

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕРМЫ БАРАНА,  
ЗАМОРОЖЕННОЙ В РАЗНЫХ ЭКСТЕНДЕРАХ

М.М. АЙБАЗОВ<sup>1</sup>, А.Н. ШЕВЧЕНКО<sup>2</sup>, М.И. СЕЛИОНОВА<sup>3</sup>, Т.В. МАМОНТОВА<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина»;

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»)

*Многочисленными исследованиями доказана необходимость введения яичного желтка в состав синтетических сред для разбавления спермы перед ее криоконсервацией. Одновременно было продемонстрировано, что его использование может негативно отражаться на качестве замороженной спермы. Целью исследования являлась сравнительная оценка основных качественных параметров спермиев баранов, замороженных с использованием разбавителя на основе TRIS с желтком куриного яйца и двух безжелточных разбавителей (OvixCell® и AndroMed®).*

*Показана лучшая сохранность кинематических характеристик спермиев, криоконсервированных в разбавителе TRIS с нативным желтком куриного яйца, подтверждающая его более высокие криопротекторные характеристики по сравнению с коммерческими безжелтковыми экстендерами. Достоверно более высокая общая и прогрессивная подвижность спермиев наблюдалась в среде на основе TRIS с яичным желтком ( $P < 0,05$ ). Это преимущество сохранилось после 4-часовой инкубации, а к концу культивирования (через 6 ч) усилилось ( $P < 0,01$ ). Таким образом, сперма барана, замороженная в среде с яичным желтком, сохраняла лучшую подвижность и обеспечивала сохранность акросомальной мембраны, чем в безжелточных экстендерах, что позволяет прогнозировать ее более высокую биологическую полноценность. Оценка некоторых показателей спермы с помощью системы CASA показала, что сразу после размораживания соломинок достоверные различия по подвижности между тремя экстендерами не установлены. При оценке спустя 2 ч после оттаивания для разбавителя, содержащего яичный желток, были установлены более высокие результаты по некоторым исследуемым признакам по сравнению с фосфолипидными разбавителями.*

**Ключевые слова:** баран, сперма, разбавители, криоконсервация, качество.

**Введение**

На сегодняшний день предложено большое количество методик замораживания спермы барана, обеспечивающих сохранение после оттаивания до 50...70% спермиев с активным поступательным движением. Однако эксперименты показали, что процедура криоконсервации и последующей дефростации существенно ухудшает ее качественные показатели, вследствие чего оплодотворяемость овец, осемененных замороженной спермой, резко снижается и составляет 30...40%, в некоторых случаях доходят до 50% [15]. Низкий показатель фертильности является основным ограничением для использования криоспермы методом цервикальной инсеминации.

При внутриматочном введении спермы методом лапароскопии оплодотворяемость овец значительно выше (60...70%) и в некоторых случаях достигает 80%. Однако это сложная процедура, требующая дорогостоящего оборудования и высокой квалификации операторов, вследствие чего имеет ограниченное распространение [25].

Во многих странах ведутся исследования по выяснению причин низкой фертильности криоспермы и повышению ее жизнеспособности и биологической полноценности [17, 33].

Криоконсервация спермиев состоит из нескольких взаимосвязанных технологических обработок спермы, которые приводят к изменениям отдельных структурных единиц спермиев, что всегда сопровождается снижением их биологической полноценности. При этом изучено, что разной степени и локализации повреждения гамет происходят на всех стадиях подготовки спермы к замораживанию: разбавление, уравнивание и собственно криоконсервация. Установлено, что последняя процедура в наибольшей степени повреждает спермии. Следовательно, основная задача при криоконсервации спермы заключается в том, чтобы минимизировать деструктивное действие ультранизких температур при введении спермиев в состояние анабиоза. Поэтому определяющее значение имеют защитные синтетические среды для разбавления спермы. Они предохраняют спермии от неблагоприятных воздействий внешней среды, поддерживают их биологическую полноценность, а также увеличивают объем спермы, что имеет важное практическое значение для интенсивного использования производителей. Кроме того, ингредиенты разбавителей спермы поддерживают оптимальный кислотно-щелочной баланс в среде, обеспечивают энергию для спермиев, создают свободную от микроорганизмов окружающую среду.

За последние 60 лет в разных странах сконструировано множество экстендеров для разбавления спермы барана перед криоконсервацией, различающихся по составу ингредиентов. При этом все исследователи едины в мнении о том, что абсолютно необходимым, но не единственным компонентом всех разбавителей является глицерин [29]. До недавнего времени таким же императивным компонентом разбавителя считался желток куриного яйца, являющийся высокоэффективным субстратом для поддержания биологической функциональности спермиев у различных видов животных [3]. Многие исследователи изучали роль различных видов и концентраций яичного желтка с целью улучшения его преимуществ для криоконсервации спермы барана и доказали его необходимость в составе сред. Было выяснено, что ингредиентами желтка, защищающими целостность спермиев во время криоконсервации, являются липопротеины низкой плотности (ЛПНП). Считается, что они прилипают к поверхности плазменной мембраны спермы, восстанавливают фосфолипиды и предотвращают повреждение мембраны [24].

Одновременно с этими исследованиями было продемонстрировано, что яичный желток представляет собой основной риск бактериального заражения в сперме. Более того, у некоторых видов животных, например, у козлов, яичный желток может существенно снизить качество замороженных-оттаянных спермиев в результате агглютинации и, таким образом, вызвать процесс их преждевременной гибели. Наконец, состав натурального яичного желтка чрезвычайно изменчив, что затрудняет стандартизацию разбавителей на основе желтка куриного яйца [27].

Были разработаны разбавители спермы с заменителями желтка куриного яйца, успешно протестированные с целью улучшения качественных характеристик криоконсервированной спермы барана при одновременном устранении вышеупомянутых недостатков компонентов яичного желтка [18]. В частности, было показано, что модифицированный разбавитель, содержащий лиофилизированный яичный желток, обеспечивает аналогичный криопротекторный эффект, как и разбавитель на основе

яичного желтка [2]. Однако Moustacas et al. (2011), оценивавшие пригодность использования натуральных или лиофилизированных липопротеинов низкой плотности, пришли к выводу о том, что для сохранения общей и прогрессивной подвижности спермиев при криоконсервации спермы барана подходят натуральные, но не лиофилизированные липопротеины [28].

Многими исследованиями продемонстрировано положительное влияние некоторых нетрадиционных добавок-экстендеров (криопротекторов) на кинематические характеристики спермиев. Однако попытки применения биологически более безопасных компонентов (казеин, пальмовое или кокосовое масло) в качестве альтернативы яичному желтку в процессе замораживания спермы барана не привели к положительным результатам – все вещества обладали более низкими протективными свойствами, чем куриный желток. Тем не менее признается, что такие добавки, как сухое молоко [36], циклодекстрин, холестерин, витамин Е [6] или антиоксиданты [5, 33], должны быть более подробно исследованы в качестве перспективных средств повышения качества криоспермы баранов.

Исследование соевого лецитина как заменителя желтка в составе криопротективной среды показало его достаточно высокие защитные свойства [27]. В частности, был разработан коммерческий разбавитель на основе соевого лецитина AndroMed® (Minitübe GmbH) для криоконсервации спермы крупного рогатого скота.

С учетом того, что соевый лецитин безопаснее яичного желтка, так как риск микробного заражения значительно ниже, он также широко используется в качестве альтернативы яичному желтку в разбавителях спермы барана. Улучшение подвижности, жизнеспособности и целостности мембран спермиев отмечалось в концентрациях сои в диапазоне 1–1,5%. Показано, что 1%-ное содержание соевого лецитина в составе экстендера оказывает схожее влияние на качество спермиев после размораживания, как и 20%-ное содержание желтка куриного яйца [27].

Целью настоящего исследования являлась сравнительная оценка основных качественных параметров спермиев баранов после размораживания, обработанных с использованием двух коммерческих разбавителей спермы (OvixCell® и AndroMed®) и разбавителя на основе TRIS с желтком куриного яйца.

### **Методика исследований**

Эксперименты проводились в осенний период (сентябрь). Сперма была собрана от пяти клинически здоровых баранов породы джалгинский меринос в возрасте от 18 до 36 мес. Бараны содержались в СПК «Племзавод Вторая пятилетка» Ипатовского района Ставропольского края (45°43'8" северной широты, 285 м над уровнем моря, среднегодовое количество осадков – 500 мм). Среднесуточная температура в дни получения спермы составила 14,6°C, средняя влажность – 68,1%.

Все животные содержались в одинаковых условиях с одинаковым рационом стойлового кормления и ежедневным выпасом на пастбище.

Сперму собирали один раз в два дня в утренние часы с помощью искусственной вагины (40–42°C). В качестве подставного животного при получении спермы использовали овцу в охоте, которую фиксировали в специальном станке. Продолжительность времени на получение эякулятов от 5 баранов составляла менее 20 мин и варьировала от 10 до 18 мин.

Объем эякулированной спермы с точностью до 0,1 мл регистрировали сразу после сбора с помощью стеклянного градуированного семяприемника. Концентрация спермиев определялась прямым подсчетом половых клеток в счетной камере Горяева, для чего сперму предварительно разбавляли 3%-ным раствором хлористого

натрия (1:200) в эритроцитарном смесителе. Оценка прогрессивной подвижности спермиев производилась под световым микроскопом по шкале от 0 до 10 баллов, где ноль соответствовал отсутствию подвижности, а 10 баллов – 100%-ной подвижности.

Сперма с низкой прогрессивной подвижностью была исключена из обработки. Пригодная для дальнейшей обработки сперма (подвижность – не менее 8 баллов, концентрация – не менее 2,5 млрд/мл, объем – не менее 0,8 мл) смешивалась и определялась как образец спермы.

Каждый образец спермы впоследствии разделялся на три равные пробы, которые разбавлялись испытуемыми разбавителями в соотношении 1:3 (1 объемная часть нативной спермы и 3 объемные части соответствующего разбавителя).

Первая проба была разбавлена разбавителем, не содержащим желток куриного яйца (OviCell® производства IMV Technologies, L'Aigle, Франция), вторая часть была разбавлена безжелтковым фосфолипидным разбавителем спермы (AndroMed® производства Minitube GmbH, Тифенбах, Германия), подготовленных в соответствии с прилагаемыми инструкциями по применению. Третья часть спермы разбавлялась модифицированным экстендером на основе TRIS с нативным желтком куриного яйца.

Разбавленные образцы спермы расфасовывались в пайетты объемом 0,25 мл при помощи автоматического фасователя с ультразвуковым запаиванием соломинок (MRS1 DUAL, IMV Technologies, L'Aigle, Франция). Далее расфасованную сперму эквilibрировали (уравновешивали) в течение 180 мин при 4°C. После уравновешивания соломинки замораживались в парах жидкого азота ( $T = -85...95^{\circ}\text{C}$ ), для чего их помещали в морозильную камеру специальной конструкции, позволяющей установить и регулировать расстояние между соломинками и поверхностью жидкого азота. При этом 1-я фаза охлаждения длилась в течение 3 мин на расстоянии 15 см от криоагента, 2-я фаза – 5 мин на расстоянии 9,0 см, 3-я фаза – 6 мин на расстоянии 5 см, 4-я фаза – 8 мин на расстоянии 2,0 см. Эта скорость охлаждения и витрификации соответствует предложенной Gil et al. (2000) [17] четырехфазной кривой заморозания. Соответственно полный процесс замораживания в парах жидкого азота длился в течение 22 мин, после чего соломинки помещались в гоблеты и опускались в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Для оттаивания соломинки помещались на 30 с в специальный оттаиватель СИТО (IMV) при  $T = 38,0^{\circ}\text{C}$ . Размороженную сперму из каждой соломинки смешивали с 0,5 мл предварительно подогретого до  $35^{\circ}\text{C}$  физиологического раствора с pH 7,0 и инкубировали в термостате в течение нескольких часов.

Оценка подвижности (в баллах, по 10-балльной шкале) спермиев проводилась под световым микроскопом при увеличении  $\times 100...200$  несколько раз: сразу после оттаивания, через 2, 4 и 6 ч.

Одновременно оценка некоторых показателей спермы проводилась с помощью системы CASA (SCA® Production v. 5.3.; MICROPTIC S.L., Барселона, Испания) с фазовым контрастным микроскопом Eclipse E200 (Nicon, Токио, Япония) при 200–300-кратном увеличении. Процесс измерения включал в себя оценку не менее пяти полей зрения.

Измерялись следующие кинематические параметры спермиев: общая (суммарная) подвижность (total motility, TM, %), прогрессивная подвижность (progressive motility, PM, %), криволинейная скорость (curvilinear velocity, VCL; мкм s-1), прямая скорость (straight-line velocity, VSL, мкм s-1), средняя скорость траектории (velocity path average, VAP, мкм s-1), линейность (linearity, LIN, %), прямолинейность (straightness, STR, %) и колебания (wobble, WOB, %).

Подвижность спермы оценивали сразу после оттаивания (время 0) и после 2, 4, 6 ч инкубации при  $38^{\circ}\text{C}$ .

Биометрическую обработку проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Office и BIOSTAT. На основе средних значений и стандартных ошибок вычисляли достоверность разности средних величин с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Влияние разбавителя на подвижность спермиев баранов сразу после оттаивания и во время инкубации представлено в таблице 1.

Таблица 1

#### Подвижность спермиев, замороженных в разных экстендерах

| № п/п | Экстендер | Подвижность после оттаивания, ч/баллы, М±м |         |         |         |
|-------|-----------|--|---------|---------|---------|
|       |           | 0  | 2       | 4       | 6       |
| 1     | AndroMed® | 4,6±0,3                                    | 3,5±0,7 | 3,0±0,6 | 1,8±0,4 |
| 2     | OvixCell® | 4,6±0,7                                    | 4,0±0,5 | 3,2±0,4 | 2,1±0,5 |
| 3     | TRIS      | 4,8±0,6                                    | 4,2±0,4 | 3,7±0,5 | 2,8±0,6 |

Как следует из таблицы, сразу после размораживания соломинок (время – 0) достоверные различия по подвижности между тремя экстендерами не выявлены. Однако через 2 ч инкубации достоверно более высокая подвижность спермиев наблюдалась в среде на основе TRIS с яичным желтком ( $P < 0,05$ ). Это преимущество сохранилось после 4-часовой инкубации, а к концу культивирования (+6 ч) достоверность разницы повысилась ( $P < 0,01$ ).

Таким образом, сперма барана, замороженная в среде с яичным желтком, сохраняла лучшую подвижность, чем в безжелточных экстендерах, что позволяет прогнозировать ее более высокую биологическую полноценность.

Анализ спермы на количество спермиев с неповрежденной акросомальной мембраной после криоконсервации в разных разбавителях и оттаивания показал результаты, отраженные в таблице 2.

Таблица 2

#### Процент спермиев без структурных повреждений после криоконсервации в разных разбавителях

| № п/п | Этап исследования спермы | Спермиев без повреждений, % |           |             |
|-------|--------------------------|-----------------------------|-----------|-------------|
|       |                          | AndroMed®                   | OvixCell® | TRIS        |
| 1     | после оттаивания         | 33,6±0,08                   | 35,2±0,16 | 42,1±0,67** |
| 2     | через 2 ч                | 27,5±0,09                   | 30,4±0,13 | 38,3±0,89** |
| 3     | через 4 ч                | 21,8±0,12                   | 24,3±0,38 | 33,2±0,47** |
| 4     | через 6 ч                | 14,2±0,38                   | 16,5±0,78 | 22,3±0,66*  |

По характеру и степени повреждений в основном наблюдались набухание акросомы и ее отслоение, потеря акросомы, потеря головки.

Как видим, желточная среда достоверно лучше ( $P < 0,01$ ) защищает спермии от негативного воздействия ультранизких температур, чем безжелтковые экстендеры. При этом лучшие защитные свойства сохраняются и после инкубации оттаянной спермы в течение 6 ч.

Параллельная оценка некоторых показателей спермы с помощью системы CASA показала, что сразу после размораживания соломинок, так же, как и при традиционной оценке, достоверные различия по подвижности между тремя экстендерами не установлены. При оценке спустя 2 ч после оттаивания для разбавителя, содержащего яичный желток (на основе TRIS), были установлены более высокие результаты по некоторым исследуемым признакам по сравнению с фосфолипидными разбавителями (AndroMed®, OvixCell®). Так, показатель общей подвижности (TM) оставался практически одинаковым во всех исследуемых разбавителях. В то же время в сперме, разбавленной в экстендере с добавлением яичного желтка, показатель прогрессивной подвижности (PM) был выше на 6%, чем OvixCell®, и на 8% выше, чем в AndroMed®. Прямая скорость (VSL) была более высокой и достигала 5,6 мкм s-1 (в AndroMed® она составляла 4,7 мкм s-1,  $P < 0,05$ , а в OvixCell® – 5,2 мкм s-1,  $P < 0,05$ ). Показатель средней скорости траектории (VAP) спермиев также был наибольшим (6,9 мкм s-1) в желтковом экстендере, чем в фосфолипидных средах ( $P < 0,05$ ).

При оценке спермы спустя 6 ч после оттаивания численно более высокие характеристики некоторых параметров спермиев (TM +24%, PM +18%, LIN + 8,1%) были установлены для соломинок, замороженных в экстендере, содержащем яичный желток, в то время как некоторые параметры спермиев были выше в фосфолипидных разбавителях. Так, в сперме, замороженной в OvixCell®, показатель криволинейной скорости (VCL) был выше на 2,8 мкм s-1, а в сперме с колебательными движениями (WOB) – больше на 12,3%, чем в желтковом разбавителе. В другом экстендере на основе фосфолипидов AndroMed® эти показатели были еще хуже: VCL выше на 3,1 мкм s-1, а WOB – больше на 14,2%.

Низкая устойчивость спермы баранов, в первую очередь жизнеспособности и подвижности, к факторам внешней среды была установлена еще в первой половине прошлого века. Было выявлено, что резкое снижение температуры с 37°C (температура тела) до 0°C приводит к «холодовому удару», результатом чего является необратимая потеря подвижности спермиев. При этом было установлено, что основным местом повреждения при холодовом ударе является плазматическая мембрана спермиев. Впоследствии выяснили, что желток куриного яйца является мощным защитным средством от холодного удара [7]. Еще позднее выяснили, что яичный желток является непроницающим криопротектором в отличие от глицерина, который также защищает клетки от криодеструкции, но, как трехатомный спирт, легко проникает в клетку и является проникающим криопротектором [30].

Криопротективный механизм куриного желтка и криопротективный механизм глицерина различаются. Если глицерин проникает в клетку и, связывая воду, предотвращает внутриклеточное образование кристаллов льда, то защитные свойства желтка основаны на ингибировании роста кристаллов льда за пределами клеток [16]. Доказано, что в структурном отношении куриный желток представляет собой сложную систему, состоящую из нерастворимых белковых агрегатов (гранул) во взвешенном состоянии в прозрачной желтой жидкости (плазме) [4]. Плазма, составляющая около 78% сухого вещества желтка, состоит из липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), которые в составе экстендера способны прилипать к клеточной мембране и заменять



поврежденные при криоконсервировании фосфолипиды [12, 34, 38]. Более того, установлено, что липопротеины низкой плотности снижают деструктивную активность белков плазмы спермы (в частности, быка [26]) за счет быстрого и стабильного формирования комплекса на основе заряда между ЛПНП и БСП.

Гранулы, составляющие незначительную часть сухого вещества желтка, в основном состоят из липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Они вызывают выход холестерина из плазменной мембраны спермиев, что повышает чувствительность к холодному шоку. Кроме того, ЛПВП в яичном желтке индуцирует преждевременную капацитацию спермиев и последующую реакцию акросомы.

Установлено также, что лецитин яичного желтка является источником энергии для спермиев в отсутствие окисляемых растворимых углеводов. Однако это свойство не имеет большого практического значения, так как большинство широко распространенных экстендеров содержит в своем составе углеводы [41].

Как результат, с момента открытия № 103 о способности спермиев переносить глубокое замораживание желток куриного яйца использовался в качестве обязательного компонента в протоколах криоконсервации спермы всех видов животных, включая сперму барана, благодаря своей эффективной способности противодействовать холодному удару и криопротективной способности. Однако в процессе развития исследований были выяснены некоторые негативные свойства куриного желтка. Так, ввиду индивидуальных различий в качестве, присущих яичному желтку в связи с происхождением, количеством дней после откладки и сроком хранения, невозможно приготовить разбавители спермы на основе яичного желтка, соответствующие каким-либо межлабораторным стандартам качества [14]. Далее: использование яичного желтка связано с рисками инсеминации экстендера, что может привести к ухудшению качества спермы, связанному с выработкой вредных метаболитов и токсинов, к снижению дыхания и подвижности спермиев и соответственно снижению оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы [1, 8].

Большая вязкость и присутствие твердых частиц в разбавителях спермы, обусловленные глобулами яичного желтка, могут быть причиной снижения оплодотворяемости, а также препятствуют микроскопической оценке образца [10]. Желток может индуцировать нежелательную агглютинацию спермиев [27]. Сообщается о том, что разбавители, содержащие животные белки, могут оказывать неблагоприятное воздействие на биохимические исследования полипептидов, полученных из замороженных-размороженных спермиев, и приводить к необъективным результатам [20]. Поэтому повсеместно в среде исследователей распространяется мнение о замене натурального желтка куриного яйца другим криопротектором.

Интересная информация получена в исследовании Kulaksiz et al. (2010), которое было направлено на определение влияния различных видов яичного желтка на сперме барана, криоконсервированной в экстендере TRIS, содержащей 15% желтка яйца и 5% глицерина. В эксперименте использовался желток яйца домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*), гуся (*Anatidae anser*), индейки (*Meleagris gallopavo*), утки (*Anatidae anas platyrhynchos*), японского перепела (*Coturnix japonica*). Наиболее важным выводом стало то, что в замороженной-оттаянной сперме барана более высокое качество было зарегистрировано в разбавителе с куриным желтком по сравнению с другими протестированными яичными желтками [23].

Было установлено, что вредные для спермиев липопротеины высокой плотности удаляются из яичного желтка путем центрифугирования при G 10 000 за 30 мин. Метод удаления ЛПВН («Осветление яичного желтка») был разработан для экстендера для спермы быка [30], оленя [13], газели [21], жеребца [16, 31]. Однако полностью исключить проблему негативного влияния натурального желтка не удалось [4].

Сообщается, что высушивание яичного желтка и добавление лиофилизата в модифицированный разбавитель дают аналогичный криопротекторный эффект по сравнению с разбавителем на основе яичного желтка [2]. Однако сравнительный анализ натуральных и лиофилизированных ЛППП показал преимущества натуральных липопротеинов – в частности, для сохранения общей и прогрессивной подвижности спермиев барана [27].

Попытки применения биологически более безопасных компонентов (казеин, пальмовое или кокосовое масло) в качестве альтернативы яичному желтку в процессе замораживания спермы барана не привели к положительным результатам. Все они обладали более низкими протективными свойствами, чем куриный желток [9].

Разбавитель на основе соевого лецитина AndroMed® (Minitübe GmbH) был первоначально разработан для криоконсервации спермы крупного рогатого скота. Этот коммерчески доступный разбавитель спермы содержит высокое содержание фосфолипидов, похожих на яичный желток (главным образом – фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола). В целом соевый лецитин состоит не только из смеси фосфолипидов, но и из триглицеридов, жирных кислот, пигментов, стеролов, стерильных гликозидов и эфиров, токоферолов и углеводов [37]. Соевый лецитин недавно был признан химически определяемой беспатогенной альтернативой яичного желтка для успешного низкотемпературного хранения спермы барана [10, 14, 22, 39].

Несмотря на вышеупомянутые положительные свойства соевого лецитина, были отмечены его некоторые негативные эффекты: такие, как потеря мембранного потенциала митохондрий при сохранении подвижности, снижение функциональности спермиев, влияющее на их способность к оплодотворению. Сообщается о заметном снижении скорости образования бластоцисты *in vitro*, об уменьшении частоты беременности и эмбриональных потерь после обработки спермы баранов в коммерческих разбавителях на основе соевого лецитина [22].

Независимо от противоречивых результатов положительный эффект соевого лецитина был использован в индустрии разбавителей спермы.

Представляет определенный интерес установленный факт превосходства разбавителя спермы быков на основе соевого лецитина (BioXcell®) над другими разбавителями спермы быка (AndroMed®) также на основе соевого лецитина [22]. Возможно, это связано с биохимическим составом, не идентичным между двумя коммерческими разбавителями на основе соевого лецитина.

Hegedusova et al. (2012) сравнил коммерческие разбавители, не содержащие продуктов животного происхождения, и разбавители, содержащие продукты животного происхождения, для краткосрочного и долгосрочного хранения спермы барана. Обработанная сперма хранилась при температуре 16–18°C, а подвижность сперматозоидов оценивалась в 24, 48, 72 и 96 ч. Наилучшие показатели подвижности наблюдались в сперме, обработанной в разбавителях, содержащих продукты животного происхождения (яичный желток) [19].

Исследования Fukui et al. (2008) не выявили каких-либо существенных различий в уровне беременности овец, осемененных спермой, хранящейся в AndroMed, молоке и желточных разбавителях [14]. Другие исследователи (Gil et al., 2000) не выявили значимых различий в показателях беременности овец после их интрацервикального осеменения спермой, замороженной в молочном разбавителе, экстендерах с куриным желтком и BioXcell [17].

Некоторые авторы (Khalifa et al., 2013) после испытания в полевых условиях двух коммерческих разбавителей на основе соевого лецитина (AndroMed (Minitub, Tiefenbach, Германия) и BioXcell (IMV Technologies, L' Aigle, Франция) выяснили,



что BioXcell превосходит AndroMed в сохранении потенциала оплодотворения [14]. Однако эти результаты нельзя обобщать, так как они были получены не при традиционном цервикальном осеменении замороженной спермой, а при лапароскопической внутриматочной инсеминации.

Таким образом, результаты нашего исследования согласуются со многими результатами предыдущих исследований других авторов, подтверждающими положительное влияние яичного желтка при криоконсервации спермиев барана. Степень сохранности биологической полноценности криоспермы определяется не только абсолютными значениями кинематических характеристик спермиев сразу после оттаивания, но и динамикой деградации этих значений после инкубации [11].

В нашем исследовании было продемонстрировано более медленное ухудшение кинематических характеристик спермиев, криоконсервированных в разбавителе TRIS с нативным желтком куриного яйца, подтверждающее более высокие криопротекторные характеристики по сравнению с фирменными экстендерами, не содержащими желток. Эти данные либо совпадают [27], либо отличаются от тех, которые были получены в центрах коммерческого осеменения или специализированных исследовательских центрах, как в худшую [32, 35], так и в лучшую [40] стороны. Следует подчеркнуть, что в нашем исследовании использовался нативный желток куриного яйца, содержащий гранулы липопротеидов высокой плотности.

### Библиографический список

1. *Akhter S.* Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa / *S. Akhter, M.S. Ansari S.M.H. Andrabi B.A. Rakha, N. Ullah, M. Khalid* // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2012. – 47:815–819. Doi: 10.1111/j.1439–0531.2011.01973.x.
2. *Alcay S.* Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender / *S. Alcay, M.B. Toker, E. Gokce, B. Ustuner, N.T. Onder, H. Sagirkaya, Z. Nur, M.K. Soylu* // *Cryobiology*. – 2015. – 71:329–333.
3. *Ali A.B.T.* Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility in vitro / *A.B.T. Ali G. Bomboi, B. Floris* // *Small Ruminant Research*. – 2013. – 113: 405–410. Doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.01.017.
4. *Anton M.* Egg yolk. Structures, functionalities and processes // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2013. – 93: 2871–2880. Doi: 10.1002/jsfa.6247.
5. *Banday M.N.* Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation / *M.N., F.A. Lone, F. Rasool, M. Rashid, A. Shikari* // *Cryobiology*. – 2017. – 74: 25–30. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.12.008.
6. *Benhenia K.* Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen / *K. Benhenia, A. Lamara, S. Fatmi, M. Iguer-Ouada* // *Small Ruminant Research*. – 2016. – 141:29–35. Doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.06.009.
7. *Blackshaw A.W.* The prevention of temperature shock of bull and ram semen // *Australian Journal of Biological Sciences*. – 1954. – 7:573–582. Doi: 10.1071/B19540573.
8. *Cabrera F.* The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*) / *F. Cabrera, F. Gonzalez, M. Batista, P. Calero, A. Medrano, A. Gracia* // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2005. – 40:91–195. Doi: 10.1111/j.1439–0531.2005.00544.x.
9. *Del Valle I.* Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils / *I. Del Valle A. Souter W.M.C. Maxwell T. Muñio-Blanco J.A. Cebrián-Pérez* // *Animal Reproduction Science*. – 2013. – 138: 213–219.

10. *De Paz P.* Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen / *P. De Paz M.C. Estesó, M. Alvarez, M. Mata, C.A. Chamorro, L. Anel* // *Theriogenology*. – 2010. – 74:663–671. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.03.022.
11. *Dolezalova M.* Effect of different thawing methods on bull's semen characteristics / *M. Dolezalova, M. Ptacek, L. Stadnik, J. Duchacek* // *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. – 2017. – 65:815–822. Doi: 10.11118/actaun201765030815.
12. *El-Sisy G.A.* Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability / *G.A. El-Sisy W.S. El-Nattat R.I. El-Sheshtawy A.A.M. El-Maaty* // *Asian Pacific Journal of Reproduction*. – 2016. – 5:514–518. Doi: 10.1016/j.apjr.2016.10.011.
13. *Fernandez-Santos M.R.* Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate / *M.R. Fernandez-Santos M.C. Estesó, V. Montoro, A.J. Soler, J.J. Garde* // *Theriogenology*. – 2006. – 66:1931–1942. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.05.012.
14. *Fukui Y.* Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep / *Y. Fukui, H. Kohno, T. Togari, M. Hiwasa, K. Okabe* // *The Journal of Reproduction and Development*. – 2008. – 546: 286–289. Doi: 10.1262/jrd.20004.
15. *Fukui Y.* Factors affecting the fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen-thawed semen during the non-breeding season / *Y. Fukui, H. Kohno, K. Okabe, S. Katsuki, M. Yoshizawa, T. Togari, H. Watanabe* // *Journal of Reproduction and Development*. – 2010. – 56: 460–466. Doi: 10.1262/jrd.10–015T.
16. *Gharajelar S.N.* A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process / *S.N. Gharajelar, S.R.A. adrkhanloo, M. Onsori, A. Saberivand* // *Veterinary Research Forum*, 2016; 7:235–239.
17. *Gil J.* Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Bio-ciphos-Plus® and Triladyl® / *J. Gil, A. Januskauskas, M. Haard, A. Johannisson, L. Soderquist, H. Rodriguez-Martinez* // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2000. – 35:69–77. Doi: 10.1046/j.1439–0531.2000.00197.x.
18. *Gil J.* Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen / *J. Gil, N. Lundeheim, L. Soderquist, H. Rodriguez-Martinez* // *Theriogenology*. – 2003. – 59:1241–1255. Doi: 10.1016/S0093–691X(02)01177–9.
19. *Hegedusova Z.* Effect of different extenders on ram sperm traits during storage / *Z. Hegedusova, L. Stolc, F. Louda, L. Cunat, J. Vejnar* // *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. – 2012. – 60:111–116. Doi: 10.11118/actaun201260060111.
20. *Hinsch E.* Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders / *E. Hinsch, K.D. Hinsch, J.G. Boehm, W.B. Schill, F. Mueller-Schloesser* // *Reproduction in Domestic Animals*. – 1997. – 32: 143–149. Doi: 10.1111/j.1439–0531.1997.tb01272.x.
21. *Holt W.V.* Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme / *W.V. Holt, T. Abaigar, H.N. Jabbour* // *Reproduction, Fertility, and Development*. – 1996. – 8:1215–1222. Doi: 10.1071/RD9961215.
22. *Khalifa T.* Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen. A randomized double-blind parallel group design / *T. Khalifa, A. Lymberopoulos, E. Theodosiadou* // *Theriogenology*. – 2013. – 79: 517–527. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.009.
23. *Kulaksız, Recai.* The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen / *Recai Kulaksız, Çiğdem Çebi, Ergun*

- Akcaş, Ali Daskin* // Small Ruminant Research. – 2010. – 88(1):12–15. DOI:10.1016/j.smallrumres.2009.11.014.
24. *Ledesma A.* Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm / *A. Ledesma, E. Fernandez-Alegre A. Cano, F. Hozbor, F. Martinez Pastor A. Cesari* // Animal Reproduction Science. – 2016. – 173: 35–41. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.007.
25. *Мамонтова Т.В.* Сравнительная характеристика половой активности, уровня спермопродукции и устойчивости к криоконсервации спермы баранов различных пород / *Т.В. Мамонтова, М.М. Айбазов, М.С. Сеитов* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2018. – 1 (69). – С. 145–147.
26. *Manjunath P.* Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk / *P. Manjunath, V. Nauc, A. Bergeron, M. Menard* // Biology of Reproduction, 2002; 67:1250–1258. Doi: 10.1095/biolreprod67.4.1250.
27. *Masoudi R.* Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin / *R. Masoudi, M. Sharafi, A. Zareh Shahneh A. Towhidi, H. Kohram, V. Esmaili, A. Shahverdi., N. Dadashpour Davachi* // Cryobiology. – 2016. – 73:6972. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.05.010.
28. *Moustakas V.S.* Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen / *V.S. Moustakas, F.G. Zaffalon, M.A. Lagares, A.M. Loaiza-Eccheverri F.C. Varago, M.M. Neves, L.G.D. Heneine R.P. Arruda, M. Henry* // Theriogenology. – 2011. – 75: 300–307.
29. *Najafi A.* Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation / *A. Najafi, H. Daghig-Kia H.V. Dodaran, M. Mehdipour, M. AlvarezRodriguez* // Animal Reproduction Science. – 2017. – 177:35–41. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.12.004.
30. *Pace M.M.* Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing / *M.M. Pace, E.F. Graham* // Journal of Animal Science. – 1974. – 39:1144–1149. Doi: 10.2527/jas1974.3961144x.
31. *Pillet E.* Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders / *E. Pillet, G. Duchamp, F. Batellier, V. Beaumal, M. Anton, S. Desherces, E. Schmitt, M. Magistri-ni M.* // Theriogenology. – 2011. – 75:105–114. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.07.015.
32. *Pradiee J.* Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol and cysteine on postthawing quality and oxidative activity of ram sperm and on the viability of vitrified sheep embryos / *J Pradiee T.F. Cardoso, E.F. Silva, A.O. Goncalves G.D.A. Gastal C.E. Rosa, R.G. Mondadori, L.M.C. Pegoraro A.Д. Vieira, Jr.T. Lucia* // Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. – 2016. – 68: 1309–1315. Doi: 10.1590/1678–4162–8479.4.
33. *Rather H.A.* Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4°C / *H.A. Rather, R. Islam, A.A. Malik, F.A. Lone* // Small Ruminant Research. – 2016. – 141: 24–28. Doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.06.007.
34. *Rehman F.* Semen extenders and artificial insemination in ruminants / *F. Rehman, C. Zhao, M.A. Shah, M.S. Qureshi, X. Wang* // Veterinaria. – 2013. – 1:1–8.
35. *Saieed A.Y.* Effect of sucrose and omega-3 after cryopreservation of ram sperm / *A.Y. Saieed, A.A. Hobi M.B.M.R. Fakhridin A.A. Al-Ani* // International Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries. – 2016. – 4:11–16.
36. *Salmon V.M.* Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryo-resistance in skim milk-extender / *V.M. Salmon, F. Castonguay, V. Demers-Caron P. Leclerc, J.L. Bailey* // Animal Reproduction Science. – 2017. – 177:1–11. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.11.011.
37. *Scholfield C.R.* Composition of soybean lecithin // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1981. – 58: 889–892. Doi: 10.1007/BF02659652.

38. *Simonik O.* Effect of low-density lipoprotein addition to soybean lecithin-based extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing – preliminary results / *O. Simonik, R. Rajmon, L. Stadnik, J. Sichtar, J. Beran, J. Duchacek, P. Hodek, P. Trefil* // Czech Journal of Animal Science. – 2016. – 61:560–567. Doi: 10.17221/27/2016-CJAS.
39. *Snoeck P.P.N.* Effect of storage conditions on the LDL effectiveness in ovine sperm cryopreservation / *P.P.N. Snoeck L.C.O. Moura M.C. Silva, M. Machado-Neves M.I.V. Melo L.G.D. Heneine M. Henry* // Cryobiology. – 2017. – 75:88–90. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.01.007.
40. *Souza H.M.* The effect of canthaxanthin on the quality of frozen ram spermatozoa / *H.M. Souza, L.C. Arruda, M.M. Monteiro, I.H. Nery, R.A. Araujo Silva A.M. Batista M.M.P. Guerra* // Biopreservation and Biobanking. – 2017. – 15:220–227. Doi: 10.1089/bio.2016.0049.
41. *Van Tran L.* Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction – a review / *L. Van Tran B.A. Malla, S. Kumar, A.K. Tyagi* // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. – 2017. – 30: 622–637. Doi: 10.5713/ajas.15.1034.

## COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF RAM SEMEN FROZEN IN DIFFERENT EXTENDERS

M.M. AYBAZOV<sup>1</sup>, A.N. SHEVCHENKO<sup>2</sup>, M.I. SELIONOVA<sup>3</sup>, T.V. MAMONTOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>North Caucasus Federal Agricultural Research Centre;

<sup>2</sup>Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin;

<sup>3</sup>Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

*Numerous studies have proved the necessity of egg yolk in synthetic media to dilute semen before its cryopreservation. However, at the same time, it has been demonstrated that its use can adversely affect the quality of frozen-thawed sperm. The present study compares the main quality parameters of ram sperm frozen using TRIS-based diluent with egg yolk and two egg yolk-free diluents (OvixCell® and AndroMed®).*

*A slower deterioration in the kinematic performance of sperm cryopreserved in TRIS diluent with native egg yolk confirmed higher cryoprotective performance compared to commercial extenders containing no egg yolk. Significantly higher total and progressive motility was observed in TRIS-based medium with egg yolk ( $P < 0.05$ ). This advantage was maintained after four hours of incubation and became more significant at the end of cultivation (after six hours) ( $P < 0.01$ ). Thus, ram sperm frozen in egg yolk medium retained better motility than in egg yolk-free extenders, which allows predicting its higher bioavailability. Assessment of some semen parameters using CASA showed that there were no significant differences in motility between the three extenders immediately after thawing the straws. When assessed two hours after thawing, a diluent containing egg yolk (TRIS-based) was found to have higher results for some of the examined traits than phospholipid diluents.*

**Key words:** ram, semen, diluents, cryopreservation, quality.

## References

1. *Akhter S., Ansari M.S., Andrabi S.M.H., Rakha B.A., Ullah N., Khalid M.* Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47: 815–819. doi: 10.1111/j.1439–0531.2011.01973.x

2. *Alcay S., Toker M.B., Gokce E., Ustuner B., Onder N.T., Sagirkaya H., Nur Z., Soylu M.K.* Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*. 2015; 71: 329–333.
3. *Ali A.B.T., Bomboi G., Floris B.* Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility in vitro. *Small Ruminant Research*. 2013; 113: 405–410. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.01.017
4. *Anton M.* Egg yolk. Structures, functionalities and processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013; 93: 2871–2880. doi: 10.1002/jsfa.6247
5. *Banday M.N., Lone F.A., Rasool F., Rashid M., Shikari A.* Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*. 2017; 74: 25–30. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.12.008
6. *Benhenia K., Lamara A., Fatmi S., Iguer-Ouada M.* Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Ruminant Research*. 2016; 141: 29–35. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.06.009
7. *Blackshaw A.W.* The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Australian Journal of Biological Sciences*. 1954; 7: 573–582. doi: 10.1071/BI9540573
8. *Cabrera F., Gonzalez F., Batista M., Calero P., Medrano A., Gracia A.* The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction in Domestic Animals*. 2005; 40: 91–195. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00544.x
9. *Del Valle I., Souter A., Maxwell W.M.C., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A.* Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*. 2013; 138: 213–219.
10. *de Paz P., Estes M.C., Alvarez M., Mata M., Chamorro C.A., Anel L.* Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*. 2010; 74: 663–671. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.03.022
11. *Dolezalova M., Ptacek M., Stadnik L., Duchacek J.* Effect of different thawing methods on bull's semen characteristics. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2017; 65: 815–822. doi: 10.11118/actaun201765030815
12. *El-Sisy G.A., El-Nattat W.S., El-Sheshtawy R.I., El-Maaty A.A.M.* Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2016; 5: 514–518. doi: 10.1016/j.apjr.2016.10.011
13. *Fernandez-Santos M.R., Estes M.C., Montoro V., Soler A.J., Garde J.J.* Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology*. 2006; 66: 1931–1942. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.05.012.
14. *Fukui Y., Kohno H., Togari T., Hiwasa M., Okabe K.* Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *The Journal of Reproduction and Development*. 2008; 546: 286–289. doi: 10.1262/jrd.20004
15. *Fukui Y., Kohno H., Okabe K., Katsuki S., Yoshizawa M., Togari T., Watanabe H.* Factors affecting the fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen-thawed semen during the non-breeding season. *Journal of Reproduction and Development*. 2010; 56: 460–466. doi: 10.1262/jrd.10-015T
16. *Gharajelar S.N., Sadrkhanloo R.A., Onsoni M., Saberivand A.* A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Veterinary Research Forum*. 2016; 7: 235–239.
17. *Gil J., Januskauskas A., Haard M., Johannisson A., Soderquist L., Rodriguez-Martinez H.* Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended



- in Biociphos-Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animals*. 2000; 35: 69–77. doi: 10.1046/j.1439–0531.2000.00197.x.
18. *Gil J., Lundeheim N., Soderquist L., Rodriguez-Martinez H.* Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 2003; 59: 1241–1255. doi: 10.1016/S0093–691X(02)01177–9
19. *Hegedusova Z., Stolc L., Louda F., Cunat L., Vejnar J.* Effect of different extenders on ram sperm traits during storage. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2012; 60: 111–116. doi: 10.11118/actaun201260060111
20. *Hinsch E., Hinsch K.D., Boehm J.G., Schill W.B., Mueller-Schloesser F.* Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. *Reproduction in Domestic Animal*. 1997; 32: 143–149. doi: 10.1111/j.1439–0531.1997.tb01272.x
21. *Holt W.V., Abaigar T., Jabbour H.N.* Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reproduction, Fertility, and Development*. 1996; 8: 1215–1222. doi: 10.1071/RD9961215
22. *Khalifa T., Lymberopoulos A., Theodosiadou E.* Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen. A randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology*. 2013; 79: 517–527. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.009
23. *Kulaksız Recai, Çebi Çiğdem, Akcay Ergun, Daskin Ali.* The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research*. 2010; 88 (1): 12–15 DOI:10.1016/j.smallrumres.2009.11.014
24. *Ledesma A., Fernandez-Alegre E., Cano A., Hozbor F., Martinez Pastor F., Cesari A.* Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal Reproduction Science*. 2016; 173: 35–41. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.007
25. *Mamontova T.V., Aybazov M.M., Seitov M.S.* Sravnitel'naya kharakteristika polovoy aktivnosti, urovnya spermoproduktsii i ustoychivosti k kriokonservatsii spermy baranov razlichnykh porod [Comparative characteristics of sexual activity, the level of sperm production and resistance to cryopreservation of sheep sperm of different breeds]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2018; 1 (69): 145–147. (In Rus.)
26. *Manjunath P., Nauc V., Bergeron A., Menard M.* Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*. 2002; 67: 1250–1258. doi: 10.1095/biolreprod67.4.1250
27. *Masoudi R., Sharafi M., Zareh Shahneh A., Towhidi A., Kohram H., Esmaeili V., Shahverdi A., Dadashpour Davachi N.* Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*. 2016; 73: 69–72. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.05.010
28. *Moustacas V.S., Zaffalon F.G., Lagares M.A., Loaiza-Eccheverri A.M., Varago F.C., Neves M.M., Heneine L.G.D., Arruda R.P., Henry M.* Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 2011; 75: 300–307.
29. *Najafi A., Daghigh-Kia H., Dodaran H.V., Mehdipour M., AlvarezRodriguez M.* Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 2017; 177: 35–41. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.12.004
30. *Pace M.M., Graham E.F.* Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*. 1974; 39: 1144–1149. doi: 10.2527/jas1974.3961144x



31. Pillet E., Duchamp G., Batellier F., Beaumal V., Anton M., Desherces S., Schmitt E., Magistrini M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*. 2011; 75: 105–114. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.07.015
32. Pradiee J., Cardoso T.F., Silva E.F., Goncalves A.O., Gastal G.D.A., Rosa C.E., Mondadori R.G., Pegoraro L.M.C., Vieira A.D., Lucia Jr.T. Effect of  $\beta$ -mercaptoetanol and cysteine on postthawing quality and oxidative activity of ram sperm and on the viability of vitrified sheep embryos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2016; 68: 1309–1315. doi: 10.1590/1678–4162–8479.4
33. Rather H.A., Islam R., Malik A.A., Lone F.A. Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4°C. *Small Ruminant Research*. 2016; 141: 24–28. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.06.007
34. Rehman F., Zhao C., Shah M.A., Qureshi M.S., Wang X. Semen extenders and artificial insemination in ruminants. *Veterinaria*. 2013; 1: 1–8.
35. Saieed A.Y., Hobi A.A., Fakhridin M.B.M.R., Al-Ani A.A. Effect of sucrose and omega-3 after cryopreservation of ram sperm // *International Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries*. 2016; 4: 11–16.
36. Salmon V.M., Castonguay F., Demers-Caron V., Leclerc P., Bailey J.L. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*. 2017; 177: 1–11. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.11.011
37. Scholfield C.R. Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Societ.*, 1981; 58: 889–892. doi: 10.1007/BF02659652
38. Simonik O., Rajmon R., Stadnik L., Sichtar J., Beran J., Duchacek J., Hodek P., Trefil P. Effect of low-density lipoprotein addition to soybean lecithin-based extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing – preliminary results. *Czech Journal of Animal Science*. 2016; 61: 560–567. doi: 10.17221/27/2016-CJAS
39. Snoeck P.P.N., Moura L.C.O., Silva M.C., Machado-Neves M., Melo M.I.V., Heineine L.G.D., Henry M. Effect of storage conditions on the LDL effectiveness in ovine sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 2017; 75: 88–90. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.01.007
40. Souza H.M., Arruda L.C., Monteiro M.M., Nery I.H., Araujo Silva R.A., Batista A.M., Guerra M.M.P. The effect of canthaxanthin on the quality of frozen ram spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*. 2017; 15: 220–227. doi: 10.1089/bio.2016.0049
41. van Tran L., Malla B.A., Kumar S., Tyagi A.K. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction – a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2017; 30: 622–637. doi: 10.5713/ajas.15.1034

**Айбазов Али-Магомет Муссаевич**, д-р с.-х. наук, профессор, главный научный сотрудник, Всероссийский НИИ овцеводства и козоводства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр» (355004, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 15; e-mail: velikii-1@yandex.ru; тел.: (8652) 71–95–59).

**Шевченко Александр Николаевич**, канд. вет. наук, декан факультета ветеринарной медицины, Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина (350044, Российская Федерация, г. Краснодар; ул. Калинина, 13; e-mail: veterinary@kubsau.ru; тел.: (918) 175–26–15).

**Селионова Марина Ивановна**, д-р биол. наук, профессор РАН, зав. кафедрой разведения, генетики и биотехнологии животных, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: selionova@rgau-msha.ru; тел.: (968) 266–33–03).

**Мамонтова Татьяна Васильевна**, канд. с.-х. наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский НИИ овцеводства и козоводства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр» (355004, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 15; e-mail: mamontova.vniiook@gmail.com; тел.: (928) 318–96–33).

**Ali-Magomet M. Aybazov**, Dsc (Ag), Professor, Chief Research Associate, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Husbandry, North Caucasus Federal Agricultural Research Center (15 Zootekhnicheskij lane, Stavropol (355004, Russian Federation; phone: (86553) 2–32–97; E-mail: info@fnac.center).

**Alexandr N. Shevchenko**, PhD (Vet), Dean of the Department of Veterinary Medicine, Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin (13 Kalinina street, Krasnodar (350044, Russian Federation; phone: (918) 175–26–15; E-mail: veterinary@kubsau.ru).

**Marina I. Selionova**, Dsc (Bio), RAS Professor, Head of the Breeding Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str, Moscow (127550, Russian Federation; phone: (499) 976–34–90; E-mail: priem@rgau-msha.ru).

**Tatyana V. Mamontova**, PhD (Ag), Key Research Associate, All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Husbandry, North Caucasus Federal Agrarian Research Centre (15 Zootekhnicheskij lane, Stavropol (355004, Russian Federation; phone: (928) 318–96–33; E-mail: mamontova.vniiook@gmail.com).