперматозоидов. В связи с этим станции постоянно расширяют знания в области новейших технологий и инструментов, с помощью которых можно будет производить конкурентноспособный продукт. Это «стремление к идеалу» положило начало эпохе использования различных добавок в разбавителях спермы быков, которые ученые всего мира постоянно проверяют на возможность использования в рутинном производстве спермы на станциях осеменения и племенного разведения [2]. Свойства компонентного состава разбавителя направлены на продление продолжительности жизни сперматозоидов в разбавленном состоянии в негативных условиях окружающей среды и криоконсервации, в том числе во время процедуры замораживания-оттаивания, приводящей к криоповреждениям, осмотическим изменениям, колебанию pH, истощению энергии в процессе метаболизма и холодового шока, нарушению соотношения холестерина и фосфолипидов в биомембранах спермы из-за оттока холестерина и образования многочисленных активных форм кислорода [2]. Все эти нарушения напрямую ставят под угрозу качество и фертильность сперматозоидов, поэтому необходимо использовать комбинацию высококачественного разбавителя спермы и добавок, чтобы можно было сохра-

нить высокие показатели качества сперматозоидов во время консервации и после оттаивания спермы.

Цель обзора. В настоящем обзоре предпринята попытка обобщить доступную информацию об исследованиях российских и зарубежных ученых в области разработки разбавителей спермы, которая подвергается криоконсервации. Проведенный анализ научных работ позволил нам не только проследить историю разработки разбавителей спермы быков, но и продемонстрировать значимость исследований в данной области с рассмотрением их преимуществ и недостатков.

Материал и методы. Поиск научных источников российских и зарубежных авторов был выполнен по следующим ключевым словам и словосочетаниям: сперматозоиды, сперма, быки, разбавитель, криоконсервация, добавки к разбавителям спермы, коммерческие разбавители. Необходимую литературу в рамках данной темы проводили 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 150 научных работ, из которых для анализа и составления научной работы включили 66 источников. Ограничения по дате не вводились в связи с тем, что кроме современных исследований были обсуждены и самые первые работы по разработке разбавителей спермы быков.

Основная часть. История применения разбавителя спермы для последующего хранения. Интерес к вопросам сохранения семени животных существовал с давних времен. Как известно, первое упоминание о сохранении спермы при низких температурах относится к 1803 году итальянским ученым Ладзаро Спалланцани. Охлаждение спермы на снегу в течение 5–10 мин с последующим отогревом при 81° по Фаренгейту (27,2 °C) привело к тому, что все сперматозоиды ожили. Данный эксперимент был проведен на жеребцах, и успешно повторен на сперме быка и человека [3]. Фундаментальные основы замораживания биологических объектов были заложены в начале XX века в трудах П. И. Бахметьева, которого сегодня считают отцом криобиологии. Сохранение семени при низких температурах стало прорывной идеей В. К. Милованова, наряду с разработкой методов искусственного оплодотворения. В 1947 году была установлена способность спермиев выдерживать глубокое замораживание с сохранением биологической полноценности и оплодотворяющей способности [4]. Именно бычья сперма стала первой, которую смогли успешно заморозить. В 1940 году зарубежные исследователи П. Х. Филлипс и Х. А. Ларди (P. H. Phillips and H. A. Lardy) открыли свойства желтка яиц домашней птицы, защищающие сперму от холодового шока во время охлаждения и возможность его применения в качестве криопротекторного агента [5]. Несмотря на значимость данного свойства желтка, использование этой техники широкого распространения не получило. Модернизация желтка яиц цитратом натрия улучшила результаты сохранения спермы при низкой температуре. Так, середина XX века – начало развития учеными разработок различных разбавителей спермы. Растворы, которые начали применять в качестве разбавителей с 1960-х годов и по настоящее время, например трис, TES, MES, HEPES, PIPES, MOPS и BES, обеспечивают хорошую буферную способность. Разбавители на основе триса широко используются сейчас для хранения замороженной спермы. Например, яичный желток в сочетании с трисом и цитратом натрия является распространенным ингредиентом разбавителей для замораживания спермы быков. Прорыв в истории консервации спермы произошел с открытием глицерина как криопротектора для хранения замороженной спермы. Впервые глицерин для заморажи-

вания спермы быков, баранов, жеребцов и кроликов при температуре -21 °C применили советские ученые А. Д. Берштейн и В. В. Петропавловский в 1937 году [1]. Позже об успешном использовании глицерина в качестве криопротектора при замораживании семени быков [6] были опубликованы результаты С. Полдж и др. (K. Polge et al., 1949), в том числе с получением жизнеспособного потомства [1, 7].

В настоящее время основные принципы замораживания заключаются в разбавлении спермы, использовании криопротектора и соответствующей скорости замораживания и оттаивания. Разбавление спермы является главным технологическим процессом криоконсервации, поскольку создает оптимальные условия для защиты сперматозоидов от повреждений в процессе криоконсервации, а также их высокой выживаемости после хранения. В целом, можно говорить об определении разбавителя, как химической среды, используемой для консервации, размножения и защиты сперматозоидов от различных потрясений при обработке, хранении и транспортировке, применяемой для искусственного оплодотворения. Разбавитель должен включать в себя следующие свойства: изотоничность (280–310 мОсм/кг); буферную способность для регулировки pH; защиту от холодового шока; источник энергии для оптимального метаболизма сперматозоидов; контроль микробного заражения; защиту при замораживании и оттаивании; способность сохранять фертильность сперматозоидов. Форма сохранения спермы в рамках лабораторий зависит от условий исследования, для большинства племпредприятий, занимающихся продажей спермадоз быков-производителей, приемлем вариант замороженной спермы, что в первую очередь объясняется транспортировкой на дальние расстояния.

На сегодняшний день нередко на племпредприятиях используют коммерческие разбавители, такие как Biladil (Minitube, Германия), BioXcell (IMV Technologies, Л'Эгль, Франция), BullXcell (IMV Technologies, Л'Эгль, Франция) и другие. Однако, несмотря на большое разнообразие разбавителей спермы быков как классических, так и коммерческих, до сих пор нет унифицированного варианта. Все вышесказанное является доказательством актуальности разработки и оптимизации разбавителей спермы и в наши дни, хотя уже сделаны прорывные шаги в данной области.

Причины разработки разбавителей спермы. Причинами гибели спермиев при замораживании неразбавленной спермы являются создание гипертонической среды за счет изменения концентрации солей в плазме спермы, а также механическое повреждение протоплазмы спермиев из-за перехода мелких кристаллов в крупные. В связи с этим исследователи пришли к единому мнению о необходимости замораживания предварительно разбавленной спермы, которая может успешно сохраняться в жидком азоте не менее 20 лет, не утрачивая показатели качества и оплодотворяющую способность [8], тем самым устраняя фактор, влияющий на показатели спермопродукции «возраст быка-производителя» [9]. Кроме того, замораживание спермы позволяет применить метод оценки быков по качеству потомства, т. е. повышается уровень селекционно-племенной работы. Криоконсервация разбавленной спермы также имеет свои негативные последствия для сперматозоидов. Дж. Г. Бауст и др. (J. G. Baust et al., 2009) описали варианты стрессовых факторов, которым могут подвергнуться сперматозоиды в процессе охлаждения и замораживания: метаболическое разъединение; ионное дискордантное состояние; активация про- и антипротеазных ферментов и возникающий в результате клеточный ацидоз; потеря энергии; фазовый переход мембраны; дестабилизация цитоскелета; выработка свободных радикалов или активных форм кислорода [10]. В итоге воздействия данных стрессовых факторов у части клеток развиваются структурные изменения, такие как подвижность, проницаемость мембран; повреждение или развитие аномальных акросом т. д. Параллельно развиваются и молекулярные изменения – фрагментация ДНК, деградация мРНК, изменения метилирования ДНК, в комплексе ДНК/протамин и в микроРНК, эпигенетического содержания, уровней распространенности белка и распространенности транскриптов мРНК спермы. Повреждения на молекулярном уровне, которые возникают при криоконсервации, возможно больше, чем повреждения на структурном уровне [11, 12]. Часть клеток и вовсе после криоконсервации погибает. Всё это приводит к снижению количества качественных сперматозоидов.

Несколько десятилетий ученые пытаются уменьшить пагубное воздействие криоконсервации на сперматозоиды. Современный подход

основан на так называемых защитных стратегиях, при которых в замораживаемую среду вводятся различные добавки, обеспечивающие защиту сперматозоидов от криоповреждения. Все предыдущие исследования криодобавок имели один общий подход: образцы обычно обрабатывали в соответствии с критериями включения/исключения, которые основаны на начальной подвижности сперматозоидов, без учета других индивидуальных свойств спермы. Таким образом, даже при соблюдении заранее установленных критериев включения образцов в исследование, некоторые из них могут иметь лучшие показатели, чем другие, что часто приводит к противоречивым или непоследовательным результатам.

Основные компоненты сред для разбавления спермы: яичный желток, глицерин. Поскольку исторически яичный желток, молоко, глицерин и другие компоненты использовали в качестве самостоятельных разбавителей, в настоящее время они успешно применяются в качестве основных компонентов составных классических сред для разбавления спермы быков. Стоит отметить, что наиболее яркими вариантами в качестве компонентов являются непроникающий через мембрану сперматозоида яичный желток и проникающий глицерин. В связи с этим криопротекторные свойства у данных компонентов будут проявляться по-разному.

Яичный желток содержит фосфатидилхолин (лецитин), фосфолипиды, липидные экстракты, фракции липопротеинов и специфические липопротеины, обеспечивающие защиту от холодового шока. Применение яичных желтков в качестве разбавителя семени делает его не только устойчивым к холодовому стрессу, но и улучшает способность фертильности сперматозоидов, а благодаря содержанию липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) желток защищает репродуктивные клетки [13, 14]. Количество яичного желтка в обычно используемых замороженных разбавителях бычьей спермы составляет 15–30 % по объему [15].

Исследования защитного эффекта яичного желтка сузились до изучения входящих в его состав определенных компонентов, определяющих криозащитное действие яичного желтка. Такими составляющими стали фосфолипиды, липидные экстракты, фракции липопротеинов, специфических липопротеинов и лецитин. Авторами многих работ было выдвинуто единое мнение об обеспечении защиты

сперматозоидов лецитином во время окислительного стресса и процесса замораживания [16, 17, 18, 19, 20, 21]. В то же время липопротейны низкой плотности (ЛПНП) яичного желтка выполняют защитные функции, покрывая мембрану сперматозоида во время замораживания и оттаивания, тем самым предотвращая её повреждение [22]. Однако наличие в гранулах желтка веществ, в том числе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и минералов, подавляет дыхание сперматозоидов и снижает их подвижность [14].

Свойство глицерина проникать через мембрану клетки было использовано для разработки проникающих разбавителей с целью замораживания бычьей спермы. Подобными средами для разбавления спермы на основе триса и цитрата являются модификации разбавителя в виде трис-желток-глицерин, трис-фруктоза-желток-глицерин и цитрат-желток-фруктоза-глицерин. Однако было показано, что при внесении глицерина в разбавитель происходит денатурация белка, изменение взаимодействия актина и утоньшение плазматической мембраны, что в целом оказывает токсичное влияние на сперму [23]. В связи с этим данные варианты разбавителей в последние годы не находят широкого применения.

Таким образом, в настоящее время многие классические компоненты сред для разбавления спермы используются совместно в составе разбавителей спермы быков. При этом учитываются свойства составляющих криопротекторов для достижения необходимого эффекта. Подтверждением вышесказанному являются работы исследователей, разрабатывающих составы разбавителей спермы [2, 15, 24] (табл.).

Классические среды для разбавления спермы быка. Существует разнообразие классических разбавителей спермы, которые можно собрать в условиях лаборатории или племхоза, при этом не требующих специального оборудования или навыков специалиста. В настоящее время используются различные типы разбавителей как для домашнего, так и коммерческого применения, которые имеют свои собственные составы разбавителей, например, трис-яичный желток и трис-обезжиренный яичный желток. Одним из таких разбавителей также является обезжиренный молоко-яичный желток – это среда, содержащая липопротеин и лецитин для поддержания

жизнеспособности сперматозоидов и их защиты от холодового шока. Молоко содержит фермент лактенин, который разрушается при нагревании. Нагревание молока до температуры более 80 °С высвобождает сульфгидрильные группы (–SH), действующие как восстановительные вещества и регулирующие окислительный метаболизм спермы [15]. Среди разбавителей в отдельную группу можно выделить рН-буферные растворы, такие как лактозо-желточно-глицериновая (ЛЖГ), лактозо-желточно-цитратно-глицериновая (ЛЖЦГ), желточно-цитратно-глицериновая (ЖЦГ) среды, трис(гидроксиметил)аминометановый буфер (Tris), 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES), 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота (HEPES), 1,4-пиперазиндиэтансульфоновая кислота (PIPES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS), солевой раствор Хэнкса (HBSS) и другие.

Представленные выше среды для разбавления спермы с известным составом, такие как трис (Tris), TES, MES, MOPS и т. д., могут быть использованы как в исследовательских целях, так и на племпредприятиях. Необходимо соблюдать протокол использования разбавителей, требующий использования среды в течение 3-4 ч с момента ее приготовления. При этом, во время разбавления спермы среду следует держать в водяной бане или термостате с целью поддержания необходимой температуры. Несоблюдение правил работы с разбавителями спермы может привести к необратимым последствиям.

ЛЖГ или ЛЖЦГ. Наиболее широко распространенными средами являются ЛЖГ или ЛЖЦГ. Основными компонентами этих сред являются лактоза, цитрат натрия, желток куриных яиц и глицерин. При заморозке спермы на племпредприятиях применяются двухфракционные среды, к которым относится ЛЖЦГ, вследствие чего сперму последовательно дважды разбавляют. Фракция А без содержания глицерина, являющаяся первой фракцией, используется для начального разбавления и охлаждения спермы, вторая фракция Б, содержащая глицерин, добавляется после охлаждения спермы до +5 °С. Внесение второй фракции предотвращает возможные повреждения сперматозоидов и обеспечивает проявление действия антибиотиков. При использовании данных разбавителей используется метод замораживания спермы в гранулах.

Таблица – Классические и коммерческие среды для разбавления спермы крупного рогатого скота перед криоконсервацией /
Table – Classical and commercial media for dilution of bovine semen before cryopreservation

Контрольные данные / Control data		Опытные данные / Data of the experiment		Ссылка / Reference
контрольные условия / control conditions	показатели контрольных образцов / control sample parameters	состав опытного разбавителя / composition of the experimental diluent	результаты опытных образцов / results of experimental samples	
1	2	3	4	5
Нативная сперма / Native sperm	Подвижность 70 %, жизнеспособность 93.84±0.93 %, неповрежденная мембрана 93.28±0.90 % / Mobility 70 %, viability: 93.84± 0.93, intact membrane: 93.28± 0.90 %	3,03 г Tris, 1,78 г лимонной кислоты, 1,25 г фруктозы, 6 % глицерина, 20 % яичного желтка, 1000 МЕ/мл пенициллина, 1 мг/мл стрептомицина / 3,03 g Tris, 1.78 g citric acid, 1.25 g fructose, 6 % glycerol, 20 % egg yolk, 1000 IU/ml penicillin, 1 mg/ml streptomycin	Общая подвижность: 61,08±4,20 %, прогрессивная подвижность 53,20±3,96 %, жизнеспособность 80,56±0,46 %, неповрежденная мембрана 79,58±0,55 % / Total mobility: 61.08±4.20 %, progressive mobility 53.20±3.96 %, viability 80.56±0.46 %, Intact membrane 79.58±0.55 %	[15]
Криоконсервация в контрольной среде: 2,42 г Tris, 1,48 г лимонной кислоты, 1,00 г фруктозы, 6,6 мг глицерина, 25 мг гентамицина, 50 000 МЕ пенициллина на 100 мл стерильной воды / Cryopreservation in control medium: 2.42 g Tris, 1.48 g citric acid, 1.00 g fructose, 6.6 ml glycerol, 25 mg gentamicin, 50,000 IU penicillin per 100 ml sterile water	Общая подвижность 47.70±1.41 %, жизнеспособность 60.00±1.00 % / Mobility 47.70±1.41 %, viability 60.00±1.00 %	Контрольная среда с добавлением 20 мкМ Y-27632 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI; кат. № 717140) / Control medium with addition of 20 µm Y-27632 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI; cat. No. 717140)	Подвижность 54,28±1,51 %, жизнеспособность 68,33±1,66 % / Mobility 54.28±1.51 %, viability 68.33±1.66 %	[25]
Криоконсервация в контрольной среде: 30 г Tris, 17 г лимонной кислоты, 12,5 г фруктозы, 0,20 г сульфата аммония, 2 мл эмульгатора Orvus WA Pastes (Procterand-Gamble, Цинцинати, Огайо, США) и 20 % яичного желтка на 1000 мл разбавителя / Cryopreservation in control medium: 30 g Tris, 17 g citric acid, 12.5 g fructose, 0.20 g amikacin sulfate, 2 ml Orvus WA Pastes emulsifier (Procter and Gamble, Cincinnati, OH, USA) and 20 % egg yolk per 1000 ml diluent	Общая подвижность 58,52 %, прогрессивная подвижность 40,48 % / Total motility 58.52 %, progressive motility 40.48 %	Опыт 1. Botu-Bov (коммерческий разбавитель, содержащий в своем составе инновационные вещества для защиты целостности сперматозоидов) +20 % яичного желтка / Experiment 1. Botu-Bov (a commercial extender containing innovative substances to protect the integrity of spermatozoa) +20 % egg yolk Опыт 2. Botu-Bov (коммерческий разбавитель, содержащий в своем составе инновационные вещества для защиты целостности сперматозоидов) +1 % лецитина / Experiment 2. Botu-Bov (a commercial diluent containing innovative substances to protect the integrity of spermatozoa) + 1 % lecithin	Общая подвижность 61,24 %, прогрессивная подвижность 49,24 % / Total mobility 61.24 %, progressive mobility 49.24 % Общая подвижность 31,43 %, прогрессивная подвижность 24,90 % / Total mobility 31.43 %, progressive mobility 24.90 %	[26]

Продолжение табл.

1	2	3	4	5
Нативная сперма / Native sperm	Подвижность 72,6±9,0 %, доля клеток с поврежденной мембраной 96,9±1,1 %, целостность акросомы 91,9±4,9 %, некроз клеток 1,5±0,2 % / Mobility 72.6±9.0 %, the proportion of cells with a damaged membrane is 96.9±1.1 %, acrosome integrity 91.9 ± 4.9 %; cell necrosis 1.5±0.2 %	Triladil (коммерческий разбавитель, содержит в своем составе яичный желток, TRIS, лимонную кислоту, сахар, буферы, глицерин и стерильную воду, антибиотики (тилозин, гентамицин, спектиномицин, линкомицин) / Triladil (commercial diluent, contains egg yolk, TRIS, citric acid, sugar, buffers, glycerin and sterile water, antibiotics (tylosin, gentamicin, spectinomycin, lincomycin))	Подвижность 54,1±6,4 %; митохондриальный мембранный потенциал ниже, чем в нативе (P < 0,001); повышенная концентрация цАМФ (P<0,01); доля клеток с поврежденной мембраной 69,5±2,6 %, целостность акросомы 73,1±5,6 %; некроз клеток 13,3±1,5 % / Mobility: 54.1±6.4 %, mitochondrial membrane potential is lower than in native (P < 0.001), increased concentration of cAMP (P < 0.01), the proportion of cells with a damaged membrane is 69.5±2.6 %, acrosome integrity 73.1±5.6 %, cell necrosis 13.3±1.5 %	[27]
Сравнение с разбавителями BullXcell (коммерческий разбавитель, содержит в своем составе Tris, стерильную воду, яичный желток) и Andromed (коммерческий разбавитель, содержит в своем составе фосфолипиды, Tris, лимонную кислоту, сахара, антиоксиданты, буферы, глицерин, стерильную воду и антибиотики (тилозин, гентамицин, спектиномицин, линкомицин) / Comparison with BullXcell (commercial diluent, contains Tris, sterile water, egg yolk) and Andromed Andromed (commercial diluent, contains phospholipids, Tris, citric acid, sugars, antioxidants, buffers, glycerol, sterile water and antibiotics (tylosin, gentamicin, spectinomycin, lincomycin)) diluents	Показатели при использовании BullX-cell: общая подвижность 51,9±1,76 %, прогрессивная подвижность 41,8±1,82 % / Indicators by using BullXcell: total mobility 51.9±1.76 %, progressive mobility 41.8±1.82 % Показатели при использовании Andromed: общая подвижность 41,93±3,61 %, прогрессивная подвижность 31,7±2,97 % / Indicators by using Andromed: total mobility 41.93±3.61 %, progressive mobility 31.7±2.97 %	OptiXcell (коммерческий разбавитель, содержит в своем составе липосомы) / OptiXcell (commercial diluent, contains liposomes)	Общая подвижность 59,0±4,52 %, прогрессивная подвижность 45,7±4,09 % / Total mobility 59.0±4.52 %, progressive mobility 45.7±4.09 %	[28]

При проведении оценки показателей качества сперматозоидов быков после оттаивания большое количество с поврежденной акросомой ($6,0 \pm 1,3$), а также низкая способность к оплодотворению (в среднем 77 %) были продемонстрированы при применении молочно-кислых разбавителей в сравнении с контрольным ЛЖГ, с применением которого способность к оплодотворению составила всего 66 % [29].

Tris, или *трис*(гидроксиметил)аминометановый буфер, широко используется в качестве буферного компонента для растворов, используемых в различных биохимических и молекулярных анализах. Особенно часто встречаются сочетания *Tris* с другими буферами в качестве разбавителей для криоконсервации спермы млекопитающих. Показано, что титрование различных буферных растворов с *Tris* не оказывает отрицательного влияния на подвижность спермы быка после размораживания [30], чего не наблюдалось в аналогичных работах на образцах спермы других видов животных [25].

MOPS, или 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновая кислота, представлена в двух формах: в виде свободной кислоты или в виде конъюгата натриевой соли. При тестировании данного буферного раствора было оказано заметное влияние на поддержание подвижности сперматозоидов после хранения при более низких температурах [30].

Таким образом, разнообразие вариантов составных сред для разбавления спермы быков позволило исследователям получить важную информацию о влиянии определенных составов разбавителей в сравнительном аспекте на показатели качества мужских гамет при длительном хранении в условиях криоконсервации.

Коммерческие разбавители спермы быков. Одним из наиболее значимых факторов, снижающих качество спермы, является холодовой шок, перенесенный при замораживании и оттаивании. Степень травм от холодового шока ранжируется в зависимости от состава разбавителей, используемых криопротекторов [31]. Для снижения криоповреждения и улучшения жизнеспособности после оттаивания разработаны различные разбавители, в том числе созданные в коммерческих целях. Производители коммерческих разбавителей зачастую патентуют состав, что исключает возможность узнать его весь и пропорции компонентов, однако, основные из них известны. В связи

с этим все коммерческие среды можно разделить на две категории – содержащие в своем составе компоненты животного происхождения и не содержащие таковых.

Компоненты животного происхождения, находящиеся в составе коммерческих разбавителей, например, яичный желток или обезжиренное молоко, могут стать источниками различных заболеваний животных. В связи с этим особое внимание сосредоточено на стандартизации компонентов и создании определенного химического состава различных разбавителей для спермы. Ранее для криоконсервации спермы крупного рогатого скота применяли коммерческие разбавители на основе 20%-го яичного желтка [32]. В настоящее время имеются варианты с содержанием как натуральных компонентов, так и не содержащих продуктов животного происхождения. К разбавителям на основе яичного желтка относятся – *Triladyl* (Minitube, Тифенбах, Германия), *Steridyl* (Minitube, Тифенбах, Германия), *Botu-Bov* (Botupharma, Ботукату, Сан-Паулу, Бразилия), *BullXcell* (IMV Technologies, Л'Эгль, Франция), *Bovidyl* (Minitube, Тифенбах, Германия); на основе кокосовой воды – *ACP-111* (ACP Biotecnologia, произведенная в State University of Ceará); трис-концентрат (*Gibco BRL*, Grand Island, NY, USA); на основе обезжиренного молока – *Laciphos* (IMV Technologies, Л'Эгль, Франция). Коммерческие разбавители *OptiXcell* (IMV Technologies, Л'Эгль, Франция), *Bioxcell* (IMV Technologies, Л'Эгль, Франция) и *AndroMed* (Minitube, Тифенбах, Германия), также используемые для консервации спермы, не содержат животных белков.

Данные исследования Э. М. Мерфи и др. (E. M. Murphy et al., 2018) показали, что разбавители на растительной основе могут эффективно использоваться в качестве альтернативы разбавителям на основе животных компонентов в замороженной сперме с целью исключения распространения заболеваний [28]. В. А. Айрес и др. (V. A. Aires et al.) (2003) отметили, что разбавитель *Andromed*, содержащий соевый лецитин, был эффективнее по сравнению с разбавителем на основе яичного желтка при криоконсервации спермы быков голштинской породы. Он лучше всего снижает скорость понижения качества спермы быков на этапах консервации [33]. По результатам другого исследования, разбавитель *Biladyl*, содержащий трис-яичный желток, в сравнении с использованными

индивидуально Andromed и Biociphos дал более высокие результаты с точки зрения выживаемости спермы [34]. В то же время, показано, что разбавитель на основе трис-яичного желтка лучше сохраняет замороженную сперму, чем разбавители на растительной основе [33, 34].

Таким образом, представленное разнообразие коммерческих сред демонстрирует успешное использование их как в практике лабораторий, так и в практике племпредприятий с высококачественным результатом. Кроме того, стоит отметить преимущества коммерческих сред над сборными в их соответствии стандартам и безопасности в технологии разбавления спермы.

Добавки к разбавителям. 1. *Добавки, обладающие антиоксидантной активностью.* Кримоконсервация спермы быков является фундаментальным методом вспомогательных репродуктивных технологий в животноводстве, однако одним из главных ее недостатков является снижение качества спермы из-за окислительного стресса. В процессе замораживания происходит отток холестерина из мембраны сперматозоидов с нарушением соотношения холестерина и фосфолипидов, что приводит к повышенному количеству АФК [35]. Нейтрализующая способность антиоксидантной защиты спермы и особенно сперматозоидов с их ограниченным запасом антиоксидантных ферментов и мембранами, богатыми полиненасыщенными жирными кислотами, достаточно слаба. Семенная плазма содержит ферментные и неферментные системы антиоксидантной защиты от АФК. К основным антиоксидантным ферментам спермы относят: супероксидмутаза, ускоряющую процесс разрушения супероксида; каталазу, разрушающую молекулы перекиси водорода; глутатионпероксидазу, отвечающую за каталитическую редукцию перекиси водорода и органических пероксидов. Неферментная антиоксидантная система спермы включает широкий спектр веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, к которым относятся некоторые витамины, глутатион, карнитин и минералы селен, цинк, медь и хром [36]. Однако с избытком АФК обширные варианты защиты спермы с помощью антиоксидантной системы могут не справиться. В результате АФК индуцируют фрагментацию ДНК, снижают потенциал митохондрий и изменяют текучесть мембран. Все это негативно влияет на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов, одновременно вызывая транс-

локацию и олигомеризацию антиоксидантных белков, которые имеют решающее значение для защиты сперматозоидов от окислительного повреждения. Сперматозоиды особенно уязвимы к окислительному стрессу, поскольку их мембраны богаты полиненасыщенными жирными кислотами, а в их цитоплазме запасы антиоксидантных ферментов ограничены [37].

Глутатион (GSH) (L-глутамил-L-цистеинил-глицин) – является основным небелковым тиоловым соединением. В клетках млекопитающих минимизирует или даже предотвращает внутриклеточные повреждения, вызванные АФК, тем самым смягчая окислительный стресс в сперматозоидах млекопитающих. Кроме того, глутатион играет ключевую роль в функционировании митохондрий и стабилизации клеточной мембраны сперматозоидов [38, 39]. В исследовании С. Гангвар и др. (С. Gangwar et al., 2018) было показано, что при добавлении 0,5 мМ глутатиона к разбавителю спермы быка увеличилась подвижность размороженных сперматозоидов, количество живых сперматозоидов и целостность акросомы [40].

L-цистеин содержится в клетках и является членом группы полунезаменимых аминокислот-антиоксидантов [41], аналогами являются цистеин HCl, L-цистеин и N-ацетил-L-цистеин. Данная аминокислота подавляет выработку образующихся в результате метаболизма сперматозоидов свободных радикалов или снижает уровень активных форм кислорода [42, 43]. Данные свойства L-цистеина способствуют стабилизации процента общей подвижности, прогрессивной подвижности, целостности акросом и целостности плазматической мембраны [44].

Витамины. Для улучшения качества семени при кримоконсервации в разбавители добавляют различные витамины, поскольку они являются неферментативными антиоксидантами [45, 46].

Витамин E – клеточный стабилизатор ненасыщенных липидов против окислительного разрушения, поддерживает структурную и функциональную целостность на субклеточном уровне. Может разрывать ковалентные связи, образующиеся между АФК и боковыми цепями жирных кислот в липидах клеточных мембран. Добавление 0,134 г/100 мл витамина E к сперме быков симментальской породы увеличило подвижность, снизило смертность и процент аномалий сперматозоидов [47]. Внесение витамина E перед кримоконсервацией в концент-

рациях 60 и 120 мкМ в разбавители спермы, основанные на среде Tris и включающие яичный желток, обеспечивало более высокую целостность плазматической мембраны, митохондрий и кинематических параметров сперматозоидов быков [48].

Витамин С (аскорбиновая кислота) – водорастворимый антиоксидант с низкой токсичностью и высокой эффективностью, способный удалять радикалы кислорода. Нейтрализует воздействие H_2O_2 на ДНК сперматозоидов, перерабатывает неактивный витамин Е и снижает перекисное окисление липидов. В работе Шри Супарьяти и др. (Sri Suharyati et al., 2024) витамин С добавляли к разбавителям трис-яичному желтку в концентрации 0,2 г/мл, цитрату яичного желтка – 0,5 г/мл и обезжиренному молоку – 0,25 г/мл, что определило высокие результаты по подвижности, проценту живых сперматозоидов и снизило долю аномальных сперматозоидов брахманских быков после криоконсервации [49].

Витамин В12 – водорастворимый витамин, который функционирует как кофермент в различных биохимических реакциях, таких как синтез метионина и метаболизм аминокислот. В работе Дж. Х. Ху и др. (J. H. Hu et al., 2009) показано, что введение витамина В12 к разбавителям в концентрации 2,5 мг/мл повысило качество замороженной спермы быков, процент подвижности сперматозоидов и улучшило характеристики движения [13]. Аналогичные результаты получили Х. Ахмед и др. (H. Ahmed et al., 2021) при изучении влияния витамина В12 на сперму быков-буйволов [50]. В вышеуказанной работе дано положительное влияние витамина в концентрациях 4 и 5 мг/мл на поступательную подвижность сперматозоидов, активность, митохондриальный мембранный потенциал и целостность акросомы. Кроме того, введение витамина В12 в концентрации 5 мг/мл в образцы спермы до криоконсервации увеличило концентрацию АТФ, а также плазмалемму и целостность ДНК в сравнении с образцами, замороженными без витамина.

Сахарá – ксилоза, фруктоза, глюкоза, галактоза, мальтоза, сахароза и раффиноза эффективно используются для криоконсервации спермы быков в качестве криопротекторных агентов. В разбавителях сахарá являются источником энергии для клеток, а также поддерживают жизнеспособность сперматозоидов после размораживания. Примером

служит работа К. К. Перес-Мартин и др. (C. C. Pérez-Marín et al., 2023), в которой сравнивали влияние сахарозы и трегалозы в концентрациях 0,15 и 0,3М на показатели подвижности, жизнеспособности, статуса акросомы и перекисного окисления липидов мембран. В результате проведенного исследования образцы с трегалозой (0,15М) и сахарозой (0,3М) содержали более высокую по качеству сперму, что говорит о необходимости подбора концентрации для каждого сахара в равных условиях [51]. Изучение воздействия сахара рафинозы в концентрации 25 мМ в сочетании с 3 мМ глутамина в составе разбавителя Optidyl демонстрирует улучшение результатов по показателю подвижности сперматозоидов, подсчитанного с помощью программы CASA ($61,0 \pm 4,4$ %) и защитному эффекту для акросом ($12,0 \pm 0,6$ %) в сравнении с аналогичной средой без рафинозы [52].

2. Антифризные белки. В последнее время особый интерес у ученых представляет влияние антифризных белков (АФБ) на сохранность спермы быков при криоконсервации [53]. Одними из АФБ являются LeIBP и AFPIII, влияние которых было изучено Х. Джанг и др. (H. Jang et al., 2020). Активность и жизнеспособность сперматозоидов в группе, обработанной LeIBP, была выше, чем в группе с AFPIII. При этом выявлено, что LeIBP является полезным криопротективным адъювантом для криоконсервации спермы быка. Также в работе показана дозозависимость белка, наиболее эффективной концентрацией стала 0,1 мкг/мл LeIBP [54]. В другом исследовании внесение AFPI в разбавитель спермы привело к образованию параллельных кристаллов при 0,1 мкг/мл, 1 и 10 мкг/мл. Расположение сперматозоидов между кристаллами влияет на осмотическую резистентность в сперматозоидах, которая коррелирует с фертильностью быка. Из этого следует, что сперматозоиды быка, криоконсервированные в присутствии AFPI, могут иметь повышенную фертильность *in vivo* [55].

3. Ингибитор Rho-ассоциированной киназы Y-27632. Положительное влияние на качественные показатели криоконсервированной спермы оказывает применение селективного и мощного ингибитора Rho-ассоциированной киназы (Roh/Rock) Y-27632, контролирующего экспрессию ROCK I и ROCK II. Внесение этого ингибитора в концентрации 5–10 мкМ в разбавитель спермы быков повышало подвижность после размораживания [56]. Кроме того,

введение Y-27632 в концентрации 20 мкМ снижало экспрессию генов, связанных с апоптозом, а также продукцию АФК и уровней концентрации малонового диальдегида, индикатора перекисного окисления липидов, что свидетельствует об антиапоптотическом и антиоксидантном действии белка в разбавителе. Данный ингибитор улучшал кинематику и функциональные параметры спермы и понижал фрагментацию ДНК, в следствие чего увеличивалась скорость дробления бластоцисты [32].

4. *Добавки растительного происхождения.* Альтернативным взглядом стало использование веществ, полученных из растений с антиоксидантными, ингибиторными свойствами, улучшающими показатели спермы. Одним из представителей растительных добавок является полифенол зеленого чая – эпигаллокатехин-3-галлата (EGCG). Он обладает антиоксидантными, хелатирующими, антиапоптотическими и противовоспалительными свойствами. Добавление очищенного EGCG в дозировке 0,1 мг/100 мл в разбавитель трис-яичный желток не показало снижения подвижности, жизнеспособности или аномалий по сравнению с контрольной обработкой [57]. Еще одним веществом растительного происхождения является натуральный полифенол винограда, мощный антиоксидант – ресвератрол. В работе Х. Ахмед и др. (H. Ahmed et al., 2020) было изучено его действие в концентрациях 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ в разбавителе трис-лимонная кислота на показатели качества сперматозоидов быков буйволов (*Bubalus bubalis*). Результаты привели к однозначному выводу о положительном влиянии вещества на качественные параметры спермы, уровни антиоксидантных ферментов и оплодотворяющую способность. Кроме того, введение ресвератрола в разбавители оказало смягчающий эффект на фрагментацию ДНК и перекисное окисление липидов в сперматозоидах буйвола во время криоконсервации [58].

Фитогормоны также продемонстрировали положительное воздействие на показатели качества спермы. В работе С. Г. Лебедева изучено действие одного из фитогормонов с низкой токсичностью и без мутагенного действия – эпибрасинолида на подвижность, выживаемость, соотношение нормальных и патологических форм сперматозоидов, а также сохранность акросомы в весенне-летний и осенне-зимний периоды. Показано, что введение 0,0001 мл эпибрасинолида в разбавитель спермы

оказывает более выраженное положительное действие на все показатели качества спермы, особенно в зимне-осенний период [59].

5. *Ионы.* К концу прошлого столетия начали изучать влияние добавления в разбавители спермы для поддержания осмолярности различные аминокислоты, α -кетокислоты, комбинации солей и углеводов, а также электронейтральных молекул, содержащих положительно и отрицательно заряженные части, так называемых цвиттер-ионов [60]. Например, в работе Э. Ф. Грэм и др. (E. F. Graham et al., 1972) было выявлено, что из семи различных буферов цвиттер-ионов N-трис(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфоновая кислота (TES) с трисом в качестве основы для титрования оказалась наиболее удовлетворительной буферной системой для разбавления сперматозоидов быка для замораживания [30]. В другой работе М. Колосса, Х. Зайберт (M. Kolossa, H. Seibert, 1990) продемонстрировано снижение двигательной активности сразу после размораживания сперматозоидов, замороженных в цвиттер-ионной буферной системе HEPES-Tris/Citrate с добавлением 0,9%-го лецитина в сравнении с яичным желтком, однако, через 2 часа инкубации при 37 °C результат получили противоположный [61].

6. *Противомикробные препараты.* В сперме быков наблюдается наличие множества различных бактерий, например, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Kl. Pyogenes*, *P. Aurogenosa* и другие, в том числе способные выдерживать сверхнизкие температуры при криоконсервации спермы, которые негативно влияют на ее показатели, снижая жизнеспособность, подвижность сперматозоидов и вызывая их агрегацию [62]. Используемые в разбавителях спермы млекопитающих противомикробные препараты, такие как пенициллины и цефалоспорины, изменяют процесс синтеза клеточной стенки бактерий, вызывая её лизис с дальнейшей гибелью клеток. Другая группа препаратов включает аминогликозиды, макролиды и линкозамиды, являющиеся ингибиторами синтеза бактериального белка [63, 64].

Альтернативным вариантом является использование веществ, обладающих антимикробными эффектами. Например, было показано, что применение 0,4%-го маточного молочка улучшало жизнеспособность и фертильность сперматозоидов быков [65], а использование 5%-го экстракта куркумина снижало количество бактерий на 32 % и оказало

небольшое положительное воздействие на кинематику сперматозоидов [66].

Таким образом, на сегодняшний день в научных источниках представлены разнообразные варианты добавок к разбавителям спермы быков, имеющих природное или синтетическое происхождение. Несмотря на то, что данные компоненты проявляют кардинально различное воздействие на сперму и сперматозоиды их применение имеет единую цель – сохранение качественной спермы в течение длительного времени в криоконсервированных условиях.

Заключение. В настоящее время вспомогательные репродуктивные технологии в животноводстве не могут существовать без этапа сохранения спермы быков путем замораживания. Криоконсервация подразумевает хранение максимального числа качественных гамет при сверхнизких температурах, в связи с чем на протяжении более полувека ученые создают универсальные оптимальные условия для разбавления спермы. За столь продолжительный срок научным сообществом разработаны различные типы как составных, так и коммерческих разбавителей, направленных на сохранение максимальной фертильности сперматозоидов во время хранения. Однако эффективное совершенствование создания высококачественного разбавителя, играющего

незаменимую роль в улучшении качества спермы после размораживания по показателям жизнеспособности, подвижности сперматозоидов, целостности плазматической мембраны и акросомы, митохондриального мембранного потенциала, кинематики и другим, требует комплексного подхода. Результаты экспериментов по исследованию биохимических, молекулярных и генетических маркеров сперматозоидов также могут быть основой для модернизации существующих протоколов создания разбавителей. Использование этих подходов сможет привести к оптимизации состава разбавителей, что является своевременной задачей в мировом научном сообществе. Особенно стоит отметить актуальность данной задачи для России в связи с санкционной политикой иностранных государств в последние годы, приведшей к затруднению логистики и увеличению ценовой категории коммерческих разбавителей спермы иностранного производства. В связи с чем обеспечение развития племенного животноводства за счет внедрения конкурентоспособных отечественных технологий и разработок разбавителей спермы, не уступающих по результативности иностранным аналогам, является безусловно высокоперспективным.

References

1. Зиновьева Н. А., Полябин С. В., Чинаров Р. Ю. Вспомогательные репродуктивные технологии: история становления и роль в развитии генетических технологий в скотоводстве (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2020;55(2):225–242. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.2.225rus> EDN: YVDOIN
 2. Zinovieva N. A., Pozyabin S. V., Chinarov R. Yu. Assisted reproductive technologies: the history and role in the development of genetic technologies in cattle (review). *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* = Agricultural Biology. 2020;55(2):225–242. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.2.225rus>
 3. Корочкина Е. А., Мороз А. И. Значение разбавителей спермы разных видов сельскохозяйственных животных в процессе ее криоконсервации. *Генетика и разведение животных*. 2022;(4):108–113. DOI: <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2022-4-108-113> EDN: MZPQXD
 4. Korochkina E. A., Moroz A. I. The importance of sperm diluents of different types of farm animals in the process of the cryopreservation. *Genetika i razvedenie zhivotnykh* = Genetics and breeding of animals. 2022;(4):108–113. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2022-4-108-113>
 5. Lonergan P. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*. 2018;12(s1):s4–s18. DOI: <https://doi.org/10.1017/S175173111800071X>
 6. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных: биол.-зоотех. монография. М., 1962. 696 с.
 7. Milovanov V. K. Reproduction biology and artificial insemination of animals: biol.-zootechnical. the monograph. Moscow, 1962. 696 p.
 8. Phillips P. H., Lardy H. A. A Yolk-Buffer Pabulum for the Preservation of Bull Semen. *Journal of Dairy Science*. 1940;23:399–404. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(40\)95541](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(40)95541)
 9. Polge C., Smith A., Parkes A. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*. 1949;164:666. DOI: <https://doi.org/10.1038/164666a0>
 10. Smith A. U., Polge C. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Veterinary Record*. 1950;62:115–116.
 11. Плешаков А. В. Оплодотворяющая способность спермиев, хранившихся длительное время в жидком азоте. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2004;(3):319–321.
- Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=17993255> EDN: PDTKKR

Pleshakov A. V. Fertilizing ability of sperm stored for a long time in liquid nitrogen. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* = Bulletin of Altai State Agricultural University. 2004;(3):319–321. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=17993255>

9. Нарышкина Е. Н. Изменение показателей собственной продуктивности быков-производителей голштинской породы в зависимости от сезона года и возраста. *Аграрный вестник Урала*. 2020;(S14):40–48. DOI: <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2021-14-40-48> EDN: WBYUXE

Naryshkina E. N. Changes in the indicators of own productivity of holstein bulls depending on the season and age. *Agrarnyy vestnik Urala* = Agrarian Bulletin of the Urals. 2020;(S14):40–48. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2021-14-40-48>

10. Baust J. G., Gao D., Baust J. M. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5(3):90–96. DOI: <https://doi.org/10.4161/org.5.3.10021>

11. Hezavehei M., Sharafi M., Kouchesfahani H. M., Henkel R., Agarwal A., Esmaeili V., Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018;37(3):327–339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>

12. Ozimic S., Ban-Franchez H., Stimpfel M. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023;45(6):4716–4734. DOI: <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>

13. Hu J. H., Li Q. W., Chen Y. L., Jiang Z. L., Jia Y. H., Wang L. Q., Ou B. B. Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2009;33(5):379–384. DOI: <https://doi.org/10.3906/vet-0712-19>

14. Moussa M., Martinet V., Trimeche A., Tainturier D., Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002;57(6):1695–1706. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00682-9)

15. Arif A. A., Maulana T., Kaiin E. M., Purwantara B., Arifiantini R. I. The Quality of Frozen Semen of Limousin Bull in Various Semen Diluents. *Tropical Animal Science Journal*. 2022;45(3):284–290. DOI: <https://doi.org/10.5398/tasj.2022.45.3.284>

16. Mayer D. T., Lesley F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities and fertilization capacity of mammalian spermatozoa. *The Journal of Animal Science*. 1945;4(3):261–269. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1945.43261x>

17. Blackshaw A. W. The prevention of temperature shock of bull and ram spermatozoa. *The Australian Journal of Biological Sciences*. 1954;7(4):573–582. DOI: <https://doi.org/10.1071/B19540573>

18. Martin I. C. A. Effects of lecithin, egg yolk, fructose and period of storage at 5 °C on bull spermatozoa frozen to -79 °C. *Journals of Reproduction and Fertility*. 1963;6(3):441–449. DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0060441>

19. Lanz R. N., Pickett B. W., Komarek R. J. Effect of lipid additives on pre and post-freeze survival of bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*. 1965;48(12):1692–1697. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(65\)88553-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(65)88553-8)

20. Gebauer M. R., Pickett B. W., Komarek R. J., Gaunya W. S. Motility of bovine spermatozoa extended in “defined” diluents. *Journal of Dairy Science*. 1970;53(6):817–823. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86297-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86297-X)

21. Bollwein H., Fuchs I., Koess C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reproduction Domestic Animal*. 2008;43(2):189–195. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00876.x>

22. Amirat L., Tainturier D., Jeanneau L., Thorin C., Gérard O., Courtens J. L., Anton M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 2004;61(5):895–907. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00259-0)

23. Khan I. M., Cao Z., Liu H., Khan A., Rahman S. U., Khan M. Z., Sathanawongs A., Zhang Y. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. *Frontiers In Veterinary Science*. 2021;8:609180. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>

24. Behnam M., Asadpour R., Topraggaleh T. R., Hamali H. Improvement of post-thaw quality and fertilizing ability of bull spermatozoa using Rho kinase inhibitor in freezing extender. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023;10:1155048. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1155048>

25. Will M. A., Clark N. A., Swain J. E. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *The Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2011;28(8):711–724. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9582-0>

26. Crespilho A. M., Filho M. F., Dell'Aqua J. A., Nichi M., Monteiro G. A., Avanzi B. R., Martins A., Papa F. O. Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*. 2012;149(1-2):1–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011>

27. Benko F., Mohammadi-Sangcheshmeh A., Đuračka M., Lukáč N., Tvrdá E. *In vitro* versus cryo-induced capacitation of bovine spermatozoa, part 1: Structural, functional, and oxidative similarities and differences. *PLoS One*. 2022;17(10):e0276683. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276683>

28. Murphy E. M., O'Meara C., Eivers B., Lonergan P., Fair S. Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on *in vitro* sperm kinematics and *in vivo* fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*. 2018;191:70–75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.010>
29. Медведев Г. Ф., Аникевич Л. П. Свойства молочной среды различного состава для разбавления спермы быков. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. 2001;(2):65–69.
Medvedev G. F., Anikevich L. P. Properties of milk media of various compositions for diluting bull semen. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya agrarnykh nauk* = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Series. 2001;(2):65–69. (In Belarus).
30. Graham E. F., Crabo B. G., Brown K. I. Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. *Journal of Dairy Science*. 1972;55(3):372–378.
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(72\)85499-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(72)85499-7)
31. Partyka A., Niaski W., Ochot M. Methods of assessment of cryopreserved semen. *Current Frontiers in Cryobiology*. Edited by Igor I. Katkov. 2012. pp. 547–574. DOI: <https://doi.org/10.5772/33565>
32. Bathgate R., Maxwell W. M. C., Evans G. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on *in vitro* post-thaw sperm quality. *Reproduction Domestic Animals*. 2006;41(1):68–73. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x>
33. Aires V. A., Hinsch K.-D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 2003;60(2):269–279. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01369-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01369-9)
34. Muñio R., Fernández M., Peña A. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18^h. *Reproduction Domestic Animals*. 2007;42(3):305–311. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00784.x>
35. Bansal A. K., Bilaspuri G. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*. 2010;23:21–28. DOI: <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
36. Гамидов С. И., Шатылко Т. В., Попова А. Ю., Гасанов Н. Г., Гамидов Р. С. Оксидативный стресс сперматозоидов: клиническое значение и коррекция. *Медицинский совет*. 2021;(3):19–27.
DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-3-19-27> EDN: LTGSQU
- Gamidov S. I., Shatylko T. V., Popova A. Y., Gasanov N. G., Gamidov R. S. Sperm oxidative stress: clinical significance and management. *Meditsinskiy sovet* = Medical Council. 2021;(3):19–27. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-3-19-27>
37. Agnieszka M. M., Magdalena B. N., Mariola S., Andrzej C. PRDX5 and PRDX6 translocation and oligomerization in bull sperm: a response to cryopreservation-induced oxidative stress. *Cell Commun Signal*. 2025;23(1):15. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-024-02015-9>
38. Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., Tata V. D., Casini A. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*. 2003;66(8):1499–1503. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00504-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00504-5)
39. Llanvenera M., Delgado-Bermúdez A., Olives S., Mateo-Otero Y., Recuero S., Bonet S., Fernández-Fuertes B., Yeste M., Barranco I. Glutathione S-Transferases Play a Crucial Role in Mitochondrial Function, Plasma Membrane Stability and Oxidative Regulation of Mammalian Sperm. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(2):100.
DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9020100>
40. Gangwar C., Saxena A., Patel A., Singh S. P., Yadav S., Kumar R., Singh V. Effect of reduced glutathione supplementation on cryopreservation induced sperm cryoinjuries in Murrah bull semen. *Animal Reproduction Science*. 2018;192:171–178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.005>
41. Yin J., Ren W., Yang G., Duan J., Huang X., Fang R., et al. Cysteine metabolism and its nutritional implications. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2016;60(1):134–146. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500031>
42. Tuncer P. B., Bucak M. N., Büyükleblebici S., Sarıözkan S., Yeni D., Eken A., et al. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*. 2010;61(3):303–307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.09.009>
43. Bilodeau J. F., Chatterjee S., Sirard M. A., Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. 2000;55(3):282–288. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7)
44. Hayanti S. Y., Sholikin M. M., Jayanegara A., Ulu M. F., da Costa M. A., Fitriawaty F., et al. Effect of supplementing L-cysteine and its group analogs on frozen semen quality of bulls: A meta-analysis. *Veterinary World*. 2022;15(11):2517–2524. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2517-2524>
45. Gabr A. A., El Basuini M. F. Effect of tonophosphan, zinc oxide, and ascorbic acid on semen, sexual desire, and the fertility rate of Egyptian buffalo bulls. *Annals of Agricultural Sciences*. 2018;63(2):215–221.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2018.12.001>
46. 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. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>
47. Fariz H., Yon O., Daud S. Effect of vitamin E addition to frozen Simmental bull semen extender on post-thawing quality. *E3S Web of Conferences*. 2020;142:02002. DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014202002>

48. Hassani-Bafrani H., Tavalae M., Arbabian M., Dattilo M., Nasr-Esfahani M. H. The Effect of Vitamin E & Vitamin B on Sperm Function in Rat Varicocele Model. *Andrologia*. 2019;51(11):e13429. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.13429>
49. Suharyati S., Hartono M., Siswanto S., Wahid A. N., Saputra H. R., Sari F. N. The effectiveness of vitamin c and e addition in various diluents of Brahman cattle spermatozoa after freezing. *Jurnal Kedokteran Hewan – Indonesian Journal of Veterinary Sciences*. 2024;18(3):88–92. DOI: <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v18i3.37128>
50. Ahmed H., Jahan S., Riaz M., Ijaz M. U., Wahab A. Improving the quality and in vitro fertilization rate of frozen-thawed semen of buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls with the inclusion of vitamin B₁₂ in the cryopreservation medium. *Animal Reproduction Science*. 2021;229:106761. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106761>
51. Pérez-Marín C. C., Quevedo L., Salas M., Arando A. Ultra-Rapid Freezing Using Droplets Immersed into Liquid Nitrogen in Bull Sperm: Evaluation of Two Cryoprotective Disaccharides and Two Warming Temperatures. *Biopreservation and Biobanking*. 2023;21(6):554–560. DOI: <https://doi.org/10.1089/bio.2022.0075>
52. Tuncer P. B., Sarıözkan S., Bucak M. N., Ulutaş P. A., Akalın P. P., Büyükleblebici S., Canturk F. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*. 2011;75(8):1459–1465. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.006>
53. Correia L. F. L., Alves B. R. C., Batista R. I. T. P., Mermillod P., Souza-Fabjan J. M. G. Antifreeze proteins for low-temperature preservation in reproductive medicine: A systematic review over the last three decades. *Theriogenology*. 2021;176:94–103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.025>
54. Jang H., Kwon H. J., Sun W. S., Hwang S., Hwang I. S., Kim S., et al. Effects of Leucosporidium-derived ice-binding protein (LeIBP) on bull semen cryopreservation. *Veterinary Medicine and Science*. 2020;6(3):447–453. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.269>
55. Prathalingam N. S., Holt W. V., Revell S. G., Mirczuk S., Fleck R. A., Watson P. F. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*. 2006;66(8):1894–1900. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.041>
56. Karaşör Ö. F., Bucak M. N., Cenariu M., Bodu M., Taşpınar M., Taşpınar F. The effects of different doses of ROCK inhibitor, antifreeze protein III, and boron added to semen extender on semen Freezability of Ankara bucks. *Molecules*. 2022;27(22):8070. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27228070>
57. Prastiya R. A., Sardjito T., Saputro A. L., Budi D. S., Maxdhameta S. I., Sulistiyawati E., et al. Quality and kinematic characteristics of Bali bulls frozen semen with purified green tea extract epigallocatechin-3-gallate antioxidant addition in diluent. *Open Veterinary Journal*. 2024;14(8):2040–2048. DOI: <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i8.33>
58. Ahmed H., Jahan S., Ullah H., Ullah F., Salman M. M. The addition of resveratrol in tris citric acid extender ameliorates post-thaw quality parameters, antioxidant enzymes levels, and fertilizing capability of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*. 2020;152:106–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.034>
59. Лебедев С. Г. Использование биологически активных веществ при заморозке спермы быков-производителей. Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. 2005;41(1):88–91. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=25054554> EDN: VCGZMX
- Lebedev S. G. The use of biologically active substances in the freezing of sperm from breeding bulls. *Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya Vitebskaya ordena Znak pocheta gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny*. 2005;41(1):88–91. (In Belarus). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=25054554>
60. Watson P. F. The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. 1979;1:283–350.
61. Kolossa M., Seibert H. A chemically 'defined' diluent for cryopreservation of bovine spermatozoa. *Andrologia*. 1990;22(5):445–454. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1990.tb02026.x>
62. Gadea J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2003;1(2):17–27. DOI: <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
63. Spinoso H. S., Górniak S. L., Bernardi M. M. *Farmacologiaaplicada à medicinaveterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. URL: <https://repositorio.usp.br/item/001523488>
64. Santos C. S., Silva A. R. Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology. *Animal Reproduction*. 2020;17(1):e20190111. DOI: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0111>
65. Abd-Allah S. M. Effect of royal jelly on bovine sperm characteristics during post-thaw incubation in vitro. *Revista Electronica de Veterinaria*. 2010;21(2):81–85. DOI: <https://doi.org/10.30972/vet.2121747>
66. Cojkcic A., Hansson I., Johannisson A., Morrell J. M. Effect of Some Plant-Based Substances on Microbial Content and Sperm Quality Parameters of Bull Semen. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):3435. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24043435>

Сведения об авторах

✉ **Старикова Дарья Андреевна**, кандидат биол. наук, научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», д. 55а, Московское шоссе, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5324-4090>, e-mail: live8avis@mail.ru

Баркова Ольга Юрьевна, кандидат биол. наук, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», д. 55а, Московское шоссе, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0963-905X>

Чистякова Ирэна Валерьевна, кандидат биол. наук, научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», д. 55а, Московское шоссе, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7229-5766>

Плешанов Николай Вячеславович, научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», д. 55а, Московское шоссе, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4634-7515>

Габова Алина Валерьевна, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», д. 55а, Московское шоссе, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0009-0007-6039-6958>

Information about the authors

✉ **Daria A. Starikova**, PhD in Biological Science, researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moskovskoe Shosse, 55a, Pushkin, St. Petersburg, Russian Federation, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5324-4090>, e-mail: live8avis@mail.ru

Olga Yu. Barkova, PhD in Biological Science, senior researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moskovskoe Shosse, 55a, Pushkin, St. Petersburg, Russian Federation, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0963-905X>

Irena V. Chistyakova, PhD in Biological Science, researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moskovskoe Shosse, 55a, Pushkin, St. Petersburg, Russian Federation, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7229-5766>

Nikolay V. Pleshanov, researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moscow Shosse, 55a, Pushkin, St. Petersburg, Russian Federation, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4634-7515>

Alina V. Gabova, junior researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moscow Shosse, 55a, Pushkin, St. Petersburg, Russian Federation, 196601, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <http://orcid.org/0009-0007-6039-6958>

✉ – Для контактов / Corresponding author