

Обзоры, проблемы

УДК 636.4:636.082

doi: 10.15389/agrobiology.2024.4.721rus

СПЕРМА ХРЯКОВ: ОСОБЕННОСТИ И СПОСОБЫ ХРАНЕНИЯ
(обзор)М.А. МАКСИМОВА, К.В. ПЛЕМЯШОВ, Е.А. КОРОЧКИНА[✉]

Свиноводство — крупная и постоянно развивающаяся сельскохозяйственная отрасль, поскольку свиньи обладают высокой плодовитостью, мясной продуктивностью, скороспелостью и при этом всеядны. Динамичному развитию свиноводства способствует искусственное осеменение свиноматок, использование которого в большинстве стран мира составляет 90 % (D. Waberski с соавт., 2019). Искусственное осеменение играет важную роль в сохранении генетического материала и повышении продуктивности в отрасли (R.V. Кнох, 2016). В связи с этим целесообразно использовать хряков с высокой фертильностью и криорезистентностью спермы. Сперма хряков имеет ряд видовых особенностей. Средний объем эякулята у хряка составляет 100-150 мл, что связано с более развитыми придаточными половыми железами, чем у других животных (С.Г. Смолин, 2023). Объем эякулята зависит от породы, возраста животных и сезона года. Кроме того, существует взаимосвязь между объемом эякулята и морфологией сперматозоидов. Так, сперматозоиды в эякулятах меньшего объема имеют головки большей длины и ширины (K. Górski с соавт., 2017). Важная особенность спермы хряков — низкая устойчивость к замораживанию, что связано с выраженной концентрацией фосфолипидов и, напротив, низкой концентрацией холестерина в плазматической мембране сперматозоидов (Y. Wang с соавт., 2021). Во время криоконсервации сперматозоиды подвергаются осмотическому стрессу и дегидратации, в сперме накапливаются активные формы кислорода и азота, что приводит к резкому снижению подвижности и жизнеспособности сперматозоидов после оттаивания. В связи с этим сперму хряков оптимально хранить при температуре от 17 до 25 °С не более 120 ч (H. Henning с соавт., 2022). При выборе протокола замораживания спермы (с наличием семенной плазмы или без нее) необходимо учитывать состав семенной плазмы, а также условия центрифугирования и замораживания. Так, при центрифугировании в режиме 2400 об/мин в течение 3 мин сперматозоиды повреждаются в меньшей степени и, как следствие, более устойчивы к холоду (K. Wasilewska с соавт., 2017). Использование разбавителей Androher («Minitube», Германия) или Cryoguard («Minitube», Германия) способствует лучшей сохранности сперматозоидов при криоконсервации (A. Dziekońska с соавт., 2015; A. De Andrade с соавт., 2022). Для улучшения сохранности в сперму добавляют пентаизомальтозу (O. Simonik с соавт., 2022), трегалозу (R. Athurupana с соавт., 2015), апегенин (Y. Pei с соавт., 2018), ресвератрол (K. Kaеoket с соавт., 2023). Время охлаждения перед криоконсервацией влияет на сохранность сперматозоидов. Оптимальными протоколами охлаждения спермы перед заморозкой считаются 2-4 ч при 5 °С (J. Schäfer с соавт., 2017), а также 24 ч при 17 °С (M.A. Torres с соавт., 2019). Успешность криоконсервации во многом определяется протоколом замораживания, которое может быть ручным и автоматизированным. Оптимальный протокол ручной заморозки спермы — горизонтальное размещение соломинок со спермой на 4 см выше уровня жидкого азота на 20 мин с дальнейшим погружением в жидкий азот (V. Khophloiklang с соавт., 2023), а также на 2 и 5 см соответственно на 15 и 20 мин (S. Bang с соавт., 2022; S.L. Soares с соавт., 2020). При автоматической заморозке спермы снижается количество свободных радикалов и перекисное окисление липидов, что отражается на сохранении подвижности сперматозоидов после оттаивания. Оптимальным протоколом автоматической заморозки спермы считается снижение температуры от 5 до -5 °С и далее со скоростью -39,80 °С · мин⁻¹ в течение 113 с. После этого сперму выдерживают при -80 °С в течение 30 с и замораживают со скоростью -60 °С · мин⁻¹ в течение 70 с для того, чтобы температура снизилась до -150 °С. В настоящее время разработано несколько протоколов оттаивания спермы хряков: 8 с при 60 °С (Z. Zhu с соавт., 2022), 8 с при 70 °С (R.A. Gonzalez-Castro с соавт., 2022), 25 с при 37,5 °С (R. Osman с соавт., 2023). Для снижения степени апоптоза и количества активных форм кислорода сперму после оттаивания рекомендуется хранить при 17 °С (J. Li с соавт., 2023). Таким образом, принимая во внимание видовые особенности спермы хряков, необходимо строгое соблюдение протоколов предподготовки и глубокой заморозки спермы. Эффективность использования криоконсервированной спермы при искусственном осеменении свиноматок будет также зависеть от соблюдения протоколов оттаивания и последующего кратковременного хранения этого генетического материала.

Ключевые слова: хряки, сперма, криоконсервация, хранение спермы.

Свиноводство — это крупная сельскохозяйственная отрасль, которая служит одним из масштабных поставщиков мяса и продуктов убоя благодаря ряду биологических особенностей свиней (1): высокой плодовитости

(2, 3) и мясной продуктивности (4), скороспелости и всеядности (5-7), а также высокой калорийности мяса (8).

В современной животноводческой отрасли Российской Федерации значительная доля приходится на свиноводство. С 2005 года прослеживается тенденция роста поголовья животных (9), что связано со строительством и вводом в эксплуатацию новых и прошедших реконструкцию предприятий. В 2020 году было произведено 5472,2 тыс. т живой массы свиней, а в 2021 году — 5496,2 тыс. т, что составило соответственно 35 и 37 % от общей доли производства скота и птицы (10). Предполагается, что к 2025 году производство свинины в России составит 6 млн т живой массы (11).

Для разведения свиней на животноводческих предприятиях и в фермерских хозяйствах применяют естественное и искусственное осеменение. Так, в настоящее время искусственное осеменение используется для разведения более 90 % свиноматок в большинстве стран мира (12), в том числе в свиноводческих хозяйствах РФ (13, 14).

Искусственное осеменение играет важную роль в улучшении генофонда, продуктивности, а создание центров искусственного осеменения позволяет проводить отбор племенных хряков на фертильность и получать сперму высокого качества (15). В связи с этим в последнее десятилетие актуальным научным направлением становится изучение методов обнаружения субфертильных животных, приемов прогнозирования фертильности хряков, а также способов выявления хряков, сперма которых имеет более высокую степень криорезистентности с последующим определением репродуктивных показателей (16). Важно отметить, что криоконсервация спермы вызывает изменение структуры сперматозоидов, снижение подвижности, жизнеспособности и митохондриальной функции (17). В условиях *in vitro* коэффициент оплодотворения размороженной спермой составляет около 38,5 % (18), частота образования бластоцист при использовании карбоксилированного поли-L-лизина в качестве криопротектора — 24,6 % (19), тогда как показатели стельности и опороса достигают соответственно 84,2 и 81,6 % (20). Криоконсервация спермы помогает сохранять ценный генетический материал, а также способствует быстрому генетическому обновлению поголовья, в связи с чем важная роль отводится разработке методов, обеспечивающих поддержание структуры половых гамет в процессе замораживания (21).

Стоит выделить еще одно интересное и перспективное направление в свиноводческой отрасли — производство сексированной спермы, что позволяет получать большое число животных женского пола с сохранением фертильности семени (12, 22, 23).

Таким образом, в развитии свиноводства одной из главных задач становится повышение эффективности искусственного осеменения, а значит, улучшение качества спермы от высокоценных хряков-производителей.

Цель нашего обзора — систематизировать научно-производственные данные об особенностях спермы хряков, способах ее хранения и методах криоконсервации.

Сперматогенез — это регулируемый процесс размножения и дифференцировки половых клеток, приводящий к образованию сперматозоидов в семенных канальцах (24). Сперматогенез состоит из четырех стадий: размножение, рост, формирование и созревание. На этих этапах происходит митотическое и мейотическое деление клеток, в результате чего образуются гаплоидные половые клетки — сперматозоиды (24, 25), которые приобретают фертильность поэтапно. Немаловажное значение имеет придаток семенника. В нем происходит созревание сперматозоидов, во время которого половые клетки контактируют с внеклеточными микровезикулами (эпиди-

димосомами), способными снабжать сперматозоиды новым набором белков, модулирующих протеом клеток и участвующих в их посттестискулярном созревании (26, 27). Второй составной частью спермы служит вырабатываемая придаточными половыми железами семенная плазма, в состав которой входит большое количество органических и неорганических веществ с различной концентрацией в зависимости от вида животного (28).

Сперма хряков имеет видовые особенности, такие как объем эякулята, морфология сперматозоидов, сниженная криорезистентность спермы.

Как известно, объем эякулята, то есть количество спермы, выделяемой во время полового акта, имеет существенные видовые различия. Средний объем эякулята у хряка составляет 100-150 мл (29). Придаточные половые железы хряков более развиты, чем у других животных, и их секреция больше, чем, например, у быков и баранов (30).

Объем эякулята хряков варьируется в зависимости от породы, возраста, сезона года и других параметров. L. Zasiadczyk с соавт. (31) определили, что этот показатель существенно изменяется в течение года: в осенне-зимний период объем фракционированного эякулята составлял в среднем 107,78 мл, тогда как в весенне-летний период — 87,8 мл (31). Эти данные подтвердили L. Fraser с соавт. (32), установив, что объем эякулята у хряков старше 18 мес в осенне-зимний период составляет 238 мл.

Объем эякулята имеет обратную зависимость с концентрацией сперматозоидов. Так, концентрация сперматозоидов в сперме хряка составляет в среднем 0,1-0,4 млрд/мл, или 3-7 %, а остальная часть представлена секретом придаточных половых желез (33). Объем эякулята хряков может определять морфометрические параметры сперматозоидов. K. Górski с соавт. (34) установили, что сперматозоиды в эякулятах наименьшего объема (менее 160 мл) имели головки большей длины и ширины, а сперматозоиды из эякулятов с наибольшим объемом (более 200 мл) — более длинные хвосты. Наименьшее число морфологически нормальных сперматозоидов обнаруживалось в эякулятах наибольшего объема: (на 4 % меньше, чем в эякулятах, объем которых варьировался от 161 до 200 мл, и на 2,56 % меньше, чем в эякулятах объемом менее 160 мл) (34).

Сперматозоиды хряка морфологически схожи со сперматозоидами других копытных животных. Согласно морфометрическим исследованиям, проведенным V. Vaquero с соавт. (35), сперматозоиды хряков, полученных в результате скрещивания пород дюрок и пьетрен, имеют длину головки 8,77 мкм, ширину 4,54 мкм, площадь 35,46 мкм, шероховатость 0,75 4 А/Р2.

Морфологическую оценку сперматозоидов проводят с помощью различных красителей, состав и свойства которых могут влиять на получаемый результат. Так, M. Czubaszek с соавт. (36) выявили, что использование красителя Sperm Blue в наименьшей степени влияет на морфометрические параметры головки сперматозоида, тогда как окрашивание нитратом серебра в коллоидном растворе желатина оказывает значительное влияние на морфометрические характеристики, но при этом позволяет проводить морфологическую оценку и идентификацию некоторых структур сперматозоида. Похожие результаты были получены D. Szablicka с соавт. (37).

S.T. Kondracki с соавт. (38) установили, что сперматозоиды, окрашенные эозин-нигрозином, имели меньшие размеры, а также более короткие и узкие головки, чем сперматозоиды, окрашенные эозин-горечавковым красителем. Для морфологической оценки сперматозоидов используют также красители Дифф-Квик (39) и окрашивание по Романовскому-Гимзе (40).

Морфология сперматозоидов может зависеть не только от объема эякулята, но и от породы хряка. K. Górski с соавт. (41) определили, что

сперматозоиды хряков породы ландрас имели головки на 0,15 мкм и жгутик на 2,07 мкм длиннее, чем сперматозоиды хряков крупной белой породы (41).

Таким образом, сперма хряков имеет ряд видовых особенностей, на которые оказывают влияние порода, сезон года, возраст животных и другие параметры.

Сперма хряков также обладает повышенной чувствительностью к низким температурам, то есть к криоконсервации, которая вызывает физиологические и функциональные изменения в сперматозоидах (42, 43). Во время криоконсервации клетки подвергаются осмотическому стрессу и дегидратации, возникает повреждение акросом, изменяется проницаемость мембраны, в результате этого снижается подвижность и жизнеспособность размороженных сперматозоидов (44, 45). Кроме того, процесс замораживания-оттаивания способен вызывать окислительный стресс и увеличить образование активных форм кислорода и азота (46). В обзоре P. Peris-Frau с соавт. (47) указано, что во время замораживания происходит накопление активных форм кислорода, которые задерживаются в плазматической мембране и вызывают окислительный стресс. Это приводит к белковым, липидным и углеводным изменениям в мембране сперматозоидов из-за нарушения дисульфидных связей между мембранными белками (47). Индуцировать окислительный стресс в мембране сперматозоидов могут и липополисахариды клеточной стенки бактерий (48). Образование активных форм кислорода и азота ухудшает качество спермы. Различные вещества семенной плазмы, такие как спермин и спермидин, способствуют снижению содержания активных форм кислорода и повышению качества сперматозоидов (49, 50).

Как известно, устойчивость к замораживанию, или криорезистентность, неодинакова у разных видов животных. Так, после оттаивания спермы быка доля подвижных сперматозоидов достигала примерно 38 % (51), а у хряка после размораживания и трехчасовой инкубации подвижность сперматозоидов составляла 19 % (52). Низкая устойчивость к замораживанию также отражается на длительности хранения замороженной спермы. J. Li с соавт. (53) отмечают, что продолжительность хранения не влияет на жизнеспособность сперматозоидов. Вместе с тем были зарегистрированы низкие показатели подвижности в образцах спермы, хранившихся в течение 4 и 8 лет (53). В отличие от спермы хряков, срок хранения криоконсервированной спермы быков может достигать 18 лет без существенного снижения подвижности и с сохранением фертильности (54). Низкую криорезистентность спермы хряка связывают с более высокой концентрацией фосфолипидов и более низким содержанием холестерина в плазматической мембране сперматозоидов, а также с более крупными размерами головок сперматозоидов (43). Состав плазматической мембраны сперматозоидов может варьироваться в сперме с хорошей и плохой замораживаемостью. Y. Zhang с соавт. (55) проанализировали липидный состав плазматических мембран сперматозоидов хряков с хорошей и плохой замораживаемостью. Липидный состав плазматических мембран показал различие в количестве 15 липидов между этими группами. К наиболее распространенным фосфолипидам в плазматической мембране относят фосфатидилхолин, который связан с подвижностью сперматозоидов и участвует в акросомальной реакции; фосфатидилсерин, оказывающий влияние на целостность мембран; фосфатидилинозитол, который служит сигнальным фактором в клетках (56).

Холестерин повышает стабильность мембраны при понижении температуры, тем самым уменьшая степень повреждения. При этом ключевое значение имеет соотношение холестерина и фосфолипидов. Так, спермато-

зоиды животных, более устойчивые к криоконсервации, имеют большее молярное соотношение холестерина и фосфолипидов (57). Этот факт был продемонстрирован в работе M. de las Mercedes Carro с соавт. (58): при наличии демостерола и холестерина в сперме барана ее криорезистентность увеличивалась.

Следовательно, можно утверждать, что состав плазматической мембраны играет важную роль в устойчивости сперматозоидов к низким температурам. D.V. Guimarães с соавт. (59) определили, что потенциальными маркерами замораживаемости спермы хряков выступают белки мембран сперматозоидов: Fc-фрагмент IgG-связывающего белка, лактадгерин, арилсульфатаза А и субъединица альфа-1 белка, покрывающего F-актин. В связи с этой особенностью оптимальный режим хранения спермы хряков — температура от 17 до 25 °С, продолжительность — не более 120 ч (60).

Установлены параметры, которые повышают устойчивость сперматозоидов хряка к низким температурам. В обзорной статье M. Yeste (61) отмечается, что качественные характеристики спермы, полученной в зимний и весенний период, обуславливают ее более высокую криорезистентность. Другие исследования подтверждают колебания подвижности сперматозоидов в течение года с ее выраженным ухудшением весной и летом (62), что D. Martín-Hidalgo с соавт. (63) связывают с количеством белков, обнаруженных в сперме. В эякулятах, собранных в летнее время, количество белков, отвечающих за сперматогенез, подвижность сперматозоидов, акросомальную реакцию и оплодотворение, было меньше, чем в эякулятах, собранных зимой (63). Протеомный анализ в исследовании I. Parrilla с соавт. (64) выявил наличие белков сперматозоидов и семенной плазмы, связанных с различными показателями. Например, белок семенной плазмы Galactosidase-beta 1-like 3 (GLB1L3) связан со стабильностью и проницаемостью мембран сперматозоидов, белок Alpha-enolase (ENO1) оказывает влияние на их подвижность.

Неоднозначным вопросом остается центрифугирование спермы перед замораживанием. H.H. Shiomí с соавт. (65) отмечают, что при режиме центрифугирования 2400 об/мин в течение 3 мин сперматозоиды повреждаются меньше, чем при 800 об/мин в течение 10 мин, следовательно, остаются более устойчивыми к повреждающему действию холода. Оптимальные режимы центрифугирования могут варьироваться в зависимости от вида животных. H. Chakravarty с соавт. (66) установили, что качественные характеристики сперматозоидов козла выше при 1400 об/мин в течение 5 мин и 1100 об/мин в течение 8 мин по сравнению с 700 об/мин в течение 8 мин. Результаты, полученные T. Nongbua с соавт. (67), указывают на эффективность применения однослойного центрифугирования спермы быка в течение 20 мин при 300 об/мин для сохранения жизнеспособности сперматозоидов после оттаивания.

Что касается использования семенной плазмы хряков в процессе криоконсервации, то успешность хранения главным образом зависит от компонентов плазмы. Так, основной белок семенной плазмы хряков PSP1 негативно влияет на сперматозоиды, а спермадезин PSP-I, напротив, улучшает их способность к оплодотворению (68). Предполагается, что белки фракционированной семенной плазмы оказывают положительное воздействие на мембрану сперматозоидов, что приводит к повышению криорезистентности (69). C. Luongo с соавт. (70) продемонстрировали, что хранение сперматозоидов в семенной плазме при 16 °С в течение 3 сут не ухудшает качество сперматозоидов. В то же время A.P.P. Pavanelli с соавт. (71), напротив, регистрировали ухудшение качественных показателей сперматозоидов

при хранении в семенной плазме и снижение оплодотворяемости свиноматок. Результаты J. Li с соавт. (72) указывают на успешное использование первой семенной фракции в объеме 10 мл в процессе криоконсервации сперматозоидов. J. Li с соавт. (73), а также K. Wasilewska-Sakowska с соавт. (74) получили положительные результаты при добавлении семенной плазмы к сперматозоидам до и после криоконсервации. В связи с этим необходимо отметить, что вопрос влияния семенной плазмы на сохранность сперматозоидов хряков остается открытым, поскольку некоторые исследования демонстрируют противоположные результаты.

К факторам, влияющим на устойчивость спермы хряков к замораживанию, относятся разбавители. В настоящее время для разведения и последующей криоконсервации спермы хряков используют разбавители CryoGuard («Minitube», Германия), Androstar Plus («Minitube», Германия), Androher Plus («Minitube», Германия), Safecell Plus («IMV», Франция), TRIX-cell Plus («IMV», Франция), BTS («IMV», Франция) (75). Состав разбавителей может варьировать в зависимости от производителя, однако среды для разбавления обычно включают сахара (глюкоза, фруктоза и др.), используемые в качестве источника энергии для сперматозоидов и снижающие электропроводность, соли многоосновных кислот для предотвращения окисления сперматозоидов, яичный желток для снижения действия холодового шока, а также антибиотики, витамины, глицерин и другие вещества (76). Например, для разбавления спермы хряков может использоваться глюкозо-хелато-цитратно-сульфатная (ГХЦС) среда, которая сохраняет двигательную активность сперматозоидов даже при длительном хранении, а также способствует высокой оплодотворяемости свиноматок (77-79). A. De Andrade с соавт. (80) отмечают, что показатели прогрессивной подвижности сперматозоидов, целостности акросомы и плазматической мембраны сперматозоидов были лучше в сперме, разбавленной CryoGuard, по сравнению со спермой, разбавленной Androstar Plus. В статье A. Dziekonska с соавт. (81) приведены результаты оценки разбавителей BTS, Androher Plus и Gedil («IMV», Франция), при этом самое высокое качество спермы после размораживания отмечали при использовании Androher Plus.

R. Dong с соавт. (82) отмечают, что добавление к сперме 10 мкм рибофлавина повышает целостность акросомы, плазматической мембраны, снижает степень фрагментации ДНК, а также содержание малонового диальдегида. Другими веществами, положительно влияющими на качество замороженной спермы, считаются пентаизомальтоза (83), трегалоза, при использовании которой оплодотворяемость *in vitro* составила 66 % (84), апегенин, феруловая кислота (85), трис(гидроксиметил)аминометан (86), ресвератрол (87).

Время охлаждения — это параметр, влияющий на криорезистентность сперматозоидов. K. Wasilewska с соавт. (88) установили улучшение подвижности при эквilibрации спермы при 10 °С в течение 24 ч. M.A. Torres с соавт. (89) также указывают, что 24-часовая эквilibрация спермы при 17 °С улучшает качество оттаянных сперматозоидов. Однако в других исследованиях оптимальным временем охлаждения были 2-4 ч при 5 °С (90, 91).

Успешность криоконсервации во многом определяется протоколом глубокой заморозки спермы. Существует большое число успешных протоколов криоконсервации. Так, V. Khophloiklang с соавт. (92) указывают на успешность заморозки, при которой соломинки со спермой помещали в пенополистирольную коробку на 4 см выше уровня жидкого азота на 20 мин, а затем погружали в жидкий азот (92). Во многих других исследованиях использовалась похожая методика замораживания с различиями в расстоянии

расположения соломинок над парами азота или во времени их выдерживания. Например, S. Vang с соавт. (93) помещали соломинки горизонтально на 2 см над поверхностью жидкого азота и выдерживали в течение 15 мин. В статье S.L. Soares с соавт. (94) указано 20-минутное выдерживание на расстоянии 5 см. В большинстве этих исследований подвижность и жизнеспособность сперматозоидов сохраняется, однако M.G. Philippe с соавт. (95) указывают на отрицательный результат применения протокола заморозки, включающего размещение соломинок на расстоянии 5 см над жидким азотом в течение 10 мин, а затем их полное погружение в жидкий азот. При этом сперматозоиды после размораживания имели низкие параметры подвижности (95). Может применяться витрификация спермы в соломинках, то есть ее быстрое замораживание. M.S. Albal с соавт. (96) установили, что витрификацию допустимо использовать для криоконсервации спермы хряка, поскольку сперматозоиды сохраняют свою подвижность, однако ступенчатое замораживание в настоящее время более предпочтительно.

Другой способ криоконсервации — автоматическая заморозка, которая имеет ряд преимуществ. Так, F. Rezo с соавт. (97) для автоматизированного замораживания использовали оборудование Icescube 11XS («SY-LAB Gerde GmbH», Австрия). Скорость изменения температуры в течение 100 с составляла $6\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$, благодаря чему температура снижалась от 5 до $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем температура снижалась со скоростью $-39,80\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ в течение 113 с. После этого сперму выдерживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с и замораживали со скоростью $-60\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ в течение 70 с для того, чтобы температура в конечном итоге снизилась до $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Было установлено, что подобный режим криоконсервации снижает количество свободных радикалов, перекисное окисление липидов и транслокацию фосфатидилсерина, что отражается на сохранении подвижности с течением времени (97).

Подобные протоколы автоматической заморозки с различными кривыми снижения температуры использовались и в других исследованиях (98, 99). Таким образом, процесс замораживания спермы — это важный этап, поскольку от способа его проведения зависит качество оттаянной спермы.

Ключевые факторы при проведении процедуры размораживания спермы — температура и время. R.V. Knox с соавт. (100) продемонстрировали, что размораживание при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 с снижало показатели подвижности, жизнеспособности и число сперматозоидов с интактными акросомами (100). M.A. Thema с соавт. (101) определили оптимальную температуру для оттаивания спермы хряков породы Windsnyer, составившую $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. В работе C. Tomás-Almenar с соавт. (102) оптимальное качество спермы иберийских свиней достигалось при размораживании при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 80 с при добавлении в сперму циклодекстринов. Как и при замораживании, время и температура размораживания — переменные показатели, зависящие от установленного протокола оттаивания: 8 с при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (103), 8 с при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (104), 25 с при $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (105). Нестандартным протоколом оттаивания было предварительное размораживание на воздухе в течение 10 с, а затем оттаивание на водяной бане при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мин, при этом оплодотворяемость размороженного семени в условиях *in vitro* составила 31,94–48,72 % (106). R. Fernández-Gago с соавт. (107) установили, что добавление 50 % семенной плазмы от хряков с хорошей фертильностью в размороженную сперму улучшает подвижность оттаянных сперматозоидов, а также сохраняет структуру хроматина. После размораживания сперму сохраняют при различных температурах. J. Li с соавт. (108) определили, что $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ — наиболее благоприятная температура для хранения оттаянных

сперматозоидов. Исследователи отмечают, что при такой температуре снижается степень апоптоза и количество активных форм кислорода.

Итак, несмотря на широкое использование искусственного осеменения, в свиноводстве криоконсервация семени применяется редко в связи с особенностями спермы хряков, а именно с ее низкой криорезистентностью, что обусловлено высокой концентрацией фосфолипидов, низкой концентрацией холестерина в плазматической мембране сперматозоидов и крупными размерами головок сперматозоидов. Тем не менее в ряде исследований по повышению устойчивости спермы хряков к замораживанию получены положительные результаты. Так, центрифугирование спермы при 2400 об/мин в течение 10 мин с последующим удалением семенной плазмы повышает криорезистентность сперматозоидов при глубокой заморозке. Наиболее эффективными криопротекторами для спермы хряков считаются разбавители SryoGuard и Androher. Повышение криотолерантности наблюдается также при добавлении рибофлавина, пентаизомальтозы, трегалозы в сперму перед охлаждением с последующей заморозкой. Оптимальное время охлаждения спермы варьирует, однако положительные результаты были получены при охлаждении спермы в течение 24 ч при 17 °С, а также в течение 2-4 ч при 5 °С. Протокол криоконсервации имеет важное значение для сохранения жизнеспособности и подвижности сперматозоидов после оттаивания. В ряде исследований установлен оптимальный протокол ручной заморозки спермы — горизонтальное размещение соломинок со спермой на 4 см выше уровня жидкого азота на 20 мин с дальнейшим погружением в жидкий азот, а также на 2 и 5 см и соответственно на 15 и 20 мин. При автоматическом замораживании спермы снижается количество свободных радикалов и перекисное окисление липидов, что отражается на сохранении подвижности клеток с течением времени. Оптимальный протокол автоматической заморозки спермы включает снижение температуры от 5 до –5 °С и далее со скоростью –39,80 °С · мин⁻¹ в течение 113 с. После этого сперму выдерживают при –80 °С 30 с и замораживают со скоростью –60 °С · мин⁻¹ в течение 70 с, чтобы температура в конечном итоге снизилась до –150 °С. В настоящее время разработано несколько протоколов оттаивания спермы хряков: 8 с при 60 °С, 8 с при 70 °С, 25 с при 37,5 °С. Хранение оттаянной спермы рекомендуется проводить при температуре 17 °С, что снижает степень апоптоза и содержание активных форм кислорода.

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный
университет ветеринарной медицины,
196084 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5,
e-mail: mariaandreevna72@gmail.com, kirill060674@mail.ru,
e.kora@mail.ru ✉

Поступила в редакцию
25 апреля 2024 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2024, V. 59, № 4, pp. 721-734

BOAR SPERM: FEATURES AND STORAGE METHODS (review)

M.A. Maksimova, K.V. Plemyashov, E.A. Korochkina ✉

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, 5, ul. Chernigovskaya, St. Petersburg, 196084 Russia, e-mail mariaandreevna72@gmail.com, kirill060674@mail.ru, e.kora@mail.ru (✉ corresponding author)

ORCID:

Maksimova M.A. orcid.org/0009-0006-6710-3065

Korochkina E.A. orcid.org/0000-0002-7011-4594

Plemyashov K.V. orcid.org/0000-0002-3658-5886

The authors declare no conflict of interests

Final revision received April 25, 2024

doi: 10.15389/agrobiol.2024.4.721eng

Accepted May 18, 2024

Abstract

Pig farming is a major and continuously evolving agricultural sector due to the high fecundity,

meat productivity, early maturity, and omnivorous nature of the animals. The development of swine husbandry is facilitated in part by artificial insemination which constitutes up to 90 % in most countries (D. Waberski et al., 2019). Artificial insemination contributes to the improvement of fertility, genetic pool and productivity of animals (R.V. Knox, 2016). Therefore, the use of boars with high fertility and cryoresistance of sperm is pertinent. Boar sperm possesses several species-specific characteristics. The average ejaculate volume in boars is 100-150 ml which is due to more developed accessory sex glands compared to other animals (S.G. Smolin, 2023). Ejaculate volume depends on breed, age of the animals, and season. Additionally, there is a relationship between ejaculate volume and sperm morphology. Spermatozoa in smaller ejaculates have longer and wider heads (K. Górski et al., 2017). A significant feature of boar sperm affecting storage is its low resistance to freezing. The low cryoresistance of boar sperm is attributed to high phospholipid concentration and low cholesterol concentration in the sperm plasma membrane (Y. Wang et al., 2021). During cryopreservation, spermatozoa undergo osmotic stress and dehydration, accumulating reactive oxygen and nitrogen species, leading to a sharp decrease in motility and viability after thawing. Therefore, boar sperm is optimally stored at a temperature of 17 to 25 °C for no more than 120 hours (H. Henning et al., 2022). When choosing a protocol (with or without semen fraction), it is necessary to take into account the composition of the semen, as well as the centrifugation and freezing mode. Sperm centrifuged at 2400 rpm for 3 minutes is damaged to a lesser extent that increased its cold resistance (K. Wasilewska et al., 2017). The use of extenders such as Androhep (Minitube, Germany) or Cryoguard (Minitube, Germany) improves the preservation of spermatozoa during cryopreservation (A. Dziekońska et al., 2015; De A. Andrade et al., 2022). To increase sperm viability, pentaisomaltose (O. Simonik et al., 2022), trehalose (R. Athurupana et al., 2015), apegenin (Y. Pei et al., 2018), resveratrol are added (K. Kaeoket et al., 2023). The cooling time before cryopreservation ensures better sperm preservation. The established protocols of sperm cooling before freezing are 2-4 hours at 5 °C (J. Šašfer et al., 2017) and 24 hours at 17 °C (M.A. Torres et al., 2019). The success of cryopreservation is largely determined by the freezing mode which can be manual or automated. The optimal protocols for manual freezing are to place sperm straws horizontally 4 cm above the liquid nitrogen level for 20 minutes (V. Khophloiklang et al., 2023), followed by immersion in liquid nitrogen, or at 2 and 5 cm for 15 and 20 minutes, respectively (S. Bang et al., 2022; S.L. Soares et al., 2020). The use of automatic sperm freezing reduces the level of free radicals and lipid peroxidation, which leads to a better preservation of cell motility after thawing. The optimal protocol for automatic sperm freezing, according to research, is to lower the temperature from 5 to -5 °C, and then -39.80 °C · min⁻¹ for 113 seconds. The sperm is then held at -80 °C for 30 seconds and then frozen at -60 °C for 70 seconds to eventually drop to -150 °C. Current protocols for thawing boar semen are as follows: 60 °C for 8 s (Z. Zhu et al., 2022), 70 °C for 8 s (R.A. Gonzales-Castro et al., 2022), 37.5 °C for 25 s (R. Osman et al., 2023). To reduce levels of apoptosis and reactive oxygen species, it is recommended to store thawed spermatozoa at 17 °C (J. Li et al., 2023). Thus, given the species characteristics of boar sperm, strict adherence to protocols for pre-preparation and deep freezing of sperm is necessary. A proper protocol of thawing, followed by a short-term storage will also increase the effectiveness of artificial insemination with cryopreserved sperm.

Keywords: boars, sperm, cryopreservation, sperm storage.

REFERENCES

1. Maes D.G.D., Dewulf J., Piñeiro C., Edwards S.A., Kyriazakis I. A critical reflection on intensive pork production with an emphasis on animal health and welfare. *Journal of Animal Science*, 2019, 98(Suppl_1): S15-S26 (doi: 10.1093/jas/skz362).
2. Polkovnikova V.I. *Svinovodstvo*. [Pig breeding.]. Perm', 2022 (in Russ.).
3. Li P.-H., Ma X., Zhang Y.-Q., Zhang Q., Huang R.-H. Progress in the physiological and genetic mechanisms underlying the high prolificacy of the Erhualian pig. *Yi Chuan*, 2017, 39(11): 1016-1024 (doi: 10.16288/j.ycz.17-119).
4. Bazhov G.M. *Intensivnoe svinovodstvo* [Intensive pig farming]. St. Petersburg, 2022 (in Russ.).
5. Brunberg E.I., Rodenburg T.B., Rydhmer L., Kjaer J.B., Jensen P., Keeling L.J. Omnivores going astray: a review and new synthesis of abnormal behavior in pigs and laying hens. *Frontiers in Veterinary Science*, 2016, 3: 57 (doi: 10.3389/fvets.2016.00057).
6. Komlatskiy V.I., Velichko L.F. *Selektsiya sviney* [Pig breeding: tutorial]. Krasnodar, 2019 (in Russ.).
7. Paixão G., Esteves A., Carolino N., Dos Anjos Pires M., Payan-Carreira R. Evaluation of gonadal macroscopic and microscopic morphometry reveals precocious puberty in Bisaro pig. *Reproduction in Domestic Animals*, 2020, 55(12): 1706-1713 (doi: 10.1111/rda.13827).
8. Jang A., Kim H.-J., Kim D., Kim J., Lee S.-K. Effects of doneness on the microbial, nutritional, and quality properties of pork steak of different thicknesses. *Food Science of Animal Resources*, 2019, 39(5): 756-787 (doi: 10.5851/kosfa.2019.e63).
9. Nikitina E.S., Kozlova E.I. *Sbornik nauchnykh trudov 6-y Mezhdunarodnoy molodezhnoy nauchnoy konferentsii «Yunost' i znanie – garantiya uspekha-2019»* [Proc. 6 Int. Youth Scientific Conference «Youth and Knowledge – a Guarantee of Success-2019»]. Kursk, 2019, vyp. 4: 200-207 (in Russ.).

10. Kuz'mina T.N., Kuz'min V.N. *Tekhnika i tekhnologii v zhivotnovodstve*, 2022, 3(47): 53-58 (in Russ.).
11. Plaksin I.E., Plaksin S.I., Trifanov A.V. *AgroEkoInzheneriya*, 2022, 1(110): 155-168 (in Russ.).
12. Waberski D., Riesenbeck A., Schulze M., Weitze K.F., Johnson L. Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges. *Theriogenology*, 2019, 137: 2-7 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.030).
13. Borodulina I.V. *Sel'skokhozyaystvennyy zhurnal*, 2016, 9 (in Russ.).
14. Nekrasova L.V., Velichko V.A. *Sbornik statey po materialam 78-y nauchno-prakticheskoy konferentsii «Nauchnoe obespechenie agropromyshlennogo kompleksa»* [Proc. 78 Conf. «Scientific support for the agro-industrial complex»]. Krasnodar, 2023: 822-824 (in Russ.).
15. Knox R.V. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 2016, 85(1): 83-93 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.009).
16. Mellagi A.P.G., Will K.J., Quirino M., Bustamante-Filho I.C., da R. Ulguim R., Bortolozzo F.P. Update on artificial insemination: semen, techniques, and sow fertility. *Molecular Reproduction and Development*, 2023, 90(7): 601-611 (doi: 10.1002/mrd.23643).
17. Yáñez-Ortiz I., Catalán J., Rodríguez-Gil J.E., Miró J., Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 2022, 246: 106904 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106904).
18. Jochems R., Gaustad A.H., Zak L.J., Grindflek E., Zeremichael T.T., Oskam I.C., Myromslien F.D., Kommisrud E., Krogenæs A.K. Effect of two 'progressively motile sperm-oocyte' ratios on porcine in vitro fertilization and embryo development. *Zygote*, 2022, 30(4): 543-549 (doi: 10.1017/S0967199422000053).
19. Jin H., Choi W., Matsumura K., Hyon S.H., Gen Y., Hayashi M., Kawabata T., Ijiri M., Miyoshi K. Cryopreservation of pig spermatozoa using carboxylated poly-L-lysine as cryoprotectant. *Journal of Reproduction and Development*, 2022, 68(5): 312-317 (doi: 10.1262/jrd.2022-058).
20. Fraser L., Zasiadczyk Ł., Strzeżek J., Strzeżek R., Karpiesiuk K. Freezability and fertility of frozen-thawed boar semen supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 21(2): 255-263 (doi: 10.24425/119046).
21. Kalwar Q., Chu M., Korejo R.A., Soomro H., Yan P. Cryopreservation of yak semen: a comprehensive review. *Animals*, 2022, 12(24): 3451 (doi: 10.3390/ani12243451).
22. Park Y.-J., Kwon K.-J., Song W.-H., Pang W.-K., Ryu D.-Y., Saidur Rahman M., Pang M.-G. New technique of sex preselection for increasing female ratio in boar sperm model. *Reproduction in Domestic Animals*, 2021, 56(2): 333-341 (doi: 10.1111/rda.13870).
23. Park Y.-J., Shin D.-H., Pang W.-K., Ryu D.-Y., Rahman M.S., Adegoke E.O., Pang M.-G. Short-term storage of semen samples in acidic extender increases the proportion of females in pigs. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 362 (doi: 10.1186/s12917-021-03078-3).
24. Staub C., Johnson L. Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 2018, 12(Suppl. 1): 27-35 (doi: 10.1017/S1751731118000435).
25. Polyantsev N.I., Afanas'ev A.I. *Akusherstvo, ginekologiya i biotekhnika razmnozheniya zhivotnykh* [Obstetrics, gynecology and biotechnics of animal reproduction]. St. Petersburg, 2022 (in Russ.).
26. Barrachina F., Battistone M.A., Castillo J., Mallofré C., Jodar M., Breton S., Oliva R. Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. *Human Reproduction*, 2022, 37(4): 651-668 (doi: 10.1093/humrep/deac015).
27. Sullivan R. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian Journal of Andrology*, 2015, 17(5): 726-729 (doi: 10.4103/1008-682X.155255).
28. Dyul'ger G.P. *Fiziologiya i biotekhnika razmnozheniya zhivotnykh* [Physiology and biotechnics of animal reproduction]. St. Petersburg, 2023 (in Russ.).
29. Skripkin V.S., Pisarenko N.A., Belugin N.V., Kvochko A.N., Medvedeva E.P. *Anatomo-fiziologicheskie osobennosti reproductivnykh organov zhivotnykh* [Anatomical and physiological features of the reproductive organs of animals]. Stavropol', 2023 (in Russ.).
30. Smolin S.G. *Fiziologiya i etologiya zhivotnykh* [Animal physiology and ethology]. St. Petersburg, 2023 (in Russ.).
31. Zasiadczyk L., Fraser L., Kordan W., Wasilewska K. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates. *Theriogenology*, 2015, 83(8): 1287-1303 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.01.015).
32. Fraser L., Strzeżek J., Filipowicz K., Mogielnicka-Brzozowska M., Zasiadczyk L. Age and seasonal-dependent variations in the biochemical composition of boar semen. *Theriogenology*, 2016, 86(3): 806-816 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.035).
33. Guseva T.Yu., Kazakov D.S. *Biotechnologiya v zhivotnovodstve* [Biotechnology in animal husbandry]. Karavaevo, 2021 (in Russ.).
34. Górski K., Kondracki S., Wysokińska A. Ejaculate traits and sperm morphology depending on ejaculate volume in Duroc boars. *Journal of Veterinary Research*, 2017, 61(1): 121-125 (doi: 10.1515/jvetres-2017-0015).
35. Barquero V., Roldan E.R.S., Soler C., Yáñez J.L., Camacho M., Valverde A. Predictive capacity of boar sperm morphology and morphometric sub-populations on reproductive success after

- artificial insemination. *Animals*, 2021, 11(4): 920 (doi: 10.3390/ani11040920).
36. Czubaszek M., Andraszek K., Banaszewska D., Walczak-Jędrzejowska R. The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. *PLoS ONE*, 2019, 14(3): e0214243 (doi: 10.1371/journal.pone.0214243).
 37. Szablicka D., Wysockińska A., Pawlak A., Roman K. Morphometry of boar spermatozoa in semen stored at 17 °C—the influence of the staining technique. *Animals*, 2022, 12(15): 1888 (doi: 10.3390/ani12151888).
 38. Kondracki S.T., Wysockińska A., Kania M., Górski K. Application of two staining methods for sperm morphometric evaluation in domestic pigs. *Journal of Veterinary Research*, 2017, 61(3): 345–349 (doi: 10.1515/jvetres-2017-0045).
 39. Farias L.B., da Cunha Barreto-Vianna A.R., de Mello M.D., Dos Santos A.L., da Fonte Ramos C., Fontoura P. Comparison of diff-quick and spermac staining methods for sperm morphology evaluation. *Journal of Reproduction & Infertility*, 2023, 24(3): 166–170 (doi: 10.18502/jri.v24i3.13272).
 40. Iglesias-Reyes A., Guevara-González J., López-Díaz O., Guerra-Liera J., Huerta-Crispín R., Sánchez-Sánchez R., Córdova-Izquierdo A. Evaluation of the modified Giemsa staining technique in the acrosomal evaluation of mammalian sperm. *Abanicoveterinario*, 2019, 9 (doi: 10.21929/aba-vet2019.927).
 41. Górski K., Kondracki S., Iwanina M., Kordan W., Fraser L. Effects of breed and ejaculate volume on sperm morphology and semen parameters of boars. *Animal Science Journal*, 2021, 92(1): e13629 (doi: 10.1111/asj.13629).
 42. Zaychenko N., Dubalar' A., Fedorov N. *Materialy konferentsii «Integratsiya cherez issledovaniya i innovatsii»* [Proc. Conf. «Integration through research and innovation»]. Moldova, 2017: 107–111 (in Russ.).
 43. Wang Y., Zhou Y., Ali M.A., Zhang J., Wang W., Huang Y., Luo B., Zhang H., Qin Z., Zhang Y., Zhang M., Zhou G., Zeng C. Comparative analysis of piRNA profiles helps to elucidate cryoinjury between giant panda and boar sperm during cryopreservation. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 635013 (doi: 10.3389/fvets.2021.635013).
 44. Sieme H., Oldenhof H., Wolkers W.F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015, 50(S3): 20–26 (doi: 10.1111/rda.12594).
 45. Ezzati M., Shanebandi D., Hamdi K., Rahbar S., Pashaasl M. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell and Tissue Banking*, 2020, 21(1): 1–15 (doi: 10.1007/s10561-019-09797-0).
 46. Pezo F., Yeste M., Zambrano F., Uribe P., Risopatrón J., Sánchez R. Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*, 2021, 98: 5–11 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.11.007).
 47. Peris-Frau P., Soler A.J., Iniesta-Cuerda M., Martín-Maestro A., Sánchez-Ajofrín I., Medina-Chávez D.A., Fernández-Santos M.R., García-Álvarez O., Maroto-Morales A., Montoro V., Garde J.J. Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(8): 2781 (doi: 10.3390/ijms21082781).
 48. He B., Guo H., Gong Y., Zhao R. Lipopolysaccharide-induced mitochondrial dysfunction in boar sperm is mediated by activation of oxidative phosphorylation. *Theriogenology*, 2017, 87: 1–8 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.07.030).
 49. Li R., Wu X., Zhu Z., Lv Y., Zheng Y., Lu H., Zhou K., Wu D., Zeng W., Dong W., Zhang T. Polyamines protect boar sperm from oxidative stress in vitro. *Journal of Animal Science*, 2022, 100(4): skac069 (doi: 10.1093/jas/skac069).
 50. Li J., Wang H., Guo M., Li T., Zhang H., Zhang Q., Wang Q., Song Y., Feng H., Wei G. Exogenous spermidine effectively improves the quality of cryopreserved boar sperm. *Animal Science Journal*, 2023, 94(1): e13859 (doi: 10.1111/asj.13859).
 51. Kombarova N.A., Eskin G.V., Abilov A.I., Kornienko-Zhilyaev Yu.A., Vinogradov V.N., Galankina A.A. Optimal mode to thaw cryopreserved sperm of Holstein bull sires. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, 53(6): 1219–1229 (doi: 10.15389/agrobiol-ogy.2018.6.1219rus) (in Engl.).
 52. Tkachev A.V. *Veterinariya i kormlenie*, 2019, 4: 25–26 (in Russ.).
 53. Li J., Parrilla I., Ortega M.D., Martínez E.A., Rodríguez-Martínez H., Roca J. Post-thaw boar sperm motility is affected by prolonged storage of sperm in liquid nitrogen. A retrospective study. *Cryobiology*, 2018, 80: 119–125 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.11.004).
 54. Chrenek P., Spaleková E., Olexikova L., Makarevich A., Kubovicova E. Quality of Pinzgau bull spermatozoa following different periods of cryostorage. *Zygote*, 2017, 25(2): 215–221 (doi: 10.1017/S0967199417000077).
 55. Zhang Y., Yuan W., Liu Y., Liu Y., Liang H., Xu Q., Liu Z., Weng X. Plasma membrane lipid composition and metabolomics analysis of Yorkshire boar sperms with high and low resistance to cryopreservation. *Theriogenology*, 2023, 206: 28–39 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.04.016).
 56. Shan S., Xu F., Hirschfeld M., Brenig B. Sperm lipid markers of male fertility in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8767 (doi: 10.3390/ijms22168767).

57. Gautier C., Aurich C. "Fine feathers make fine birds" — The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 2022, 246: 106884 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106884).
58. de las Mercedes Carro M., Pecalva D.A., Antollini S.S., Hozbor F.A., Buschiazzi J. 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, 1862(9): 183357 (doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183357).
59. Guimarães D.B., Barros T.B., van Tilburg M.F., Martins J.A.M., Moura A.A., Moreno F.B., Monteiro-Moreira A.C., Moreira R.A., Toniolli R. Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 2017, 183: 27–38 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.06.005).
60. Henning H., Nguyen Q.T., Wallner U., Waberski D. Temperature limits for storage of extended boar semen from the perspective of the sperm's energy status. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 953021 (doi: 10.3389/fvets.2022.953021).
61. Yeste M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015, 50(S2): 71–79 (doi: 10.1111/rda.12569).
62. Ibănescu I., Leiding C., Bollwein H. Cluster analysis reveals seasonal variation of sperm subpopulations in extended boar semen. *Journal of Reproduction and Development*, 2018, 64(1): 33–39 (doi: 10.1262/jrd.2017-083).
63. Martín-Hidalgo D., Macías-García B., García-Marin L.J., Bragado M.J., González-Fernández L. Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter. *Animal Reproduction Science*, 2020, 219: 106513 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106513).
64. Parrilla I., Perez-Patiño C., Li J., Barranco I., Padilla L., Rodríguez-Martínez H., Martínez E.A., Roca J. Boar semen proteomics and sperm preservation. *Theriogenology*, 2019, 137: 23–29 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.033).
65. Shiomi H.H., Pinho R.O., Lima D., Siqueira J.B., Santos M., Costa E.V., Lopes P.S., Guimarães S., Guimarães J.D. Cryopreservation of Piau-breed wild boar sperm: assessment of cooling curves and centrifugation regimes. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015, 50(4): 545–553 (doi: 10.1111/rda.12520).
66. Chakravarty H., Sinha S., Borpujari D., Deka B.C., Biswas R.K., Dutta M., Borah B. Effect of centrifugation regime on cryopreservation of Beetal buck semen. *Indian Journal of Animal Research*, 2023, 57(2): 178–183 (doi: 10.18805/IJAR.B-4959).
67. Nongbua T., Johannisson A., Edman A., Morrell J.M. Effects of single layer centrifugation (SLC) on bull spermatozoa prior to freezing on post-thaw semen characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*, 2017, 52(4): 596–602 (doi: 10.1111/rda.12954).
68. Andrade A.F.C., Knox R.V., Torres M.A., Pavaneli A.P.P. What is the relevance of seminal plasma from a functional and preservation perspective? *Animal Reproduction Science*, 2022, 246: 106946 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106946).
69. Fraser L., Wasilewska-Sakowska K., Zasiadczyk Ł., Piątkowska E., Karpiesiuk K. Fractionated seminal plasma of boar ejaculates analyzed by LC-MS/MS: its effects on post-thaw semen quality. *Genes*, 2021, 12(10): 1574 (doi: 10.3390/genes12101574).
70. Luongo C., Llamas-López P.J., Hernández-Caravaca I., Matás C., García-Vázquez F.A. Should all fractions of the boar ejaculate be prepared for insemination rather than using the sperm rich only? *Biology*, 2022, 11(2): 210 (doi: 10.3390/biology11020210).
71. Pavaneli A.P.P., Passarelli M.D.S., de Freitas F.V., Ravagnani G.M., Torres M.A., Martins S.M.M.K., Yeste M., de Andrade A.F.C. Removal of seminal plasma prior to liquid storage of boar spermatozoa: A practice that can improve their fertilizing ability. *Theriogenology*, 2019, 125: 79–86 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.10.020).
72. Li J., Roca J., Pérez-Patiño C., Barranco I., Martínez E.A., Rodríguez-Martínez H., Parrilla I. Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma? *Animal Reproduction Science*, 2018, 195: 30–37 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.05.002).
73. Li J., Barranco I., Tvarijonaviciute A., Molina M.F., Martínez E.A., Rodríguez-Martínez H., Parrilla I., Roca J. Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, 2018, 107: 27–35 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.035).
74. Wasilewska-Sakowska K., Zasiadczyk Ł., Fraser L., Strzeżek J., Karpiesiuk K. Effect of post-thaw supplementation of fractionated seminal plasma on survival of boar spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2019, 22(3): 617–625 (doi: 10.24425/pjvs.2019.129972).
75. Wasilewska K., Fraser L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. *Animal Reproduction Science*, 2017, 185: 161–173 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.016).
76. Avdeenko V.S., Fedotov S.V. *Veterinarnaya andrologiya* [Veterinary andrology: a textbook]. St. Petersburg, 2022 (in Russ.).
77. Bogdanovich D.M. *Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Perspektivy ustoychivogo razvitiya agrarno-pishchevykh sistem na osnove ratsional'nogo ispol'zovaniya regional'nykh geneticheskikh i syr'evykh resursov»* [Proc. Int. Conf. «Prospects for sustainable development of agro-food systems based on rational use of regional genetic and raw material

- resources»]. Volgograd, 2023: 14-19 (in Russ.).
78. Subbot O.I. *Zootehnicheskaya nauka Belarusi*, 2021, 56(1): 88-94 (in Russ.).
 79. Bogdanovich D.M., Gliwanskaya O.I. *Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nye napravleniya innovatsionnogo razvitiya zhivotnovodstva i sovremennykh tekhnologii produktov pitaniya, meditsiny i tekhniki»* [Proc. Int. Conf. «Current trends in innovative development of animal husbandry and modern technologies of food products, medicine and technology»]. Pos. Persianovskiy, 2017: 6-11 (in Russ.).
 80. De Andrade A., Grossfeld R., Knox R.V. In vitro effects of two different commercial freezing and thawing extenders on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 2022, 236: 106906 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106906).
 81. Dziekońska A., Zasiadczyk L., Lecewicz M., Strzeżek R., Koziarowska-Gilun M., Fraser L., Mogielnicka-Brzozowska M., Kordan W. Effects of storage in different semen extenders on the pre-freezing and post-thawing quality of boar spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2015, 18(4): 733-740 (doi: 10.1515/pjvs-2015-0095).
 82. Dong R., Luo L., Liu X., Yu G. Effects of riboflavin on boar sperm motility, sperm quality, enzyme activity and antioxidant status during cryopreservation. *Veterinary Medicine and Science*, 2022, 8(4): 1509-1518 (doi: 10.1002/vms3.833).
 83. Simonik O., Bubenickova F., Tumova L., Frolikova M., Sur V.P., Beran J., Havlikova K., Hackerova L., Spevakova D., Komrskova K., Postlerova P. Boar sperm cryopreservation improvement using semen extender modification by dextran and pentaisomaltose. *Animals*, 2022, 12(7): 868 (doi: 10.3390/ani12070868).
 84. Athurupana R., Takahashi D., Ioki S., Funahashi H. Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 2015, 61(3): 205-210 (doi: 10.1262/jrd.2014-152).
 85. Pei Y., Yang L., Wu L., He H., Geng G., Xu D., Chen H., Li Q. Combined effect of apigenin and ferulic acid on frozen-thawed boar sperm quality. *Animal Science Journal*, 2018, 89(7): 956-965 (doi: 10.1111/asj.13009).
 86. Namula Z., Tanihara F., Wittayarat M., Hirata M., Nguyen N.T., Hirano T., Le Q.A., Nii M., Otoi T. Effects of Tris (hydroxymethyl) aminomethane on the quality of frozen-thawed boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2019, 67(1): 106-114 (doi: 10.1556/004.2019.012).
 87. Kaeoket K., Chanapiwat P. The beneficial effect of resveratrol on the quality of frozen-thawed boar sperm. *Animals*, 2023, 13(18): 2829 (doi: 10.3390/ani13182829).
 88. Wasilewska K., Zasiadczyk L., Fraser L., Mogielnicka-Brzozowska M., Kordan W. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*, 2016, 51(5): 781-788 (doi: 10.1111/rda.12751).
 89. Torres M.A., Monteiro M.S., Passarelli M.S., Papa F.O., Dell'Aqua J.A. Jr., Alvarenga M.A., Martins S.M.M.K., de Andrade A.F.C. The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short-cryopreservation protocols. *Cryobiology*, 2019, 86: 58-64 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.12.004).
 90. Schäfer J., Waberski D., Jung M., Schulze M. Impact of holding and equilibration time on post-thaw quality of shipped boar semen. *Animal Reproduction Science*, 2017, 187: 109-115 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.10.014).
 91. da Silva Passarelli M., Pinoti Pavanelli A.P., Mouro Ravagnani G., Pasini Martins M., Pedrosa A.C., Massami Kitamura Martins S.M., de Alcântara Rocha N.R., Bittar Rigo V.H., Yasui G., Yeste M., de Andrade A.F.C. Effects of different equilibration times at 5 °C on boar sperm cryotolerance. *Animal Reproduction Science*, 2020, 219: 106547 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106547).
 92. Khophloiklang V., Chanapiwat P., Aunpad R., Kaeoket K. Palm kernel meal protein hydrolysates enhance post-thawed boar sperm quality. *Animals*, 2023, 13(19): 3040 (doi: 10.3390/ani13193040).
 93. Bang S., Tanga B.M., Fang X., Seong G., Saadeldin I.M., Qamar A.Y., Lee S., Kim K.J., Park Y.J., Nabeel A.H.T., Yu I.J., Cooray A., Lee K.P., Cho J. Cryopreservation of pig semen using a quercetin-supplemented freezing extender. *Life*, 2022, 12(8): 1155 (doi: 10.3390/life12081155).
 94. Soares S.L., Ancuti A.N., Dias L., Corcini C.D., Varela A.S. Jr., Komninou E.R., Tebaldi M.L., Marques M.G., Fonseca F.N., Lucia T. Jr. Safety assessment of poly(N-vinylcaprolactam) as a potential drug carrier in extenders for boar sperm cryopreservation. *Toxicology in Vitro*, 65: 104766 (doi: 10.1016/j.tiv.2020.104766).
 95. Philippe M.G., Quirino M., Schuch M., Schultz C., Vieira A.D., Mondadori R.G., Lucia T.Jr., Moreira F., Peripolli V., Marques M.G., Bianchi I. Use of a one-step freezing protocol for boar sperm with distinct cryoprotectants. *Animal Reproduction*, 2024, 54(1) (doi: 10.1590/0103-8478cr20220090).
 96. Albal M.S., Aquilina M.C., Zak L.J., Ellis P.J., Griffin D.K. Successful recovery of motile and viable boar sperm after vitrification with different methods (pearls and mini straws) using sucrose as a cryoprotectant. *Cryobiology*, 2023, 113: 104583 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2023.104583).
 97. Pezo F., Zambrano F., Uribe P., de Andrade A.F.C., Sánchez R. Slow freezing of preserved boar sperm: comparison of conventional and automated techniques on post-thaw functional quality by a new combination of sperm function tests. *Animals*, 2023, 13(18): 2826 (doi: 10.3390/ani13182826).

98. Rocha L.G.P., Zangeronimo M.G., Murgas L.D.S., Oberlender G., Pereira L.J., Pereira B.A., Chaves B.R., Silva D.M. Evaluation of two different boar semen freezing protocols and their effects on semen quality after thawing. *Animal Reproduction*, 2015, 12(4): 871-875.
99. Caamaño J.N., Tamargo C., Parrilla I., Martínez-Pastor F., Padilla L., Salman A., Fueyo C., Fernández Á., Merino M.J., Iglesias T., Merino M.J., Iglesias T., Hidalgo C.O. Post-thaw sperm quality and functionality in the autochthonous pig breed Gochu Asturcelta. *Animals*, 2021, 11(7): 1885 (doi: 10.3390/ani11071885).
100. Knox R.V., Ringwelski J.M., McNamara K.A., Aardsma M., Bojko M. The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on in vitro fertility measures of frozen-thawed boar sperm. *Theriogenology*, 2015, 84(3): 407-412 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.029).
101. Thema M.A., Mphaphathi M.L., Ledwaba M.R., Nedambale T.L. Sperm cryopreservation in Windsnyer boars; principles, technique, and updated outcomes. *Animal Reproduction*, 2023, 20(3): e20220100 (doi: 10.1590/1984-3143-AR2022-0100).
102. Tomás-Almenar C., de Mercado E. Optimization of the thawing protocol for Iberian boar sperm. *Animals*, 2022, 12(19): 2600 (doi: 10.3390/ani12192600).
103. Zhu Z., Zhang W., Li R., Zeng W. Reducing the glucose level in pre-treatment solution improves post-thaw boar sperm quality. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9 (doi: 10.3389/fvets.2022.856536).
104. Gonzalez-Castro R.A., Peca F.J., Herickhoff L.A. Validation of a new multiparametric protocol to assess viability, acrosome integrity and mitochondrial activity in cooled and frozen thawed boar spermatozoa. *Clinical Cytometry*, 102(5): 400-408 (doi: 10.1002/cyto.b.22058).
105. Osman R., Lee S., Almubarak A., Han J.-I., Yu I.-J., Jeon Y. Antioxidant effects of myo-inositol improve the function and fertility of cryopreserved boar semen. *Antioxidants*, 2023, 12(9): 1673 (doi: 10.3390/antiox12091673).
106. Ledwaba M.R., Mphaphathi M.L., Thema M.A., Pilane C.M., Nedambale T.L. Investigation of the efficacy of dithiothreitol and glutathione on in vitro fertilization of cryopreserved large white boar semen. *Animals*, 2022, 12(9): 1137 (doi: 10.3390/ani12091137).
107. Fernández-Gago R., Álvarez-Rodríguez M., Alonso M.E., González J.R., Alegre B., Domínguez J.C., Martínez-Pastor F. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma improves motility, modifies subpopulation patterns and reduces chromatin alterations. *Reproduction, Fertility and Development*, 2017, 29(8): 1576-1584 (doi: 10.1071/RD15530).
108. Li J., Li J., Wang S., Ju H., Chen S., Basioura A., Ferreira-Dias G., Liu Z., Zhu J. Post-thaw storage temperature influenced boar sperm quality and lifespan through apoptosis and lipid peroxidation. *Animals*, 2023, 14(1): 87 (doi: 10.3390/ani14010087).