

## Zastosowanie rozcieńczalników zawierających lecytynę sojową w kriokonserwacji nasienia buhajów, tryków i kozłów\*

Piotr Gogol

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa*

Kriokonserwacja nasienia jest metodą powszechnie wykorzystywaną w programach hodowlanych przeżuwaczy, szczególnie bydła, jak również w programach zachowania bioróżnorodności do tworzenia rezerwy genetycznej zagrożonych gatunków i ras zwierząt. Mrożenie nasienia pozwala w pełni wykorzystać potencjał sztucznej inseminacji, ponieważ może ono być użyte do unasienniania niezależnie od czasu i miejsca jego pozyskania. Dzięki postępowi, jaki dokonał się w ostatnich kilkudziesięciu latach w technologii mrożenia nasienia, jego jakość po rozmrożeniu znacznie poprawiła się.

Uzyskanie tej poprawy było możliwe, między innymi, dzięki wykorzystaniu właściwości osłaniających żółtka jaja kurzego i mleka, które stały się powszechnie stosowanymi składnikami rozcieńczalników do mrożenia nasienia. Jednakże, w związku z tym, że coraz większą uwagę przywiązuje się do kwestii bezpieczeństwa biologicznego i ryzyka rozprzestrzeniania się chorób związanych z międzynarodowym transportem nasienia, rozcieńczalniki żółtkowe zaczęły być postrzegane jako potencjalny nośnik patogenów. Drobnoustroje, takie jak *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Sal-*

*monella*, *Avian influenza*, *Campylobacter*, *Listeria* oraz *Mycoplasma* mogą być bowiem przenoszone przez żółtko (Thibier i Guerin, 2000). Za wyeliminowaniem komponentów zwierzęcych z rozcieńczalników i potrzebą opracowania wolnych od patogenów, alternatywnych rozcieńczalników o ściśle zdefiniowanym składzie chemicznym przemawiają następujące argumenty:

1. Żółtka jaj stanowią ryzyko skażenia bakteryjnego lub ksenobiotycznego, a co za tym idzie rozprzestrzeniania się chorób poprzez dystrybucję nasienia w kraju i na świecie;
2. Endotoksyny wytwarzane przez patogeny obecne w żółtku zmniejszają zdolność zapładniającą plemników (Bousseau i in., 1998; Aires i in., 2003);
3. Obecność wakuoli lipidowych i innych drobnych cząstek w rozcieńczalniku żółtkowym zakłóca ocenę mikroskopową oraz analizy biochemiczne i metaboliczne rozcieńczonego nasienia (Amirat i in., 2004; Singh i in., 2012; Singh i in., 2013);
4. Zróżnicowana i zmienna kompozycja drobnych cząstek występujących w żółtku jaja utrudnia kontrolę jakości rozcieńczalników na bazie żółtka (Bousseau i in., 1998);
5. Rozcieńczalniki na bazie żółtka jaja i mleka mogą zaburzać integralność strukturalną i funkcjonalną plemników po rozmrożeniu (Cheng i in., 1998; Möstl i in., 2001; Pugliesi i in., 2012).

\*Praca wykonana w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

Obiecującym substytutem składników pochodzenia zwierzęcego w rozcieńczalnikach stosowanych do mrożenia nasienia okazały się produkty uzyskiwane z soi, zwłaszcza lecytyna sojowa. Ta substancja osłaniająca pochodzenia roślinnego może skutecznie zastępować żółtko jaja, zachowując zdolność zapładniającą plemników po rozmrożeniu, minimalizując jednocześnie ryzyko przenoszenia chorób.

Rola rozcieńczalnika w konserwacji nasienia polega na przedłużeniu zdolności zapładniającej plemników – w przypadku kriokonserwacji na czas nieokreślony oraz zwiększeniu objętości ejakulowanego nasienia, co pozwala na lepsze wykorzystanie potencjału genetycznego wybranych samców na drodze sztucznej inseminacji (większa liczba dawek). Rozcieńczalnik musi przede wszystkim zapewnić odpowiednie środowisko dla komórek plemnikowych. Główne wymagania, jakie musi spełnić rozcieńczalnik, to: utrzymanie odpowiedniego ciśnienia osmotycznego, odczynu pH z właściwym buforowaniem i dostarczenie substratów wykorzystywanych w metabolizmie plemników (Salamon i Maxwell, 2000). W przypadku zamrażania nasienia niezbędne jest dodanie krioprotektanów – substancji, które chronią plemniki przed uszkodzeniami na skutek szoku chłodowego podczas schładzania nasienia do temperatury zbliżonej do 0°C oraz uszkodzeniami spowodowanymi tworzeniem się kryształków lodu wewnątrz plemników podczas zamrażania.

W przypadku nasienia przeżuwaczy opracowano i przetestowano z różnym powodzeniem szereg rozcieńczalników zawierających takie składniki, jak: cukry, elektrolity, bufony, żółtko jaja, mleko, lecytyna sojowa i krioprotektanty. Najbardziej typowe rozcieńczalniki do zamrażania plemników zawierają: krioprotektanty penetrujące, czyli zdolne do przenikania przez błonę komórkową (najczęściej glicerol), krioprotektanty niepenetrujące (mleko lub jego produkty, żółtko jaja lub jego pochodne, takie jak lipoproteiny lub fosfolipidy), bufor organiczny (najczęściej tris-hydroksymetyloaminometan), cukry jako substrat energetyczny i dla zapewnienia odpowiedniego ciśnienia osmotycznego (glukoza, fruktoza, laktoza, rafinoza, sacharoza lub trehaloza), substancje zapewniające odpowiednie pH i osmo-

larność (cytrynian sodu, kwas cytrynowy) oraz antybiotyki. Rozcieńczalniki oparte na żółtku jaja i glicerolu były pierwszymi, które pozwoliły na uzyskanie odpowiedniej ruchliwości i zdolności zapładniającej plemników po rozmrożeniu. Dzięki temu metoda kriokonserwacji nasienia buhajów jest powszechnie stosowana od lat i odniosła komercyjny sukces (Gebauer i in., 1970).

Pierwszymi rozcieńczalnikami stosowanymi do kriokonserwacji nasienia tryków były rozcieńczalniki cytrynianowo-węglowodanowe, z powodzeniem stosowane wcześniej do mrożenia nasienia buhajów. Oprócz cytrynianu sodu i cukru w ich skład wchodziły najczęściej: żółtko jaja, glicerol i antybiotyki. Podobnie jak przy konserwacji nasienia w stanie płynnym, zastosowanie znalazły również rozcieńczalniki przygotowywane z pełnego lub chudego mleka w proszku. Ich skład był najczęściej uzupełniany glukozą lub innym cukrem i żółtkiem jaja oraz glicerolem lub innym związkiem osłaniającym (Zamfirescu i in., 1980). Pozytywnie na przeżywalność plemników wpływał dodatek Tris i laktozy. Szereg rozcieńczalników opracowano z użyciem laktozy, często stosowanej z żółtkiem jaja.

Metodyka stosowana z powodzeniem do mrożenia nasienia tryków okazała się nie w pełni przydatna w kriokonserwacji nasienia kozłów. Stwierdzono bowiem, że rozcieńczalniki na bazie żółtka jaja kurzego lub odtłuszczonego mleka w proszku mogą negatywnie oddziaływać na plemniki kozłów. Po rozcieńczeniu nasienia obserwowano koagulację żółtka i spadek ruchliwości plemników. Ustalono, że żółtko jaja ulega koagulacji pod wpływem enzymu produkowanego w gruczołach opuszkowo-cewkowych kozłów. Enzym ten nazwano EYCE (enzym koagulujący żółtko jaja) (Roy, 1957). Zidentyfikowano również inny enzym (BUSgp60), pochodzący z gruczołu opuszkowo-cewkowego, który negatywnie wpływa na plemniki kozłów rozcieńczone w rozcieńczalniku mlekowym (Iritani i Nishikawa, 1963; Pellicer-Rubio i in., 1997). Obecność tego enzymu indukowała reakcję akrosomową i powodowała spadek ruchliwości plemników inkubowanych w rozcieńczalniku na bazie mleka (Pellicer-Rubio i in., 1997). Enzym EYCE działa jak katalizator, który hydrolizuje lecytynę żółtka jaja do kwasów tłuszczowych i lizolecytyny. Po-

wstające produkty uszkodzają błonę plemników, indukują reakcję akrosomową i powodują decondensację chromatyny (Sawyer i Brown, 1995; Upreti i in., 1999). Lipaza BUSgp60, podobnie jak EYCE jest odpowiedzialna za hydrolizę trójglicerydów znajdujących się w błonie plazmatycznej oraz w mleku. W efekcie dochodzi do produkcji kwasów tłuszczowych z żółtka oraz kwasu oleinowego z mleka, które są toksyczne dla plemników kozłów (Pellicer-Rubio i in., 1997; Pellicer-Rubio i Combarous, 1998). Metodą, pozwalającą uniknąć niepożądaną reakcji pomiędzy osoczem nasienia a żółtkiem jaja lub mlekiem, jest rozcieńczenie świeżego nasienia w zbuforowanym rozcieńczalniku, a następnie oddzielenie plemników od osocza poprzez wirowanie (Corteel, 1974; Memon i in., 1985; Singh i in., 1995; Leboeuf i in., 1998). Zdania na ten temat są jednak podzielone, gdyż część badaczy uważa, że usunięcie osocza nasienia nie jest konieczne dla zachowania dobrej ruchliwości plemników i integralności akrosomów po rozmrożeniu (Ritar i Salamon, 1982). Proponuje się również użycie alternatywnych rozcieńczalników, których skład zapobiegnie wystąpieniu interakcji między lipazami i plemnikami. Taką alternatywą mogą być rozcieńczalniki na bazie składników roślinnych a nie pochodzenia zwierzęcego (żółtko, mleko). Lecytyna sojowa różni się od lecytyny z żółtka jaja składem lipidów i zawartością kwasów tłuszczowych (le Grandois i in., 2009), dlatego inaczej będzie reagować w obecności enzymów obecnych w nasieniu kozłów.

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących przydatności alternatywnych rozcieńczalników zawierających substancje osłaniające pochodzenia roślinnego, w tym także komercyjnych, jak Biociphos, Bioxcell, Andromed i inne. Hinsch i in. (1997) porównali komercyjny Biociphos (bazujący na ekstraktach sojowych) z innym rozcieńczalnikiem komercyjnym – Triladył (bazującym na żółtku jaja) poprzez ocenę żywotności, stanu akrosomów i ruchliwości plemników buhajów holsztyńsko-fryzyjskich oraz wskaźników niepowlarzalności rui po inseminacji (60 i 90 dni). Nie stwierdzono istotnych różnic w badanych parametrach pomiędzy rozcieńczalnikami. W innym eksperymencie przeprowadzonym na nasieniu buhajów – Biociphos

wykazywał 56-dniowy wskaźnik niepowlarzalności rui, podobny jak rozcieńczalnik na bazie żółtka jaja i Tris (van Wagtendonk-de Leeuw i in., 2000). Wyższą płodność natomiast (56-dniowy wskaźnik niepowlarzalności rui) uzyskano po użyciu nasienia mrożonego w rozcieńczalniku opartym na lecytynie sojowej (Andromed) niż na żółtku jaja w badaniach przeprowadzonych przez Aires i in. (2003). Z kolei, lepszą przeżywalność plemników stwierdzono po mrożeniu nasienia w rozcieńczalniku żółtkowym (Biladył) w porównaniu do rozcieńczalników zawierających lecytynę sojową (Andromed, Biociphos Plus) (Muiño i in., 2007; Arifiantini i Yusuf, 2010). W badaniach mikrobiologicznych nie stwierdzono zanieczyszczeń w rozcieńczalniku zawierającym lecytynę sojową (Biociphos plus), podczas gdy zanieczyszczenia bakteriologiczne występowały w tych, które zawierały żółtko jaja (Triladył) oraz żółtko jaja i mleko (Lacifos). Pomimo tego, nie wykazano różnicy w zdolności zapładniającej pomiędzy badanymi rozcieńczalnikami (Bousseau i in., 1998).

Rozcieńczalniki na bazie soi były również wykorzystywane do mrożenia nasienia kozłów i tryków, a uzyskiwane wyniki jakości nasienia po rozmrożeniu i płodności były porównywalne (Salmani i in., 2013; Mata-Campuzano i in., 2015; Masoudi i in., 2016 a,b) lub lepsze (Sariözkan i in., 2010; Emamverdi i in., 2013; Chelucci i in., 2015) w stosunku do rozcieńczalników żółtkowych. Ponadto, w przypadku nasienia kozłów użycie rozcieńczalnika na bazie soi pozwoliło na zrezygnowanie z wirowania nasienia celem usunięcia osocza.

Wyeliminowano w ten sposób przypadki obserwowane dla rozcieńczalnika żółtkowego, gdzie po dodaniu rozcieńczalnika następował gwałtowny spadek ruchliwości plemników jeszcze przed mrożeniem. Jest to efekt braku interakcji pomiędzy lecytyną sojową a enzymami obecnymi w osoczu nasienia kozłów. Przy stosowaniu uproszczonej procedury mrożenia (bez wirowania) i rozcieńczalnika na bazie soi uzyskano znacznie wyższy odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu w porównaniu z procedurą obejmującą wirowanie nasienia i zamrażanie w rozcieńczalniku żółtkowym (Roof i in., 2012).

Reasumując, badania nad wykorzystaniem substytutów roślinnych białek zwierzęcych

w kriokonserwacji nasienia wskazują na wysoką przydatność produktów sojowych. Rutynowo stosowane rozcieńczalniki zawierające składniki pochodzenia zwierzęcego mogą zostać zastąpione rozcieńczalnikami na bazie soi bez obniżania jakości nasienia i jego zdolności zapładniającej po rozmrożeniu. Takie rozcieńczalniki, zawiera-

jące wyłącznie składniki roślinne, eliminują ryzyko rozprzestrzeniania patogenów, jednak ich szeroka akceptacja i dalsze rozpowszechnienie w rozrodzie zwierząt wymaga kontynuowania badań nad optymalizacją ich składu i technologii kriokonserwacji w celu uzyskania jeszcze bardziej satysfakcjonujących efektów.

### Literatura

- Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schoedder S., Hinsch E. (2003). *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60: 269–279.
- Amirat L., Tainturier D., Jeanneau L., Thorin C., Gérard O., Courtens J.L., Anton M. (2004). Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61: 895–907.
- Arifiantini R.I.I.S., Yusuf T.L. (2010). Developing of tris soy milk diluent for frisian holstein bull frozen semen. *Hayati J. Biol.*, 17: 91–94.
- Bousseau S., Brillard J.P., Marquant-Le Guienne B., Guerin B., Camus A., Lechat M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of *Bovine semen* frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50: 699–706.
- Chelucci S., Pasciu V., Succu S., Addis D., Leoni G.G., Manca M.E., Naitana S., Berlinguer F. (2015). Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, 83 (6): 1064–1074.
- Cheng F.P., Gadella B.M., Voorhout W.F., Fazeli A., Bevers M.M., Colenbrander B. (1998). Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol. Reprod.*, 59: 733–742.
- Corteel J.M. (1974). Viabilite des spermatozoids de bouc conserves et congeles avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose (Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 14: 741–745.
- Emanverdi M., Zhandi M., Zare Shahneh A., Sharafi M., Akbari-Sharif A. (2013). Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. *Reprod. Domest. Anim.*, 48: 899–904.
- Gebauer M.R., Pickett B.W., Komarek R.J., Gaunya W.S. (1970). Motility of bovine spermatozoa extended in “defined” diluents. *J. Dairy Sci.*, 53: 817–823.
- Grandois J. le, Marchioni E., Zhao M., Giuffrida F., Ennahar S., Bindler F. (2009). Investigation of natural phosphatidylcholine sources: separation and identification by liquid chromatography-electro-spray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS2) of molecular species. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 6014–6020.
- Hinsch E., Hinsch K.D., Boehm J.G., Schill W.B., Mueller-Schloesser F. (1997). Functional parameters and fertilization success of Bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. *Reprod. Domest. Anim.*, 32: 143–149.
- Iritani A., Nishikawa Y. (1963). Studies of the egg yolk coagulating enzyme in goat semen. IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 8: 113–117.
- Leboeuf B., Manfredi E., Boue P., Piacere A., Brice G., Baril G., Broqua C., Humblot P., Terqui M. (1998). Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest. Prod. Sci.*, 55: 193–202.
- Masoudi R., Sharafi M., Zare Shahneh A., Towhidi A., Kohram H., Zhandi M., Esmaeili V., Shahverdi A. (2016 a). Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin- and egg yolk-based extenders. *Theriogenology*, 86 (6): 1583–1588.
- Masoudi R., Sharafi M., Zareh Shahneh A., Towhidi A., Kohram H., Esmaeili V., Shahverdi A., Davachi N.D. (2016 b). Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*, 73: 69–72.
- Mata-Campuzano M., Álvarez-Rodríguez M., Álvarez M., Tamayo-Canul J., Anel L., Paz P. de, Martínez-Pastor

- F. (2015). Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*, 83 (4): 520–528.
- Memon M.A., Bretzlaff K.N., Ott R.S. (1985). Effects of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 473–475.
- Möstl E., Spendier H., Kotrschal H. (2001). Concentration of immunoreactive progesterone and androgens in the yolk of hen's eggs (*Gallus domesticus*). *Vet. Med. Aust.*, 88: 62–65.
- Muiño R., Fernandez M., Pena A.I. (2007). Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod. Domest. Anim.*, 42: 305–311.
- Pellicer-Rubio M.T., Combarous Y. (1998). Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.*, 112: 95–105.
- Pellicer-Rubio M.T., Magallon T., Combarous Y. (1997). Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.*, 57: 1023–1031.
- Pugliesi G., Carvalho G.R. de, Rates D.M., Ker P.G., Matta M.P. da, Oliveira R.R. de, Filho J.M.D. (2012). Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *R. Bras. Zootecnia*, 41: 2411–2417.
- Ritar A.J., Salamon S. (1982). Effects of seminal plasma and of its removal and egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35: 305–312.
- Roof D.J., Bowley S., Price L.L., Matsas D.J. (2012). Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, 77 (2): 412–420.
- Roy A. (1957). Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 179: 318–319.
- Salamon S., Maxwell W.M. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77–111.
- Salmani H., Nabi M.M., Vaseghi-Dodarana H., Rahman M.B., Mohammadi-Sangcheshmehd A., Shakeri M., Towhidi A., Shahneha A.Z., Zhandi M. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Rumin. Res.*, 112: 123–127.
- Sariözkan S., Bucak M.N., Tuncer P.B., Taşdemir U., Kinet H., Ulutaş P.A. (2010). Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology*, 73 (3): 316–323.
- Sawyer D.E., Brown D.B. (1995). The use of an *in vitro* sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod. Toxicol.*, 9: 351–357.
- Singh M.P., Sinha A.K., Singh B.K. (1995). Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43: 1047–1053.
- Singh A.K., Singh V.K., Narwade B.M., Mohanty T.K., Atreja S.K. (2012). Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk- and soya milk-based extenders. *Reprod. Domest. Anim.*, 47: 596–600.
- Singh V.K., Singh A.K., Kumar R., Atreja S.K. (2013). Development of soya milk extender for semen cryopreservation of Karan Fries (crossbreed cattle). *Cryo Letters*, 34: 52–61.
- Thibier M., Guerin B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 233–251.
- Upreti G.C., Hall E.L., Koppens D., Olivier J.E., Vishwanath R. (1999). Studies on the measurement of phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) and PLA<sub>2</sub> inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 56: 107–121.
- van Wagendonk-de Leeuw A.M., Haring R.M., Kaal-Lansbergen L.M.T.E., Dass J.H.G. den (2000). Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*, 54: 57–67.
- Zamfirescu S., Vicovan A., Barbulescu I. (1980). Results of artificial insemination in sheep using frozen semen. *Rev. Cresterea Anim.*, 30: 11–15.

## USE OF SOYBEAN LECITHIN EXTENDERS FOR CRYOPRESERVATION OF BULL, RAM AND BUCK SEMEN

### Summary

The advances that have been made over the last few decades in semen freezing technology have considerably improved post-thaw sperm quality. This improvement was ensured, among others, by the protective effects of hen's egg yolk and milk, which became commonly used as components of semen freezing extenders. However, with the growing attention to biosecurity and control of diseases related to international semen transport, yolk extenders are now seen as a potential carrier of pathogens. The growing concerns about the use of animal derived components in semen extenders provided motivation for finding alternative extenders containing plant cryoprotectants, which would be effective for viability and fertilizing capacity of spermatozoa while minimizing the risk of disease transmission. Research with plant substitutes of animal proteins has shown the high suitability of soybean products. The routinely used extenders containing animal components could be replaced with soybean-based extenders without compromising semen quality and post-thaw fertilizing capacity. Such extenders, which only contain plant components, eliminate the risk of spreading pathogens, but their broad acceptance and dissemination in animal reproduction requires continued studies on optimizing their composition and cryopreservation technology to obtain the highest fertilizing capacity of the semen post-thaw.

**Key words:** semen cryopreservation, soybean lecithin, cryoprotectants



Fot.: E. Atkonson, B. Borys, archiwum

