

Е. А. Корочкина, А. И. Мороз

Значение разбавителей спермы разных видов сельскохозяйственных животных в процессе ее криоконсервации

Аннотация.

Цель: систематизирование и анализ научной информации о разбавителях спермы сельскохозяйственных животных в процессе ее криоконсервации с учетом видовых особенностей.

Вспомогательные репродуктивные технологии на данный момент являются крайне востребованными в животноводстве, особенно это касается искусственного осеменения. Однако данная технология имеет приоритетное значение только в том случае, если сперма хранится в течение длительного периода, то есть криоконсервируется.

Многочисленными исследованиями установлено, что процесс криоконсервации вызывает неблагоприятные изменения в половых клетках, что приводит к их повреждению или полной гибели, происходит частично необратимое повреждение морфологических структур клеток. Соответственно, для получения высоких результатов от использования заморожено-оттаянной спермы необходимо предотвратить повреждение сперматозоидов. В связи с этим актуальным является использование сред-разбавителей.

У каждого вида животных сперма имеет свои отличительные характеристики: объем, концентрация, химический состав, осмотическое давление, pH среды и т.д. По этой причине трудно разработать универсальный разбавитель семени, подходящий для каждого вида животного.

Ключевые слова: сперма; разбавители; криоконсервация; сельскохозяйственные животные; видовые особенности.

Авторы:

Корочкина Елена Александровна – кандидат ветеринарных наук; e-mail: e.kora@mail.ru;

Мороз Александра Игоревна – аспирант; e-mail: sashamoroz.shuramoroz@mail.ru.

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины; 196084, Россия, Санкт-Петербург, Черниговская ул., 5.

Введение. Поддержание стабильного уровня численности любой популяции, в первую очередь, зависит от успешности процессов размножения внутри нее. К сожалению, естественное осеменение не всегда реализует потребность в получении необходимого количества потомства для обеспечения баланса численного состава вида. Вспомогательные репродуктивные технологии позволяют, во-первых, увеличивать выход потомства, а во-вторых, получать его даже от животных с патологиями репродуктивной системы. Однако все вспомогательные репродуктивные технологии в рамках их реализации требуют генетического материала: сперматозоидов и/или яйцеклеток.

Свежеполученные половые клетки, как известно, дают более высокую вероятность оплодотворения в сравнении с замороженными клетками. Тем не менее ветеринарные специалисты зачастую лишены возможности работать со свежеполученными гаметами. Так, например, для искусственного осеменения чаще используют замороженное семя ввиду географического распо-

ложения самца и самки или экономической эффективности. Также криоконсервации подвергаются половые клетки животных, находящихся под угрозой исчезновения. Так, при возможности использования технологии криоконсервации в XVII-XVIII веках такие виды животных как кавказский зубр, тур, тарпан, голубая антилопа были бы сохранены.

Однако впервые криоконсервация сперматозоидов млекопитающих была осуществлена в 1949 году группой ученых под руководством К. Полджу и О. Смита, в качестве криопротектора применивших глицерол [1]. С тех пор использовались различные среды для разбавления семени. Но несмотря на более чем полувековую историю криоконсервации вопрос о разбавителях остается не до конца разрешенным.

Разбавитель семени есть не что иное, как вещество, добавляемое в эякулят для увеличения его объема, снижения плотности сперматозоидов, а самое главное — для сохранения жизнеспособности сперматозоидов, находящихся вне

придатков семенников.

Многочисленными исследованиями установлено, что процесс криоконсервации вызывает неблагоприятные изменения в половых клетках, что приводит к их повреждению или полной гибели, происходит частично необратимое повреждение морфологических структур клеток, их органелл и надмембранного комплекса, а также ряд нарушений биохимических реакций. Все перечисленные метаморфозы в сперматозоиде, связанные с метилированием ДНК, дефектом протамина и нарушением клеточных параметров, включая целостность мембран, стабильность ДНК и митохондриальную активность, являются причинами снижения подвижности и фертильности сперматозоидов при замораживании/оттаивании [2]. Соответственно, для получения высоких результатов от использования заморожено-оттаянной спермы необходимо предотвратить повреждение сперматозоидов. В связи с этим актуальным является использование сред-разбавителей.

Целью нашей работы являлось систематизирование и анализ научной информации о значении разбавителей спермы сельскохозяйственных животных в процессе ее криоконсервации с учетом видовых особенностей.

Характеристика разбавителей спермы. У каждого вида животных сперма имеет свои отличительные характеристики: объем, концентрация, химический состав, осмотическое давление, pH среды и т.д. По этой причине трудно разработать универсальный разбавитель семени, подходящий для каждого вида животного.

Однако при составлении разбавителей спермы животных все же стараются придерживаться определенного стандарта состава. Традиционно разбавители спермы включают: антибактериальные компоненты, мембранопротективные компоненты (молочный протеин, яичный желток и др.), криопротективные компоненты (например, глицерол), экстрацеллюлярные агенты (протеины, сахара и др.), буфер и цитрат pH буфер [3].

Так сперматозоиды быка в норме включают аминокислоты в свои белки, содержание ДНК в них составляет $3-4 \times 10^{-9}$ мг/клетка, содержание РНК варьируется в пределах $0-0,15 \times 10^{-9}$ мг/клетка. Сухой вес сперматозоида составляет $16-5 \times 10^{-9}$ мг, из которых $3-38 \times 10^{-9}$ мг приходится на дезоксирибонуклеиновую кислоту [4].

С учетом состава спермы быка было создано значительное количество разбавителей для данного вида. Одним из разбавителей, широко используемых в последнее время, является плазма каудального придатка семенника (СЕР-2). Пре-

восходство СЕР-2, включая композиции, состоит из ионов и осмолярности, которая напоминает состав семенной плазмы в придатке семенника. Это состояние может поддерживать качество сперматозоидов, подвижность и целостность мембран половых клеток.

Другими разработанными искусственными средами являются AndroMed® (на основе соевого лецитина), Optidyl® (с добавлением ионизированного яичного желтка) и BULLXcell® (с добавлением свежего яичного желтка). Самые высокие средние значения общей подвижности и жизнеспособности сперматозоидов показывает использование разбавителя BULLXcell® (44,33 %; 52,06%). Различия в сравнении этого разбавителя с Optidyl® и AndroMed® составили -0,83 %, -2,64 %, -8,33 %, -9,51 % [5].

В статье I. Darussalam¹, R. I. Arifiantini, I. Supriatna и R. S. D. Rasadv качестве разбавителя использовался Трис (TEY), состоящий из 3,03 г гидроксиметила, 1,78 г лимонной кислоты, 1,25 г фруктозы и 100 мл воды. Полученный разбавитель был разделен на пять равных частей, в каждую из которых были добавлены различные концентрации L-карнитина. В результате добавления L-карнитина (концентрация 1 мМ) в среду разбавителей сперматозоиды сохраняют подвижность и жизнеспособность [6].

Сперма барана отличается особой чувствительностью к замораживанию-оттаиванию по причине своего липидного состава, вследствие чего показатель оплодотворяемости снижается до 30-40 %. В частности, содержание стеролов связано с криотолерантностью спермы. Оболочка спермы барана характеризуется низким содержанием и соотношением холестерина и фосфолипидов а, следовательно, более чувствительна к понижению температуры, чем те, у которых более высокое соотношение холестерина и фосфолипидов (например, мембраны сперматозоидов кролика или человека). Во время обработки сперма барана вырабатывает большое количество перекиси водорода, которая снижает подвижность сперматозоидов после оттаивания.

В исследовании de Las Mercedes Cargo инкубация свежей спермы с 10 мМ МβСД в комплексе с холестерином или с десмостеролом увеличивала содержание стеролов спермы в одинаковой степени с сопутствующим увеличением порядка липидов мембраны и отсутствием изменения флуоресценции. По этой причине МβСД-стерол был выбран для дальнейшего изучения криорезистентности. Параметры качества спермы оценивали в охлажденных и замороженных-оттаянных сперматозоидах, предварительно обработанных 10 мМ МβСД-стерола. Включение

холестерина или десмостерола повышало общую подвижность и способность мембран сперматозоидов преодолевать осмотический стресс как после охлаждения, так и после оттаивания. Данное исследование дает новое представление о степени включения стеролов в сперму барана, его влиянии на биофизические свойства и организацию мембраны, а также о его роли в предотвращении криповреждения [7].

В эксперименте Kulaksiz было исследовано влияние различных видов яичного желтка на криоконсервацию спермы барана. Ученые использовали для этой цели желтки яиц: домашней курицы, гуся, индейки, утки и перепела. Наиболее высокое качество заморожено-оттаянной спермы было зарегистрировано в разбавителе с куриным желтком [8].

В работе Allai моносахариды и дисахариды широко использовались для хранения спермы баранов. При этом было указано на несколько их функций: служит энергетическим субстратом для сперматозоидов во время инкубации и поддерживает осмотический баланс разбавителей [9].

В исследовании Rateb определяли эффективность включения кофеина, мелатонина или омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в разбавитель. Эякуляты ($n = 30$) собирали у 5 взрослых баранов, разбавляли (1:10) трис-лимонной кислотой (основной разбавитель). Разбавленную сперму разделяли на 4 аликвоты, предназначенные для: контроля (необработанный), кофеин (0,1 мМ), мелатонин (0,3 мМ) или жирные кислоты омега-3 (0,3 мМ). Разведенные образцы хранили при 4°C в течение 48 ч, в течение которых оценивали физические и цитологические свойства сперматозоидов, а также индексы окислительного стресса. Результаты продемонстрировали превосходство добавок мелатонина и омега-3 в сохранении свойств сперматозоидов при снижении реакции липидпероксидазы и ферментативной активности аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы в консервирующей среде по сравнению с добавлением в разбавитель кофеина. Было установлено, что мелатонин и омега-3 являются эффективными альтернативами кофеину при обработке сперматозоидов барана для применения в целях искусственного осеменения или экстракорпорального оплодотворения [10].

Интересные данные были получены учеными Й. Озтерклер, У. Ц. Ари, согласно которым семенная жидкость и ее белковые компоненты, добавленные в качестве компонента в состав разбавителя спермы барана, оказывают положительный эффект на подвижность и мор-

фологические характеристики сперматозоидов после оттаивания, чего не наблюдается в сперме быка при той же технологии.

Кроме того, имеются данные о корреляции гормона мелатонина и его способности к повреждению сперматозоидов барана. В одном из исследований было выявлено, что добавление мелатонина (1 мМ) положительно сказывается на подвижности сперматозоидов, содержании внутри клетки АТФ, сохранности ДНК, а главное – на жизнеспособности данных клеток [11].

Что касается спермы жеребцов, то мембрана их сперматозоидов содержит длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты, которые способствуют текучести, необходимой для процессов слияния мембран, связанных с оплодотворением. Омега-3, линоленовая, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты особенно важны для целостности и холодостойкости мембран сперматозоидов [12]. Кроме полиненасыщенных жирных кислот функциональную целостность сперматозоидов у жеребцов поддерживают кальций и фосфор [13]. У жеребцов сперматозоиды производят АТФ посредством митохондриального окислительного фосфорилирования, что более эффективно по сравнению с производством АТФ путем гликолиза, характерным для людей, крыс и быков. Следовательно, функциональность митохондрий особенно важна для спермы жеребцов.

В исследовании Renata Lanzoni, Eneiva Carla Carvalho Celeghini и др. оценивалось влияние CoQ-10 на клеточную биоэнергетику, цитоскелет, целостность мембран и подвижность сперматозоидов. Добавление CoQ-10 в разбавитель для замораживания оказалось полезным для криоконсервированной спермы лошадей за счет сохранения митохондриальной функциональности и актиновой организации сперматозоидов при использовании в концентрации 1 ммоль. Функциональность митохондрий и актиновый цитоскелет спермиев, подвергнутых криоконсервации, наиболее эффективно сохранялся при добавлении CoQ-10.

Коэнзим Q-10 представляет собой липидную молекулу, присутствующую в клетках млекопитающих и способствующую выработке энергии за счет обмена электронами и протонами, который происходит во время цепи переноса электронов во внутренней митохондриальной мембране. В дополнение к его роли в клеточной биоэнергетике, он считается единственным эндогенно синтезируемым жирорастворимым антиоксидантом [14].

Доля полиненасыщенных жирных кислот в сперме хряков выше по сравнению с другими видами животных, но также известно, что доля их в

сперме снижается после усиления акросомной реакции у свиней. Следовательно, подавление акросомной реакции ведет к улучшению сохранности сперматозоидов в замороженной сперме. HCO_3^- и прогестерон половых путей самки являются непосредственным стимулом данной реакции.

В исследовании Choon-Keun Park и Sang-Hee Lee проводился мониторинг изменений акросомной реакции и соотношения полиненасыщенных жирных кислот по HCO_3^- и прогестерону в сперме хряков. В разбавитель спермы добавляли NaHCO_3 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 300, 500, 700 и 1000 мМ до тех пор, пока pH разбавителей спермы не достигал 7,0-7,1. Прогестерон растворяли в этаноле до концентрации 1,0 М, после чего исходный раствор прогестерона разбавляли средой-разбавителем спермы. Исходный раствор разбавляли до 0, 5, 15, 25, 35, 50, 65, 75, 85 и 100 мкМ в образцах спермы. Все образцы инкубировали при температуре 38°C в течение 6 ч, после инкубации центрифугировали при 410 g в течение 5 мин.

В результате целостность плазматической мембраны существенно не различалась между группами, получавшими 0, 10, 20, 30 и 40 мМ NaHCO_3 , однако концентрация NaHCO_3 выше 50 мМ значительно снижала целостность плазматической мембраны спермы хряка. Точно так же не было существенной разницы между группами, получавшими 0, 10, 20, 30, 40 и 50 мМ NaHCO_3 ,

100 мМ NaHCO_3 значительно увеличивали акросомную реакцию в сперме хряка [15].

Заключение. Вспомогательные репродуктивные технологии на данный момент являются крайне востребованными в животноводстве, особенно это касается искусственного осеменения, позволяющего получить многочисленное потомство, сократив при этом потребность в содержании производителей. Однако данная технология не была бы столь успешна без длительного хранения спермы, то есть криоконсервации, которая, к сожалению, вызывает частично необратимое повреждение половых клеток. Для того, чтобы предотвратить негативное воздействие криоконсервации на сперматозоиды, используют разбавители, но протоколы хранения спермы у разных видов животных различаются из-за присутствия им особенностей, что затрудняет создание универсального разбавителя. Тем не менее традиционно разбавители спермы имеют следующий состав: антибактериальные компоненты, мембран протективные компоненты (молочный протеин, яичный желток и др.), криопротективные компоненты (например, глицерол), экстрацеллюлярные агенты (протеины, сахара и др.), буфер и цитрат pH буфер. Также необходимо отметить, что большая часть разбавителей спермы животных — импортного производства, в связи с этим актуальным является разработка отечественных разбавителей.

Литература

1. Одинцова И. А. Криоконсервация половых клеток: история и современное состояние вопроса / И. А. Одинцова, С. Э. Русакова, А. А. Шмидт, Ю. Л. Тимошкова // *Гены и клетки*. — 2021. — Т. 16. — № 2. — С. 44-51. doi:10.23868/202110005.
2. Stanishevskaya O. Effects of saccharides supplementation in the extender of cryopreserved rooster (*galusdomesticus*) semen on the fertility of frozen/thawed spermatozoa / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, N. Pleshanov, A. Kurochkin // *Animals*. — 2021. — Vol. 11. — № 1. — P. 189. doi:10.3390/ani11010189.
3. Ratnawati D. Motility characterization of albumin sexed spermatozoa in two different diluents and additional antioxidant / D. Ratnawati, M. Luthfi, D. Pamungkas // *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. — 2020. — Т. 45. — № 4. — С. 277-286. doi:10.14710/jitaa.45.4.277-286.
4. Bharvaga P. M. The Chemical Composition of Bull Semen with Special Reference to Nucleic Acids, Free Nucleotides and Free Amino Acids / P. M. Bharvaga, M. W. Bishop, T. S. Work // *National Institute for Medical Research*. — 1959. — Т. 21. — № 6. — С. 157-164. doi:10.1042/bj0730242.
5. Vodicka J. The effects of egg yolk-based and egg yolk-free diluents on the post-thaw quality of bull spermatozoa / J. Vodicka // *Acta Veterinaria Brno*. — 2022. — Т. 91. — № 4. — С. 339-346.
6. Darussalam I. The effect of L-carnitine in Tris egg yolk-based diluent on the quality of Pasundan bull semen preserved in chilled condition / I. Darussalam // *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. — 2020. — Т. 45. — № 3. — С. 197-205.
7. de Las Mercedes Carro Maria. Cholesterol and desmosterol incorporation into ram sperm membrane before cryopreservation: Effects on membrane biophysical properties and sperm quality / Maria. de Las Mercedes Carro // *Cholesterol and desmosterol incorporation into ram sperm membrane before cryopreservation: Effects on membrane biophysical properties and sperm quality. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. — 2020. — Т. 1862. — С. 155-162. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183357.

8. Айбазов М. М. Сравнительная характеристика спермы барана, замороженной в разных экстендерах / М. М. Айбазов, А. Н. Шевченко, М. И. Селионова // Известия ТСХА. — 2021. — № 4. — С. 63-73. doi:10.26897/0021-342X-2021-4-63-78.
9. Allai L. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate/ L. Allai, A. B. Moula // Animal Reproduction Science. — 2018. — Т. 192. — С. 6-17. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.03.019
10. Rateb S. A. Enhancing liquid-chilled storage and cryopreservation capacities of ram spermatozoa by supplementing the diluent with different additives / S. A. Rateb // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. — 2020. — Т. 33. — № 7. — С. 1068-1076. doi:org/10.5713/ajas.19.0338.
11. Озтерклер Й. Краткий обзор современных добавок к разбавителям спермы, применяемых для повышения устойчивости семени баранов к замораживанию / Й. Озтерклер, У. Ц. Ари // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 2. — С. 242-250. doi:10.15389/agrobiology.2017.2.242rus.
12. Aurich C. Seasonal changes in the sperm fatty acid composition of Shetland pony stallions / C. Aurich, O. Ferrusola, F. J. Peca // Theriogenology. — 2018. — Т. 107. — С. 149-153. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.11.004.
13. Waheed M. M. Relation of seminal plasma trace mineral in the Arabian stallion's semen with the semen characteristics and subsequent fertility / M. M. Waheed, A. Meligy, A. K. Alhaider // Heliyon. — 2022. — Т. 8. — № 10. — С. 121-127. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11128.
14. Lanzoni R. Coenzyme Q-10 improves preservation of mitochondrial functionality and actin structure of cryopreserved stallion sperm / R. Lanzoni, E. C. Carvalho, V. De Giuli Junior // Animal Reproduction. — 2021. — Т. 18. — № 6. — С. 105-112. doi:10.1590/1984-3143-ar2020-0218.
15. Park Choon-Keun. Effect of bicarbonate and progesterone on plasma membrane integrity, acrosome reaction and proportion of fatty acids in boar sperm / Park Choon-Keun, Sang-Hee Lee // Journal of Animal Reproduction and Biotechnology. — 2021. — Т. 36. — № 4. — С. 239-246. doi:10.12750/JARB.36.4.239.

Korochkina E., Moroz A.

The importance of sperm diluents of different types of farm animals in the process of the cryopreservation

Abstract.

Purpose: to systematize and analyze scientific information about diluents of sperm of farm animals in the process of its cryopreservation, taking into account specific features

Assisted reproductive technologies are extremely in demand in animal husbandry at the moment, especially with regard to artificial insemination. However, this technology is of priority importance if the sperm is stored for a long period when the sperm is cryopreserved. At the same time, numerous studies have established that the cryopreservation process causes adverse changes in germ cells, which leads to their damage or death, and partially irreversible damage to the morphological structures of cells occurs. To obtain high results from the use of frozen-thawed sperm, it is necessary to prevent damage to spermatozoa. In this regard, the use of sperm diluents is urgent. Each type of animal sperm has its own distinctive parameters volume, concentration, chemical composition, osmotic pressure, pH, etc. Therefore, it is difficult to develop a universal sperm diluent suitable for each type of animal.

Keywords: sperm; diluents; cryopreservation; farm animals; specific features.

Authors:

Korochkina E. – PhD (Vet. Sci.); e-mail: e.kora@mail.ru;

Moroz A. – postgraduate student; e-mail: sashamoroz.shuramoroz@mail.ru.

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine; 196084, Russia, St. Petersburg, Chernigovskaya str., 5

References

1. Odintsova I. A. Cryoconservation of germ cells: history and current state of the issue / I. A. Odintsova, S. E. Rusakov, A. A. Schmidt, Yu. L. Timoshkova // *Genes and cells*. – 2021. – Vol. 16. – № 2. – P. 44-51. doi:10.23868/202110005.
2. Stanishevskaya O. Effects of saccharides supplementation in the extender of cryopreserved rooster (*galusdomesticus*) semen on the fertility of frozen/thawed spermatozoa / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, N. Pleshanov, A. Kurochkin // *Animals*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 189. doi:10.3390/ani11010189.
3. Ratnawati D. Motility characterization of albumin sexed spermatozoa in two different diluents and additional antioxidant / D. Ratnawati, M. Luthfi, D. Pamungkas // *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. – 2020. – Vol. 45. – № 4. – P. 277-286. doi:10.14710/jitaa.45.4.277-286.
4. Bharvaga P. M. The Chemical Composition of Bull Semen with Special Reference to Nucleic Acids, Free Nucleotides and Free Amino Acids / P. M. Bharvaga, M. W. Bishop, T. S. Work // *National Institute for Medical Research*. – 1959. – Vol. 21. – № 6. – P. 157-164. doi:10.1042/bj0730242.
5. Vodicka J. The effects of egg yolk-based and egg yolk-free diluents on the post-thaw quality of bull spermatozoa / J. Vodicka // *Acta Veterinaria Brno*. – 2022. – Vol. 91. – № 4. – P. 339-346.
6. Darussalam I. The effect of L-carnitine in Tris egg yolk-based diluent on the quality of Pasundan bull semen preserved in chilled condition / I. Darussalam // *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. – 2020. – Vol. 45. – № 3. – P. 197-205.
7. de Las Mercedes Carro Maria. Cholesterol and desmosterol incorporation into ram sperm membrane before cryopreservation: Effects on membrane biophysical properties and sperm quality / Maria. de Las Mercedes Carro // *Cholesterol and desmosterol incorporation into ram sperm membrane before cryopreservation: Effects on membrane biophysical properties and sperm quality. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2020. – Vol. 1862. – P. 155-162. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183357.
8. Aibazov M. M. Comparative characteristics of the sperm of a ram, frozen in different exterals / M. M. Aibazov, A. N. Shevchenko, M. I. Selionov // *News of TSHA*. – 2021. – № 4. – P. 63-73. doi:10.26897/0021-342x-2021-4-63-78.
9. Allai L. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate / L. Allai, A. B. Moula // *Animal Reproduction Science*. – 2018. – Vol. 192. – P. 6-17. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.03.019
10. Rateb S. A. Enhancing liquid-chilled storage and cryopreservation capacities of ram spermatozoa by supplementing the diluent with different additives / S. A. Rateb // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. – 2020. – Vol. 33. – № 7. – P. 1068-1076. doi:10.5713/ajas.19.0338.
11. Dzaterkler J. Brief review of modern additives to sperm diluents used to increase the stability of the seeds of rams to freeze / J. Dzaterkler, W. C. Ari // *Agricultural Biology*. – 2017. – Vol. 52. – № 2. – P. 242-250. doi:10.15389/agrobiology.2017.2.242rus.
12. Aurich C. Seasonal changes in the sperm fatty acid composition of Shetland pony stallions / C. Aurich, O. Ferrusola, F. J. Peca // *Theriogenology*. – 2018. – Vol. 107. – P. 149-153. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.11.004.
13. Waheed M. M. Relation of seminal plasma trace mineral in the Arabian stallion's semen with the semen characteristics and subsequent fertility / M. M. Waheed, A. Meligy, A. K. Alhaider // *Heliyon*. – 2022. – Vol. 8. – № 10. – P. 121-127. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11128.
14. Lanzoni R. Coenzyme Q-10 improves preservation of mitochondrial functionality and actin structure of cryopreserved stallion sperm / R. Lanzoni, E. C. Carvalho, V. De Giuli Junior // *Animal Reproduction*. – 2021. – Vol. 18. – № 6. – P. 105-112. doi:10.1590/1984-3143-ar2020-0218.
15. Park Choon-Keun. Effect of bicarbonate and progesterone on plasma membrane integrity, acrosome reaction and proportion of fatty acids in boar sperm / Park Choon-Keun, Sang-Hee Lee // *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*. – 2021. – T. 36. – № 4. – P. 239-246. doi:10.12750/JARB.36.4.239.