Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.
Серія: Сільськогосподарські науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.
Series: Agricultural sciences

ISSN 2519-2698 print

ISSN 2707-5834 online

doi: 10.32718/nvlvet-a9318

<https://nvlvet.com.ua/index.php/agriculture>

UDC 636.32/38:591.16.612.063

Cryopreservation of ram-sires semen and its qualitative changes under the influence of low temperatures

K. Hrymak

Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, Ukraine

Article info

Received 03.09.2020

Received in revised form

05.10.2020

Accepted 06.10.2020

Institute of Animal Biology NAAS,
V. Stus Str., 38, Lviv,
79034, Ukraine.
Tel.: +38-093-235-95-55
E-mail: phm89@ukr.net

Hrymak, K. (2020). Cryopreservation of ram-sires semen and its qualitative changes under the influence of low temperatures. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural sciences, 22(93), 102–112. doi: 10.32718/nvlvet-a9318

The article presents in retrospect the methods of cryopreservation of sperm of bulls and breeding rams. It is indicated that the first methods were proposed by I.V. Smirnov in 1947–1951, which ensured the production of viable lambs and calves. The significant contribution to the development of the method of cryopreservation of bull sperm by British scientists Polge C. and Rawson L. and Japanese scientists Nagase H. and Niwa T. The methods developed by them, with minor changes, have been used by scientists and breeding specialists for many decades. Modern technologies of cryopreservation of bull sperm are represented, in particular: Kharkiv in coated granules (author FI Ostashko and others), French company IMV-R-Cassou, German company Minitub, which are currently used in most countries with developed animal husbandry. It is noted that the first attempts to freeze the sperm of breeding rams were made by E. M. Platov in 1965. It is noted that in the cryopreservation of sperm the importance of adaptation and equilibration processes is important. The role of glycerin as a cryoprotectant in freezing the semen of male farm animals has been elucidated. The optimal concentration of glycerin in the media for cryopreservation of sperm of fetuses has been established. It is noted that the basis of “temperature shock” of sperm is damage to the sperm membrane, which is caused by balancing the concentration gradient that occurs at the boundary of cell-medium division with a sharp change in temperature. A high correlation between the physiological quality of the acrosome of sperm and its fertilizing ability is indicated. Studies of the chemical composition of the sperm of breeding rams have shown that it differs from the sperm of other animal species by a slightly higher content of proteins, lipids of lactic acid and a lower concentration of minerals. Proteins contain much more amino acids. Sheep sperm do not tolerate aerobic conditions, it is proved that damage to sperm by oxygen occurs mainly after its dilution and equilibration, and not during cryopreservation. Under aerobic conditions, one amino acid is cleaved from the molecule of lecithin, which is part of the membranes of sperm, with the formation of toxic lysolecithin. The most critical zones at thawing of deep-frozen sperm are shown. It has been experimentally established that the rate of the recrystallization process can be reduced by using cryoprotectants in environments, as well as by increasing the rate of thawing. An important influence in the thawing of sperm has the selection of the optimal mode of thawing. Analysis of literature data revealed that in practical conditions in the process of freezing – thawing about 50% of sperm lose activity, which indicates that currently available methods of freezing sperm of breeding rams are imperfect and need further study and improvement.

Key words: breeding rams, semen, cryopreservation, thawing, equilibration, cryoprotectants, fertilizing ability.

Кріоконсервування сперми баранів-плідників та її якісні зміни за дії низьких температур

Х. М. Гримак

Інститут біології тварин НААН, м. Львів, Україна

У статті подано в ретроспективі методи кріоконсервування сперми бугаїв та баранів-плідників. Вказано, що перші методики були запропоновані І. В. Смирновим 1947–1951 роках, які забезпечили одержання життєздатних ягнят і телят. Підкреслено вагомий внесок у розробці методу кріоконсервування сперми бугаїв англійських вчених Polge C. і Rawson L. та японських вчених Nagase H. і Niwa T. Розроблені ними методи, із незначними змінами, застосовували науковці та спеціалісти племінної служби протягом багатьох десятиріч. Репрезентовано сучасні технології кріоконсервування сперми бугаїв, зокрема: харківську в облицьованих гранулах (автор Ф. І. Осташико та інші), французьку фірми IMV-R-Cassou, німецьку фірми Minitub, які використовуються в даний час у більшості країн світу з розвинутим тваринництвом. Відмічено, що перші спроби заморожування сперми баранів-плідників здійснив Е. М. Платов у 1965 році. Зазначено, що при кріоконсервуванні сперми важливе значення належить процесам адаптації та еквілібрації. З'ясована роль гліцерину, як кріопротектора при заморожуванні сперми самців сільськогосподарських тварин. Встановлена оптимальна концентрація гліцерину у середовищах для кріоконсервування сперми плідників. Відмічено, що основою "температурного шоку" спермій є пошкодження мембрани спермія, яке викликане внаслідок збалансування концентраційного градієнта, що виникає на межі поділу клітини-середовища за різкої зміни температури. Вказано на високу кореляцію між фізіологічною якістю акросоми спермія і його запліднювальною здатністю. Дослідженнями хімічного складу сперми баранів-плідників встановлено, що вона відрізняється від сперми інших видів тварин дещо вищим вмістом білків, ліпідів, молочної кислоти і меншою концентрацією мінеральних речовин. До складу білків входить значно більше амінокислот. Спермії баранів погано переносять аеробні умови, доведено, що пошкодження сперми киснем відбувається переважно після її розбавлення і еквілібрації, а не під час кріоконсервування. В аеробних умовах проходить відщеплення однієї амінокислоти із молекули лецитину, який входить до складу мембран спермій, із утворенням токсичного лізолецитину. Показано найбільш критичні зони при розморожуванні глибокозамороженої сперми. Експериментально встановлено, що швидкість процесу рекристалізації можна зменшити шляхом застосування у середовищах кріопротекторів, а також підвищенням швидкості відтавання. Важливий вплив при розморожуванні сперми має підбір оптимального режиму відтавання. Аналізом літературних даних виявлено, що у практичних умовах в процесі заморожування-розморожування близько 50 % спермій втрачають активність, а це свідчить, що наявні на даний час методи заморожування сперми баранів-плідників недосконалі і потребують подальшого вивчення та поліпшення.

Ключові слова: барани-плідники, сперма, кріоконсервування, розморожування, еквілібрація, кріопротектори, запліднювальна здатність.

Вступ

Результативність ведення галузі вівчарства значною мірою визначається ефективною селекційно-племінною роботою та широким застосуванням сучасних біотехнологічних методів відтворення, зокрема штучного осіменіння вівцематок деконсервованою спермою (Voronenko et al., 2009; Pokhyl et al., 2011; Mykutyntyn et al., 2013).

Ефективність методу штучного осіменіння тварин обумовлена можливістю зберігання сперми поза організмом самця і високим ступенем її розбавлення. У зв'язку з тим цей метод став основним важелем швидкого і масового покращення породного складу маточного поголів'я. Ще значно більші перспективи з'явилися у цьому аспекті з відкриттям у 1947–1949 роках І. В. Смирновим довготривалого зберігання сперми у глибокозамороженому стані (Smirnov, 1949). Автор розробив глюкозо-цитратно-жовткове середовище, в якому розбавляв сперму, поміщав її у пакети з фольги по 0,05 мл і охолоджував до температури – 79 °C або 196 °C. Потім розморожував у водяній бані за температури +38–40 °C. За такої методики близько 15–30 % спермій зберігали прямолінійний поступальний рух. Після багаторазових осіменень 18 піддослідних овець було одержано 12 нормальних життєздатних ягнят. У 1951 році були отримані перші телята від осіменіння корів деконсервованою спермою (Smirnov, 1951). Водночас англійські вчені С. Н. Polge, L. E. A. Rowson (1952) запропонували методику повільного багатоступінчастого заморожування сперми у скляних ампулах, яка при частковій зміні режиму заморожування, середовища, адаптації і еквілібрації застосовувалась у багатьох країнах світу, понад десять років залишаючись в основному незмінною: двомоментне розбавлення сперми і триступінчастий режим заморожування.

Виробнича перевірка цього методу показала, що сперма після розморожування володіла задовільною

активністю і запліднюючою здатністю. Цей метод мав важливий вплив на подальшу розробку і впровадження у виробництво низькотемпературного заморожування і зберігання сперми.

Однак застосовувана методика С. Н. Polge, L. E. A. Rowson (1952) для кріоконсервування сперми бугаїв виявилася непридатною для заморожування статевих клітин баранів. У досліджах I. White et al. (1954) після розморожування спермій баранів активність їх становила близько 50 %, а запліднювальна здатність лише 4,0 відсотка (Emmens & Blackshaw, 1955).

У досліджах А. И. Лонирина, Н. В. Логиновой (Lopyrin & Loginova, 1958); В. А. Морозова (Morozov, 1957); М. П. Кузнецова, Л. П. Купрянова (Kuznetsov & Kupriyanova, 1959) застосування гіпертонічних глюкозо-цитратно-жовткових середовищ з осмотичним тиском 8,8–12,5 атмосфери і вмістом гліцерину 7,5–8,0 % та скороченням еквілібрації до 3–4 годин дещо покращувало активність деконсервованих спермій, проте запліднювальна здатність їх була низькою у межах 22 відсотка. Значно кращі результати за якістю деконсервованої сперми і запліднювальною здатністю були одержані при застосуванні для розбавлення сперми ізотонічних глюкозо-цитратних середовищ (Korotkov et al., 1960; Matskepladze et al., 1960).

Н. Nagase, T. Niwa (1964) повідомили про новий розроблений ними метод заморожування сперми у гранулах. Свіжоодержану сперму бугаїв розбавляли лактозо-гліцеринно-жовтковим середовищем у співвідношенні 1:1, 1:3 з таким розрахунком, щоб у об'ємі 0,1–0,2 мл була стандартна доза активних спермій. Еквілібрація сперми тривала 4–6 годин, після чого піддавалась швидкому заморожуванню на блоках сухого льоду протягом 10 хвилин. Швидкість охолодження каплі сперми становила 20–30 °C за хвилину. Створені у ямках сухого льоду гранули поміщали в сухий лід або рідкий азот. Розморожували гранули за

температури 30–40 °C у 3 % розчині лимоннокислого натрію. Цей метод мав декілька модифікацій і був широко поширений у багатьох країнах світу.

Н. П. Ющенко, В. Г. Семаков, К. А. Левин (1963) удосконалили вищевказаний метод, замінивши блок вуглекислоти фторопластовою пластиною, охолодженою рідким азотом, і впровадили його на племпідприємствах колишнього Радянського Союзу. Даний метод мав ряд переваг над раніше запропонованим. Заморожування сперми проходило значно швидше, а затрати часу і праці на технологічну обробку були меншими (Yuschenko et al., 1963).

Перші спроби заморожування сперми баранів-плідників у гранулах здійснив Е. М. Платов (Platov, 1965). Для розбавлення автор використав ізотонічне лактозо-жовткове середовище з вмістом 3,5–4 % гліцерину та еквілібрацією 3–4 години за температури +2 +4 °C.

S. Salamon (1967), проводячи заморожування сперми баранів у глюкозо-цитратно-жовтковому середовищі в ампулах, гранулах і пайетах, не виявив істотних відмінностей у якості деконсервованих спермій. Порівнюючи глюкозо-цитратно-жовткове і лактозо-жовткове середовище для заморожування сперми баранів із вмістом гліцерину відповідно 5 і 7 % Г. Калев та ін. (1970) не виявили суттєвої різниці у якості деконсервованих спермій, їх активність становила 37–43 %, а запліднювальна здатність близько 24 відсотка.

Ф. І. Осташко, В. А. Шинкаренко (Ostashko & Shinkarenko, 1972) інформували про нову технологію кріоконсервування сперми в облицьованих гранулах. Її застосування забезпечило підвищення заплідненості сперми, автоматизацію трудомістких процесів у лабораторіях племпідприємств, удосконалення оцінки сперми, мінімізацію дози сперми і її упаковки, практично вилучивши мікробний фактор при штучному осіменінні корів і телиць.

Дещо раніше у Франції фірмою Instrumens Medecine Veterinaire (IMV), R-Cassou (1964) була розроблена і впроваджена у виробництво технологія заморожування сперми у пайетах місткістю 0,5 мл. Для розбавлення сперми використовують середовище “Лецифос-271” або “Лецифос-470”. Заморожування проводиться протягом 9–10 хвилин у спеціальному штативі над поверхнею рідкого азоту. Швидкість заморожування сперми у пайетах, (тонкостінних пластмасових капілярах) над поверхнею рідкого азоту приблизно така, як при заморожуванні гранул на фторопластових пластинах 20–30 °C за хвилину. Розморожують сперму зануренням соломинок у водяну баню за температури +34 °C.

На основі цієї технології у Німеччині фірмою Minitub GmbH-Abfull-U. Labortechnik розроблена аналогічна технологія з використанням тонкостінних пайет (соломинок) місткістю 0,25 мл. Технологічна лінія “Minitub” комплектується модулями ІДА, Sperm Vision, Spart Dispenser і комбісистемою для розфасовки сперми у пайети MPP Quattro з друкуємим принтером Leibinger Jet 2. Вказане обладнання технології виключає суб’єктивний фактор за оцінки нативної і деконсервованої сперми та автоматичне дозування

розбавника. Застосування маркувальної машини надає можливість друкувати вичерпну інформацію про плідника і виробника на кожний пайеті – спермодози.

Для розбавлення еякуляту сперми використовують середовище “Андромед”, яке не містить білків тваринного походження, і його кріопротекторні властивості ґрунтуються на соєвому лецитині. До середовища також входять: фруктоза, трис, гліцерин і антибіотики. Розведення сперми проводять згідно з комп’ютерною програмою ІДА “Minitub”. Кінцева концентрація спермій у дозі 15 млн активних спермій. Після розбавлення сперму фасують у пайети, ставлять у холодильну камеру на 2,5–4 години для еквілібрації, потім на програмному заморожувачі піддають кріоконсервуванню у парах азоту за температури –120 °C протягом 10 хв і переносять пайети у рідкий азот для тривалого зберігання.

Проте застосування кріоконсервування сперми сучасними методами у практичних умовах підтверджує, що в процесі заморожування-розморожування близько 50 % спермій втрачають активність, це свідчить про недосконалість розроблених і вживаних на даний час технологій.

Важливе значення при кріоконсервуванні сперми належить процесом адаптації і еквілібрації. Так, С. Polge, L. Rawson (Polge & Rawson, 1952), Т. Ильинская (Ilinskaya, 1956), Х. Х. Хабибуллин (Habibullin, 1958), J. C. A. Martin (Martin, 1963), Ф. І. Осташко, М. І. Лопатко (Ostashko & Lopatko, 1965), А. Д. Бугров (Buhrov, 1965) та інші встановили, що витримання сперми протягом декількох годин за пониженої температури сприяє поліпшенню її якості після заморожування і визначили цей процес як при звичаювання спермій до низьких температур.

Цитоплазматична мембрана спермія є активним органом, що забезпечує строго визначене дотримання у протоплазмі електролітного складу, рН, осмотичного тиску, тощо. Ф. І. Осташко (Ostashko, 1968), В. І. Канцедаль (1969) зазначають, що в охолодженій спермі до 0 °C проходить перерозподілення концентрації іонів між середовищем і клітинною. Іони Натрію частково переміщуються з навколишнього середовища у клітину, а іони Калію – із клітини у плазму. На погляд авторів, таке переміщення іонів проходить у результаті припинення активної діяльності цитоплазматичної мембрани.

Отже, адаптація – перший етап переходу спермія в анабіотичне положення, що, безсумнівно, важливо у технології заморожування сперми. Не менш вагомим є процес еквілібрації сперми, тобто урівноваженість концентрації кріопротекторів між середовищем і клітиною.

Відкриття американським вченим В. Luyet (Luyet 1937; Luyet & Hodapp, 1938) явища вітрифікації за якої швидкість заморожування води досягає рівня 5000 0 °C/c, що у практичних умовах застосовувати неможливо, сприяло розробці методу глибокого заморожування сперми з використанням кріопротекторів, зокрема гліцерину.

Захисна дія гліцерину вперше була встановлена Н. А. Максимовим (Maksimov, 1913; 1929) у середо-

вищах при заморожуванні рослин. Застосування гліцерину при заморожуванні сперми сільськогосподарських тварин англійськими вченими С. Polge, A. Smith, A. Parvs (Polge et al., 1949), С. Polge, L. E. A. Rowson (Polge & Rowson, 1952), С. Polge (Polge, 1953) забезпечило розробку методу кріоконсервування сперми савців.

Довготривалі та всебічні наукові дослідження зі кріоконсервування сперми тварин дали можливість І. В. Смирнову (Smirnov, 1974) висунути гіпотезу про одночасне протікання процесів кристалізації міжклітинної рідини і вітрифікації клітин. Згідно з цією теорією, за повільного охолодження сперми вільна вода поза і всередині клітини замерзає у виді кристалів і це призводить до загибелі спермій. При швидкому зануренні спермій у рідкий азот спермії теж гинуть, оскільки вода не встигає вийти із клітини, а для її вітрифікації потрібні недосяжні у практиці швидкості. Однак за охолодження з оптимальною швидкістю міжклітинна рідина кристалізується і утворює концентровані розчини солей і цукрів. Під дією концентрованих розчинів та осмотичного тиску із сперми виділяється вільна вода. Вода, що зв'язана з білками, значно відрізняється за властивостями від вільної, тому вітрифікується або утворюються дрібні кристали, які не пошкоджують клітину.

Е. М. Платов (1973) довів, що існує безпосередній зв'язок між швидкістю заморожування, формою кристалів і виживаністю спермій (Platov, 1973). На його погляд, вся внутрішньо- і позаклітинна вода в охолодженій і замороженій спермі перебуває у структурованому псевдокристалічному стані, що сприяє вітрифікації. Захисна дія гліцерину і цукрів пов'язана із структурізацією ними води і систематизацією структури. На думку Ф. І. Осташко (1968), механічне пошкодження спермій кристалами льоду малоімовірно через малі розміри спермій та еластичність їхніх мембран (Ostashko, 1968).

Гліцерин справляє специфічну осмотичну дію на спермії і на певний період створює осмотичний тиск, а після проникнення всередину спермія знову створює гіпотонію. За швидкого розбавлення сперми ізотонічними розчинами з вмістом гліцерину з'являється багато спермій з маневними рухами, скривлених, які рухаються вперед із зігнутою головою (Smirnov, 1963; 1964; Ostashko & Buhrov, 1966).

У початкових експериментах (Polge & Rawson, 1952; Habibullin, 1957; Ostashko, 1959; 1960; Roslanovskiy, 1963; Pakenas 1963) сперму бугаїв розбавляли середовищами з кінцевою концентрацією гліцерину 7–10 % з повільним наповненням ним сперми із піднашарованого середовища за температури +4–5 °C і еквілібрацією 18–24 години. Деякі автори рекомендували додавати гліцерин у середовище для заморожування сперми кількома порціями з інтервалом до 10 хвилин. Пізніше Ф. І. Осташко, М. І. Лопатко (Ostashko & Lopatko, 1965) та інші встановили, що оптимальна кількість гліцерину у середовищах складає 5–8 відсотків. Вивчаючи осмотичну дію гліцерину на спермії бугая Е. М. Платов (Platov, 1960; 1963), Н. Nagase (Nagase, 1964), О. Д. Бугров (Buhrov, 1965), Ф. І. Осташко, О. Д. Бугров (Ostashko & Buhrov, 1966)

розробили методику одномонентного розбавлення сперми гліцеринізованими середовищами за кімнатної температури.

А. С. Яцун, Т. Н. Ільїнська (Yatsun, & Ilinskaya, 1969), А. С. Волков (Volkov, 1971) повідомили, що гліцерин із середовища сперми за температури, близької до 0 °C, а також у процесі заморожування не проникає через оболонку у спермії. Дослідники припускали, що кріозахисний його вплив проявляється у взаємодії зі складниками середовища у змінюванні його фізико-хімічних властивостей. W. E. Berndtson, R. H. Foote (Berndtson & Foote, 1972) В. А. Наук, Г. Е. Дарій (Nauk, 1974) теж вважали, що для кріозахисту спермій не обов'язкове проникнення гліцерину всередину, достатньо екстрацелюлярної кріопротекції. Проте проведенні дослідження (Kushnir, 1974; Zvereva, 1976) свідчать про швидке проникнення гліцерину у спермії, що суперечить раніше одержаним результатам досліджень вчених про повільне його проникнення.

Для еквілібрації сперми необхідний відповідний період часу. У процесі вивчення еквілібраційного періоду були запропоновані різні його терміни. Так, С. Polge, L. E. A. Rowson (Polge & Rawson, 1952), Т. П. Ильинская (Ilinskaya, 1963), П. И. Пакенас (Pakenas, 1963), О. Д. Бугров (Bugrov, 1965) рекомендували насичувати сперму гліцериним 16–24 години. Однак, ряд авторів повідомили про успішне заморожування сперми бугаїв протягом значно коротшого еквілібраційного періоду – до 4 годин W. J. Odell, I. O. Almquist (1954, 1957), до 2 годин (Miller & VanDemark, 1954) і до 30 хвилин (Emmens & Blackshow, 1955; Wiggin & Almquist, 1975).

В. А. Наук, Г. Е. Дарій (Nauk, 1974), А. П. Зверєва (Zvereva, 1976; 1977), R. Jodent (Jodent, 1979) пропонували вводити гліцерин безпосередньо перед заморожуванням. За даними А. П. Зверєвої, скорочення терміну гліцеринізації до 2–3 хвилин поліпшує якість деконсервованої сперми, збільшує її виживаність, підвищує активність і запліднювальну здатність. На її думку поліпшення якості сперми після короткотермінованої гліцеринізації пояснюється дегідративною дією гліцерину, його властивістю швидко проникати у спермії бугая.

Електронно-мікроскопічними дослідженнями (Zvereva & Chernomaz, 1963; Blom, 1964; Petruk, 1966; Varnavskiy, 1969; 1970; Milovanov et al., 1970; Skornyakov, 1973), встановлено, що гліцеринізація, особливо довготривала, є однією з причин пошкодження спермій. Автори вказують на руйнування оболонки спермія, насамперед в ділянці головки, шийки і кінцевої ділянки хвоста, де оголюються фібрили. Згідно з даними Б. А. Скорнякова, у процесі гліцеринізації проходить збільшення до 48 % кількості пошкоджених спермій.

Отже, перебування спермій у гліцеринізованому середовищі, навіть при температурах близьких до 0 °C, коли обмінні процеси значно уповільнені, негативно впливає на їх життєздатність.

Е. М. Платов (Platov, 1965) у склад середовища для кріоконсервування сперми баранів вводив етиленгліколь. За повільного заморожування сперми етиленглі-

коль не володів превентивною властивістю, а при швидкому заморожуванні спостерігалася висока активність та виживаність спермій, як у середовищі із гліцерином. Проте запліднювальна здатність спермій була невисокою.

Досліджуючи захисну дію різних кріопротекторів у середовищах для заморожування сперми баранів, S. Salamon (1968) експериментально підтвердив, що гліцерин краще оберігає спермій при кріоконсервуванні, ніж етиленгліколь чи комбінація етиленгліколю з диметилсульфоксидом. R. G. Jones (1965) повідомив, що введення у середовище для розбавлення сперми баранів 5 % розчину диметилсульфоксиду різко знизило якісні показники деконсервованої сперми.

Найоб'єктивніше відображає процеси, що протікають у спермі при її охолодженні, шкала, запропонована Ф. І. Осташком (Ostashko, 1968). Він розділив температурний діапазон на такі зони: від +40 до +25 °C – зона високої активності обмінних процесів; від +25 до -5 °C – зона пониженого рівня обмінних процесів і перехід клітин у стан мезабіозу; від -0,5 до -80 °C – зона кристалізації охолодженої та переохолодженої навколишньої і внутрішньоклітинної води та перехід клітин у стан анабіозу; від -80 до -150 °C – зона кристалізації в'язкої і адсорбованої води та рекристалізаційних процесів; від -150 до -273 °C – зона відсутності кристалізаційних процесів (зона квантових реакцій).

Значну небезпеку для спермій становляють осмотичні явища, що виникають на мембрані в результаті швидкого охолодження чи розмороження клітин. Ці явища одержали назву “температурний шок”, їх спостерігали при різкому охолодженні сперми баранів, бугаїв, хряків В. К. Милованов (Milovanov, 1962), Ф. І. Осташко (Ostashko, 1964) та інші. Ф. І. Осташко (Ostashko, 1964; 1968) експериментально довів, що основою температурного шоку є пошкодження мембрани спермія, яке викликане збалансуванням концентраційного градієнта, що виникає на межі поділу клітини – середовища за різкої зміни температури. Враховуючи те, що клітина оточена мембраною, яка володіє вибірковою проникністю, урівноваженість проходить внаслідок поступлення і виходу води із клітини. Надзвичайно швидкий потік води через мембрану може її пошкодити.

Репрезентована P. Mazur (1977) гіпотеза про кінетику зневоднення клітин при заморожуванні стала основою двохфакторної теорії пошкодження біологічних об'єктів. Згідно з цією теорією, на першому етапі від 0 до 7 °C найбільш негативно діє чинник, який сприяє швидкій дегідратації клітин, а на другому етапі від -7 до -50 °C найбільшу небезпеку викликає підвищення концентрації солей.

Аналіз методів кріоконсервування сперми плідників сільськогосподарських тварин указує, що на виробництві застосовують двоетапні режими заморожування. При кріоконсервуванні сперми у granulax температура від 0 до -10 °C знижується повільно, а потім на відрізок від -11 до -196 °C дуже швидко. Повільне заморожування на першому етапі спричиняє позаклітинну кристалізацію і спермії, що містяться у концентрованих розчинах, зневоднюються. Дегідратація

сприяє вітрифікації води всередині клітин, а також утворенню дрібних кристалів, які не пошкоджують спермій (Ostashko, 1968; Smirnov, 1974).

Багатьма дослідниками (Martin, 1963; Pursel et al., 1972; Watson, 1975; Wilmut & Polge, 1977; Korban et al., 1980; Kononov, 1983) доведено, що при швидкому охолодженні сперми бугаїв, баранів і кнурів від 37 ° до 0 °C спермії втрачають рухливість і метаболічну активність, яка супроводжується виходом із спермій у плазму внутрішньоклітинних ферментів, білків, а також перерозподіленням іонів між статевими клітинами і навколишнім середовищем. Водночас спостерігається перелом спермій у ділянці шийки, скручування джгутика та пошкодження акросом. Автори зазначають, що обсяг пошкодження спермій бугаїв, баранів і кнурів різний. У бугаїв кількість спермій з пошкодженою акросомою після холодового шоку становила 28 %, баранів – 49 і кнурів – 78 відсотків.

За результатами досліджень (Schmidt et al., 1974; Zheltobryuh & Ivahnenko, 1977; Zheltobryuh & Ivahnenko, 1977; Sokolovskaya et al., 1981) існує висока кореляція між фізіологічною якістю акросоми спермія і його запліднювальною здатністю.

Автори вважають, що оцінка стану акросоми деконсервованих спермій є достовірнішою за їхню біологічну повноцінність, ніж визначення активності та виживаності. Було запропоновано декілька способів визначення пошкоджень акросоми спермій, а саме: фарбування мазків сперми спеціальними фарбами; визначення протеолітичної активності (ПЛА) акросом; акроскопічний метод, який ґрунтується на зміні заломлення світла при баковому освітленні розбавленої краплі сперми за допомогою конденсора темного поля (Watson, 1975; Rhodes, 1980; Harrison & Flechon, 1980; Marinov, 1981; Sokolovskaya et al., 1981).

Вивченням ультраструктурних пошкоджень спермій у процесі кріоконсервування з'ясовано, що частка спермій з пошкодженими акросомами збільшується по шляху проходження технологічних етапів кріоконсервування. За даними (Fornusek et al., 1981), відсоток спермій з ушкодженою акросомою у свіжоодржаній спермі баранів складає 16 %, а в деконсервованій – 44–59 відсотків. Більшість пошкоджень акросоми, на переконання авторів, відбувається під час розбавлення і еквілібрації і значно менше – в процесі самого заморожування.

Дослідженнями (Aybazova, 1987) встановлено, що тільки 15–36 % деконсервованих спермій баранів-плідників не мали структурних пошкоджень акросоми і цитоплазматичної оболонки. Автор зазначає, що етапи (стадії) підготовки сперми до кріоконсервування, а саме: розбавлення середовищем та еквілібрація також впливають на активність, виживаність та біологічну повноцінність.

Т. Mann (Mann, 1964), Е. М. Платов (Platov, 1973), Л. Г. Мороз та ін. (Moroz et al., 1976) виявили, що активність спермій та їх виживаність після холодового шоку поєднана зі зменшенням вмісту аденозинтрифосфатази (АТФ) внаслідок зниження інтенсивності гліколізу і дихання. Проте на стадії охолодження сперми до 5–0 °C зменшення вмісту АТФ не

пов'язано з порушенням його синтезу, тому після розмороження сперми вміст АТФ відновлюється.

Виявлено, що при розбавленні, еквілібрації, кріоконсервуванні та розморожуванні сперми руйнується проникність мембран, яка призводить до витікання зі спермій ряду ферментів і збільшення їхньої активності у плазмі, а також утратою основних компонентів мембран – ліпідів та білків (Shergin, 1967; Nauk, 1974; Kurilo, 1982; Semekov, 1984).

Стійкість мембран спермій до холодового шоку також залежить від вмісту в них холестерину та співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот у фосfolіпідах. Установлено, що оболонка спермій баранів містить незначну кількість міцно зв'язаних холестероло-протеїдних комплексів, які забезпечують стійкість статевих клітин до низьких температур, оскільки крихко зв'язані комплекси більш гідрофільні і швидше руйнуються за кріоконсервування.

Вміст поліненасичених жирних кислот і холестерину, згідно з теорією фазового переходу ліпідів, визначають температуру фазового переходу ліпідів із рідкокристалічного стану до кристалічного. Холестерин, взаємодіючи із жирнокислотними кільцями, знижує текучість мембран. Причому – чим нижча температура фазового переходу, тим більша стійкість мембрани. Також доведено, що після кріоконсервування і відтавання спермій у них зменшується вміст амінокислот в основному за рахунок гідрофобних і нейтральних в середньому на 15–31 %. Співвідношення білка до ліпідів у мембранах, на думку деяких дослідників, характеризує видову специфічну стійкість спермій до заморожування. У спермі бугаїв це співвідношення дорівнює 0,43, а у спермі баранів – 0,36 (Watson, 1981; Belous et al., 1982; Nauk, 1982).

Р. Watson (Watson, 1975), М. Mollova, (Mollova, 1980), Д. Т. Данов та ін. (Danov et al., 1984) експериментально довели, що однією з основних причин зниження запліднювальної здатності спермій під час кріоконсервування, поряд з пошкодженням зовнішньої цитоплазматичної оболонки спермія і руйнуванням акросоми, є значні втрати амінокислот, ліпопротеїдів і пошкодження ферментних систем.

Порушення ферментних систем спермій, а також втрата властивостей їх до ресинтезу аденозинполіфосфатів (АТФ і АДФ) призводить до зміни енергетики спермій та зниження виживаності у репродуктивних органах овець. Встановлено, що у процесі кріоконсервування сперми баранів спостерігається втрата значної кількості амінокислот, що входять до складу ліпоглокопротеїдних комплексів акросоми і цитоплазми. Причому втрати амінокислот у сперміях баранів майже у два рази більші, ніж у бугаїв, відповідно 20,0 і 11,0 відсотка (Aybazova, 1987).

Не менш важливе значення надається процесу розморожування глибокозамороженої сперми, оскільки на стадії рекристалізації у зв'язку з підвищенням навантаження на мембрану спермія спостерігається їх пошкодження. Найбільш критичні зони при розморожуванні сперми перебувають у діапазоні температур від -50 до -30 °C, а також від -30 до 0 °C. Експериментально встановлено, що швидкість процесу рекристалізації можна зменшити шляхом застосування у сере-

довищах кріопротекторів, а також підвищенням швидкості відтавання. Вагомий вплив при розморожуванні сперми має підбір оптимального режиму відтавання (Bugrov & Olekseenko, 1977).

Заморожування і розморожування сперми викликає значне відшаровування і набрякання мембран, їх розриви як плазматичних, так і акросомальних. У зв'язку з тим помітні зміни акросоми. Одночасно відбувається розбухання мітохондріальної спіралі спермія, просвітління матриці мітохондрій, руйнування окремих мітохондріальних тіл. Виявлено, що у сперміях баранів найбільше, порівняно із сперміями бугаїв, пошкоджується плазматична мембрана і акросома. Це свідчить про основну причину невисокої запліднювальної здатності деконсервованої сперми баранів (Varnavskiy, 1970; Schmidt et al., 1974).

Проведеними Н. П. Шергіним (1967) дослідженнями хімічного складу сперми баранів-плідників встановлено, що вона відрізняється від сперми інших видів тварин дещо вищим вмістом білків, ліпідів, молочної кислоти і меншою концентрацією мінеральних речовин. До складу білків входить значно більше амінокислот. Зокрема: аргінін – 20,9 %, лейцин і ізолейцин – 13,8 %, глютамінова кислота – 6,2 %, треонін – 3,1 %, лізин – 9,6 %, гістидин – 4,8, тирозин – 9,4 %, фенілаланін – 10,4 %, серин – 3,6 %, гліцин – 2,8 %, аспаргінова кислота – 2,6 %, валін – 6,2 %, аланін – 3,0 %, метіонін – 2,0 відсотка.

У сперміях містяться такі ферменти, як сукцинат-дегідрогеназа, цитохромоксидаза, гіалуронідаза, лужна і кисла фосфатази та інші. У плазмі сперми баранів порівняно з іншими видами самців міститься більше цукрів, в основному моносахаридів-фруктози, галактози, глюкози, арабінози, рибози, рибулези. Із органічних кислот перевагу має лимонна, а з мінеральних солей – хлорид натрію.

Вивченням морфологічних біохімічних показників були виявлені основні специфічні особливості спермій баранів за їх кріоконсервуванням. Спермії баранів погано переносять аеробні умови. У каудальній частині придатка сім'яника вони перебувають в анаеробних умовах. Дослідженнями доведено, що пошкодження сперми киснем відбувається основними чином після її розбавлення і еквілібрації, а не під час кріоконсервування. Встановлено, що в аеробних умовах проходить відщеплення однієї амінокислоти із молекули лецитину, який входить до складу мембран спермій з утворенням токсичного лізолецитину.

Враховуючи надзвичайно важливе значення акросоми при заплідненні яйцеклітини, можна пояснити різницю між високою активністю деконсервованих спермій та їх запліднювальною здатністю (Varnavskiy, 1970; Zhiltsov, 1970; Milovanov, 1975; Milovanov et al., 1976; Zhiltsov, 1999).

Рядом вчених, зокрема М. П. Кузнецовим (Kuznetsov & Kupriyana, 1959), Н. З. Жильцовим та ін. (Zhiltsov et al., 1974), П. Івановим, В. Димовим (1974) було встановлено, що у спермі баранів порівняно із спермою бугаїв є значна кількість простагландинів: ПГЕ 50 мкг/мл і ПГФ – 12 мкг/мл. Вони стимулюють мускулатуру матки і сприяють руху спермій до місця запліднення. Проте за своєю природою вони

є ненасиченими жирними кислотами і при аеробній підготовці до кріоконсервування інактивуються і це знижує ефективність осіменіння овець аеробно-замороженою спермою. Доведено, що у спермі баранів, підготовленою до кріоконсервування за технологією бугаїв, фактично проходить повна інактивація спермій, замість 62 мкг/мл залишається лише 1,3 мкг/мл. Водночас додавання простагландинів до деконсервованої сперми при осіменінні овець забезпечує збільшення у два рази кітних вівцематок.

Також виявлено, що у спермі баранів порівняно зі спермою інших сільськогосподарських тварин відсутній природний антиоксидант. Внаслідок перекисного окиснення руйнується акросома, яка містить необхідні для запліднення ферменти – акрозин і гіалуронідазу. Тому негативну дію кисню на спермії баранів-плідників можна відвернути анаеробною атмосферою при підготовці до заморожування халатними агентами, які зв'язують іони тяжких металів та антиоксидантами (Milovanov & Sokolovskaya, 1980).

Р. Н. Hammarstedt et al. (Hammarstedt et al., 1976), И. Н. Шайдулин (Shaydullin, 1980) вважають, що певні антиоксиданти можуть оберігати спермії від холодового шоку, аналогічно жовтку. Однак до складу середовища для розбавлення і подальшого кріоконсервування сперми обов'язково все ж таки вводити 15–20 відсотка жовтка, що вказує на недостатнє вивчення впливу антиоксидантів.

І. М. Кушнір (Kushnir, 1998) зазначає, що якість деконсервованої сперми залежить від протікання дифузно-осмотичних процесів між сперміями і середовищем із кріопротектором. Тому обов'язково потрібно враховувати осмолярну концентрацію сперми, середовища і кожного компонента у ньому.

Висновки

Із аналізу літературних даних видно, що видові зміни стійкості спермій баранів до охолодження і кріоконсервування обумовлені особливостями хімічного складу плазми, молекулярної організації мембран спермій, ферментного набору і метаболізму. Все це потрібно враховувати при удосконаленні технології заморожування сперми баранів-плідників, у тому числі й засобів захисту в період підготовки її до кріоконсервування, оскільки існуючі методи заморожування сперми недосконалі й потребують подальшого вивчення та поліпшення.

References

- Aybazova, M. M. (1987). Usovershenstvovanie tehnologii kriokonservatsii spermyi i ispolzovanie tsennykh baranov-proizvoditeley. Avtoreferat diss. kand. vet. nauk. Stavropol. SSHI (in Russian).
- Aybazov, M. M. (2004). Biotechnologiya vosproizvodstva ovets i koz: monografiya (in Russian).
- Belous, A. M., Bondarenko, V. A., & Shrago, M. G. (1982). Strukturnye izmeneniya biologicheskikh membran pri ohlazhdenii. Nauk. dumka (in Russian).
- Berndtson, W. E., & Foote, R. H. (1972). The freezability of spermatozoa after minimal pre-freezing exposure to glycerol or lactose. *Cryobiology*, 9(1), 57–60. doi: 10.1016/0011-2240(72)90010-7.
- Blom, E. (1964). The galea capitis as part of the acrosome in the bull sperm. *Animal Reprod. Trento*, 4, 655–666.
- Blom, E. (1964). Spermatic ultrastructure (bovine). *Spermatic ultrastructure (bovine)*. 3. Edition springfield, Nass, 425–430.
- Bugrov, A. D., & Olekseenko, T. N. (1977). Kriticheskie zonyi ottaivaniya spermyi byikov i ih vliyanie na vyizhivaemost spermiy. *Selskohozyaystvennaya biologiya*, 13(3), 368–370 (in Russian).
- Buhrov, O. D. (1965). Vplyv osmatychnoho tysku na simia plidnykiv pry yoho hlybokomu zamorozhuvanni. *Zb. Rozvedennia i utrymannia silskohospodarskykh tvaryn*, 5, 36–41 (in Ukrainian).
- Cassou, R. (1964). La méthode des paillettes en plastique adaptée a la généralisation de la congélation. In *Fifth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination (Trento)*, 4, 540–546.
- Danov, T. D., Kovachev, K. D., & Kreteva, S. H. (1984). Nakoï formi na uvrezhdane i otklonenie ot normalnata Ultrastruktura na spermatozoidite na kocha. *Biol. Et immunal. Reprod*, 9, 87–94.
- Davidenko, V. M., Shinkarenko, I. S., & Ignatenko, O. I. (1977). Vliyaniya nekotorykh faktorov na kachestvo spermyi pri zamorazhivani. *Nauchno-tehn. Byull. Ukr. NIIZh shtatnykh rayonov "Akanya Nova"*, 41, 60–63 (in Russian).
- Emmens, C. W., & Blackshow, A. W. (1955). The fertility of frozen ram and bull semen. *Austral. Veter. J.*, 31(3), 76–79. doi: 10.1111/j.1751-0813.1955.tb05502.x.
- Fornusek, L., Vetvickova, V., & Petelikova, I. (1981). Usinek redidel pro dlouhodobu uchovavani na akrosomy beranich spermiy. *Veter.-Med. (CSSR)*, 26, 213–221.
- Habibullin, H. H. (1957). Sohranenie i perevozka spermyi byikov pri nizkikh temperaturah. *Molochnoe i myasnoe zhivotnovodstvo*, 5, 39–42 (in Russian).
- Habibullin, H. H. (1958). Hranenie semeni byika v zamorozhenom sostoyanii. *Molochnoe yi myasnoe zhivotnovodstvo*, 2, 43–47 (in Russian).
- Hammarstedt, R. H., Amman, R. P., & Ruinsky, T. (1976). *Biol. Reproductions*, 14, 381–387.
- Harrison, R. A. P., & Flechon, J. E. (1980). Immunocytochemical detection of acrosomal damage following cold shock: loss of acrosin from the acrosomal region of ram, bull and boar spermatozoa. *Reproduction Nutrition Développement*, 20(6), 1801–1810. doi: 10.1051/rnd:19801006.
- Ilinskaya, T. P. (1963). O rezultatah zamorazhivaniya semeni byikov v Belorussii. V kn. *Novoe v plemennom dele v iskusstvennom osemenenii selskohozyaystvennykh zhivotnykh*, 389–394 (in Russian).
- Jodent, R. (1976). Recent technological progress in artificial insemination of cows. *Italian. Selezione Veterinaria*.
- Jones, R. W. (1965). The use dimethyl sulfoxide glycerol and reconstituted skim milk for preservation of ram spermatozoa. *Austral. J. Biol.Sci.*, 18(4), 877–885. doi: 10.1071/BI9650877.

- Kalev, G., Zagorskiy, D., Bapirdzhiev, K. i dr (1970). Osemenenie ovets glubokozamorozhennoy spermy, razbavlennoy razlichnyimi sredami. *Zhivotnovodstvo*, 7, 28–31 (in Russian).
- Kantsedal, V. I. (1968). Nekotorye voprosy fiziologii i biohimii spermy hryakov i baranov. Avt. dis. kand. biol. nauk. Kazan (in Russian).
- Kononov, V. P. (1983). Dostizheniya i perspektivy zamorazhivaniya semeni v svinovodstve. M.: Rosselkhozizdat (in Russian).
- Korban, N. V., Moroz, L. G., & Shapiev, I. Sh. (1980). Metodicheskie rekomendatsii po nizkotemperaturnoy konservatsii spermy hryakov (in Russian).
- Korotkov, A. I., Marchenko, M., & Moskalyuk, M. (1960). Hranenie semeni baranov pri temperature -78° C. *Zemledelie i zhivotnovodstvo Moldavii*, 1, 42–44 (in Russian).
- Kurilo, Yu. G. (1982). Vzaimosvyaz aktivnosti fermentov i kontsentratsii metabolitov uglevodnogo obmena v sperme hryakov s kachestvom spermy, perezhivaemostyu i oplodotvoryayushey sposobnosti spermiev (Doctoral dissertation, stupnya dok. biol. nauk: spets. 03.0013 “fiziologiya”. Harkiv (in Russian).
- Kushnir, V. M. (1974). Deystvie osmoticheskikh faktorov pri zamorazhivani spermy byikov v sredah s glitserinom Avtoreferat kand. diss (in Russian).
- Kushnir, V. M. (1998). Perspektivy razvitiya teorii i praktiki kriokonservatsii spermy. Konkurento-sposobnoe proizvodstvo produktsii zhivotnovodstva v Respublike Belarus: Sb. rabot Mezhd.nauch, 146–148 (in Russian).
- Kuznetsov, M. P., & Kupriyanova, L. P. (1959). K voprosu sohraneniya semeni baranov pri temperature -79° C. *Tr. Vizha*, 23, 171–190 (in Russian).
- Kuznetsov, L. N. (1990). Opyit glubokogo ohlazhdeniya i dlitelnogo hraneniya semeni baranov. Novoe v plemennom dele i iskusstvennom osemenenii sel'skokozyaystvennykh zhivotnykh (in Russian).
- Lopyrin, A. I., Loginova N. V. (1958). Metodike zamorazhivaniya semeni barana. *Ovtsevodstvo*, 8, 31–34 (in Russian).
- Luyet, B. J. (1937). The vitrification of organic colloids and of protoplasme. *Biodynamica*.
- Luyet, B. J., & Hodapp, E. L. (1938). Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 39(3), 433–434. doi: 10.3181/00379727-39-10229P.
- Maksimov, N. A. (1913). O vyimerzani vody i holodostoykosti rasteniy (in Russian).
- Maksimov, N. A. (1929). Vnutrennie faktoryi ustoychivosti rasteniy k morozu i zasuhe. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii*, 22(1), 3–41 (in Russian).
- Mann, T. (1964). Biochemistry of semen of the male reproduct. *Tract. Science*, 147, 3659, 727–728. doi: 10.1126/science.147.3659.727-a.
- Marinov, P. (1981). La accion proteoritika del acrosome como metodo de valoracion del efecto crioprotector de dillnyentes para la congelacion de semen ovino. *Biol. Immunol. Reproduct*, 5, 44–48.
- Martin, J. C. A. (1963). The influence of diluente and processin time after ejaculation on the revival of deep frozen bull spermatozoa. *J. Agric. Sei*, 63, 55–63.
- Martin, I. C. A. (1963). Effects of lecithin, egg-yolk, fructose and period of storage at 5° c on bull spermatozoa deep-frozen to -79° C. *Reproduction*, 6(3), 441–449. doi: 10.1530/jrf.0.0060441.
- Matskepladze, I. B., Gugushvili, K. F., Bregadze, M. A i dr (1960). Sohranenie i ispolzovanie semeni byika i barana v zamorozhennom sostoyanii. *Zhivotnovodstvo*, 2, 77–79 (in Russian).
- Mazur, P. (1966). Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*, 2(4), 181–192. doi: 10.1016/S0011-2240(66)80165-7.
- Mesanos, P., Wamsik, R., & Schavac, F. (1977). Prezivatel spermy barana pri pouziti roznykh bruhov riedidiel pohlbokom zmrazeni v tekutom dusuku. *Vet. Med*, 22, 599–604 (in Russian).
- Miller, W. J., & VanDemark, N. L. (1954). The influence of glycerol level, various temperature aspects and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at sub-zero temperatures. *Journal of Dairy Science*, 37(1), 45–51. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(54)91230-8.
- Milovanov, V. K. (1962). Biologiya vosproizvedeniya i iskusstvennoe osemenenie zhivotnykh. Kolos (in Russian).
- Milovanov V. K. (1975). Eksperiment k bionike epididimisa (k tehnologii hraneniya semeni sel'skokozyaystvennykh zhivotnykh). *Doklady VASHNIL*, 10, 26–28 (in Russian).
- Milovanov, V. K., & Sokolovskaya, I. I. (1980). Dlitelnoe hranenie semeni barana i novye vozmozhnosti krupnomasshtabnoy selektsii v ovtsevodstve. *Vestnik sel'skokozyaystvennoy nauki*, 2, 122–131 (in Russian).
- Milovanov, V. K., & Sokolovskaya, I. I. (1980). Uroven i perspektivy nauchnykh issledovaniy. *Zhivotnovodstvo*, 10, 48–50 (in Russian).
- Milovanov, V. K., Varnavskiy, A. N., & Nauk, V. A. (1970). O prirode kriogennykh povrezhdeniy zhivchikov barana. *Vestnik s-h nauki*, 10, 86 (in Russian).
- Milovanov, V. K., Varnavskiy, A. N., & Varnavskaya, V. A. (1976). Razrabotka metoda glubokogo zamorazhivaniya semeni baranov dlya dlitelnogo hraneniya. *Zhivotnovodstvo*, 8, 57 (in Russian).
- Mollova, M. V. (1980). Changes in the structure of ram spermatozoa after equilibration and deep freezing. In *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk*, 33(3), 393–395.
- Moroz, L. G., Shapiev, I. Sh., Korban, N. V., & Mashanskiy, V. F. (1976). Fiziologicheskie i biohimicheskie izmeneniya spermatozoidov hryaka pri zamorazhivani. *Selskokozyaystvennaya biologiya*, 11(6), 850–856 (in Russian).
- Morozov, V. A. (1957). Sohranenie semeni barana v zamorozhennom sostoyanii posredstvom gipertonicheskikh rastvorov. *Doklady VASHNIL*, 11, 44–48 (in Russian).
- Myktytn, L. Ye., Binkevych, V. Ya., & Bilyk, O. Ya. (2013). Stan ta perspektyvy rozvytku vivcharstva v Ukraini. *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho*

- universytetu veterinarynoi medytsyny ta biotekhnologii im. Gzhytskoho, 15, 1(4), 133–141 (in Ukrainian).
- Nagase, H. (1964). Deep-freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. In *Proceedings of the 4th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 3, 410–415.
- Nauk, V. A. (1973). Sohraneniya semeni barana i izmenenie sodержanie aminokislot pri nizkikh temperaturah. Razvedenie i kormlenie sel'skohozyaystvennykh zhivotnykh, 111–113 (in Russian).
- Nauk, V. A. (1974). Izmeneniya pronitsaemosti membran i ustoychivosti belkovo-holosterinovykh kompleksov zhivchikov pod vliyaniem tehnologicheskoy obrabotki semeni byika. *Selskohozyaystvennaya biologiya*, 9(1), 102–108 (in Russian).
- Nauk, V. A. (1974). O tselesoobraznosti otkaza ot "ekvilibratsii" pri zamorazhivaniy semeni byikov. *Zhivotnovodstvo*, 10, 71–74 (in Russian).
- Nauk, V. A. (1982). Kriokonservatsiya semeni zhivotnykh. Pushkino: Institut biologicheskoy fiziki (in Russian).
- O'dell, W. T., & Almquist, J. O. (1957). Freezing bovine semen. I. Techniques for freezing bovine spermatozoa in milk diluents. *Journal of Dairy Science*, 40(12), 1534–1541. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(57)94674-X.
- O'dell, W. T., Almquist, J. O., & Marsh, L. A. (1958). Freezing bovine semen. III. Effect of freezing rate on bovine spermatozoa frozen and stored at -79°C . *Journal of Dairy Science*, 41(1), 79–89. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(58)90870-1.
- Ostashko, F. I., & Buhrov, O. D. (1966). Pro hlyboke zamorozhuvannya spermy buhaiv-plidnykiv. *Visnyk silskohospodarskoi nauky*, 4, 86–91 (in Ukrainian).
- Ostashko, F. I. (1959). Tryvale zberihannya simia buhaiv pry temperaturi -183°C . *Sotsialistychne tvarynnytstvo*, 11, 36–39 (in Ukrainian).
- Ostashko, F. I. (1964). Prichyny i mehanizm holodovogo udara kletok. *Mezhdunarodniy hozyaystvennyy zhurnal*, 3, 68–72 (in Ukrainian).
- Ostashko, F. I., & Lopatko, M. I. (1965). Do pytannia pro zamorozhuvannya spermy plidnykiv. *Zb. Rozvedennia i utrymannia silskohospodarskykh tvaryn*, 5, 3–8 (in Ukrainian).
- Ostashko, F. I., & Shinkarenko, V. A. (1972). Zamorazhivanie spermy byikov-proizvoditeley v oblitsovannykh granulah. *Sb. Tezisy dokladov k nauchno-proizvodstvennoy konferentsii po teorii praktike vosproizvodstva sel'skohozyaystvennykh zhivotnykh. NII Zhivotnovodstva Lesostepi i Polesya USSR. Harkov*, 54–55 (in Russian).
- Ostashko, F. I. (1960). Novyy metod zamorazhivaniya i dlitel'nogo hraneniya semeni byikov pri temperature minus 183°S . *Zhivotnovodstvo*, 1, 79–84 (in Russian).
- Ostashko, F. I. (1968). Glubokoe zamorazhivanie i dlitel'noe hranenie spermy proizvoditeley. *K.: Urozhay* (in Russian).
- Pakenas, P. I. (1963). Metody zamorazhivaniya semeni, primenyaemye v Litovskim institute zhivotnovodstva i harakteristika potomstva, poluchennogo ot semeni perevezennogo iz Moskvy. V kn. *Novoe v plemennom dele i iskusstvennyim osemenenii sel'skohozyaystvennykh zhivotnykh*, 201–207 (in Russian).
- Petruk, E. M. (1966). Nekotorye fiziologicheskie i morfologicheskie pokazateli spermiev pri glubokom zamorazhivaniy spermy byika (Doctoral dissertation, Lvovskiy zooveterinarnyy institut) (in Russian).
- Platov, E. M. (1960). Osmoticheskoe deystvie glitserina na zhivchikov byika. *Vestnik sel'skohozyaystvennoy nauki*, 11, 59–63 (in Russian).
- Platov, E. M. (1965). Zamorazhivanie semeni barana v laktoz zheltochnoy-etilenglikolevoy srede. *Ovtsevodstvo*, 9, 11 (in Russian).
- Platov, E. M. (1978). Nekotorye teoreticheskie aspekty zamorazhivaniya spermy. *Zhivotnovodstvo*, 10, 64 (in Russian).
- Platov, E. M. (1982). Razrabotka i prakticheskoe primeneniye tehnologii zamorazhivaniya spermy baranov. *Nauchno-praktich. konf. Po ovtsevodstvu i kozovodstvu: Tez. nauch. saobscheniy*, 254–256 (in Russian).
- Platov, E. M. (1963). Issledovaniya o deystvii glitserina PRI RAZBAVLENII I zamorazhivaniy SEMENI sel'skohozyaystvennykh zhivotnykh (Doctoral dissertation, Vsesoyuznaya ordena Lenina akademiya sel'skohozyaystvennykh nauk imeni VI Lenina; Vsesoyuzniy ordena Trudovogo Krasnogo Znameni nauchno-issledovatel'skiy institut zhivotnovodstva) (in Russian).
- Platov, E. M. (1973). Teoreticheskie i prakticheskie osnovy zamorazhivaniya semeni proizvoditeley sel'skohozyaystvennykh zhivotnykh. *Diss.... d-ra biol. nauk. Dubrovitsy* (in Russian).
- Platov, E. M., & Volkov, A. S. (1979). Effektivnost zamorazhivaniya spermy baranov. *Zhivotnovodstvo*, 5, 53–56 (in Russian).
- Pokhyl, V., Pokhyl, O., Honchar, A., & Lesnovska, O. (2011). Miasni porody ovetsu prydniprovi. *Tvarynnytstvo Ukrainy*, 9, 17–20 (in Ukrainian).
- Polge, C., & Rawson, L. E. A. (1952). Longterm storage of bull semen frozen at very low temperatures -79°C . *Proc 2-nd int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem*, 3, 90–98.
- Polge, C. (1953). The preservation of spermatozoa at low temperatures. *Mammalian germ cells*, 6, 108.
- Polge, C., & Rowson, L. E. A. (1952). Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C . *Nature*, 169(4302), 626–627. doi: 10.1038/169626b0.
- Polge, C., & Rowson, L. E. A. (1952). Results with bull semen stored at -79°C . *Vet. Record*, 64, 851.
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666. doi: 10.1038/164666a0.
- Pursel, V. G., Johnson, L. A., & Rampack, G. B. (1972). Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, 34(2), 278–283. doi: 10.2527/jas1972.342278x.
- Rhodes, A. (1980). Semen collection and evaluation. *Current therapy in theiogenology*, 4, 944–947.
- Roslanovskiy, K. (1963). Metody hraneniya semeni primenyaemye v Polsche. V kn.: *Novoe v plemennom dele i iskusstvennom osemenenii*

- selskohozyaystvennyih zhivotnyih. M. izd.s-h. literatury, zhurnalov i plakatov, 162–169 (in Russian).
- Salamon, S. (1967). Observations on fertility of ram semen frozen by different methods. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 7(29), 559–561. doi: 10.1071/EA9670559.
- Salamon, S. (1968). Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Australian journal of biological sciences*, 21(2), 351–360. doi: 10.1071/B19680351.
- Salamon, S., & Visser, D. (1972). Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian journal of biological sciences*, 25(3), 605–618. doi: 10.1071/B19720605.
- Schmidt, D., Peter, W., Mudra, K., & Kunze, C. (1974). Untersuchungen zur Gefrierkonservierung von Ebersperma. 3. Prufung der Befruchtungsfähigkeit. *Archiv für Tierzucht*.
- Semekov, V. G. (1984). Soderzhanie tsiklicheskih nukleotidov (TsAMF i IDGMF) v sperme byikov i hryakov pri kriokonservatsii. *Selskohozyaystvennaya biologiya*, (2), 81–83 (in Russian).
- Shaydullin, I. N. (1980). Usovershenstvovanie metoda zamorazhivaniya semeni barana putem primeneniya antioksidantov. Avtoreferat diss. kand. biol. nauk (in Russian).
- Shergin, N. P. (1967). Biohimiya spermyi selskohozyaystvennyih zhivotnyih. M.: Kolos (in Russian).
- Skorniyakov, B. A. (1973). Izuchenie povrezhdenii spermiev byika pri ih nizkotermpurnoy konservatsii. Avtoreferat kand. diss (in Russian).
- Smirnov, I. V. (1951). Sohranenie semeni spermyi selskohozyaystvennyih zhyivotnyih pri temperature - 78 °C. *Sovetskoe zhyivotnovodstvo*, 1, 94–95 (in Russian).
- Smirnov, I. V. (1963). Vliyanie glitserina i gipertonicheskikh rastvorov na prizhivaemost spermiev byikov-proizvoditeley. *Nauchnye trudyi Kievskoy opyitnoy stantsii zhyivotnovodstva*, 9, 43–52 (in Russian).
- Smirnov, I. V. (1964). Deystvie osmoticheskikh faktorov na spermi byikov i hryakov, 85–93 (in Russian).
- Smirnov, I. V. (1949). Sohranenie semeni selskohozyaystvennyih zhivotnyih posredstvom glubokogo ohlazhdeniya. *Sovetskaya zootehniya*, 4, 93–96 (in Russian).
- Smirnov, I. V. (1974). K teorii glubokogo ohlazhdeniya spermyi. *Zhyivotnovodstvo*, 11, 65–70 (in Russian).
- Sokolovskaya, I. I., Oyvdadis, R. N., Abilov, A. I. i dr. (1981). O znachenii okrasom v otsenke semeni samtsov. *Zhyivotnovodstvo*, 9, 46–47 (in Russian).
- Varnavskiy A. N. (1969). Ultrastruktura zhivchikov byika i barana posle glubokogo zamorazhivaniya v zhidkom azote. *Selskohozyaystvennaya biologiya*, 3, 469–471 (in Russian).
- Varnavskiy, A. N. (1970). Vozmozhnaya prichina snizheniya oplodotvoryayushey sposobnosti zamorozhennogo semeni. *Ovtsevodstvo*, 2, 28–29 (in Russian).
- Varnavskiy, A. N. Turbin, V. F., & Osadchuk, V. S. (1972). Podvizhnost i ultrastruktura zhivchikov byika v protsesse tehnologicheskoy obrabotke. *Tehnologiya iskusstvennogo osemeneniya i biologiya vosproizvedeniya selskohozyaystvennyih zhivotnyih*, 169–175 (in Russian).
- Varnivskiy, A. N. (1978). Izuchenie akrasom spermatozoidov baranov s pomoschy fazokonstrastnoy mikroskopii. *Doklady VASHNIL*, 8, 33–34 (in Russian).
- Visser, D., & Salamon, S. (1974). Fertility following inseminations with frozen-thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen. *Australian journal of biological sciences*, 27(4), 423–426. doi: 10.1071/B19740423.
- Volkov, A. S. (1971). Izuchenie oplodotvoryayemoy ovets pri osemenenii zamorozhennym semenem barana. Avtoreferat kand. diss. Dubrovitsyi (in Russian).
- Volkov, A. S. (1974). Vliyanie chisla aktivnyih zhivchikov v ottayannom semeni na oplodotvoryayemost ovets. *Zhyivotnovodstvo*, 10, 69–71 (in Russian).
- Voronenko, V., Iovenko, V., & Zharuk, P. (2009). Henetychni resursy ovets Ukrainy ta umovy yikh podalshoho rozvytku. *Naukovyi visnyk Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy*, 287–296 (in Ukrainian).
- Watson, P. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in aerosomes of frozen ram spermatozoa. *Veter. Res.*, 97(1), 12–15. doi: 10.1136/vr.97.1.12.
- Watson, P. F. (1981). The effect cold shock on sperm cell membrane. Effect of Low temperatures on the biological membranes, 198–218.
- Watson, P. F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *The Veterinary Record*, 97(1), 12. doi: 10.1136/vr.97.1.12.
- White, I. D., Blackshaw, A. W., & Emmens, C. W. (1954). Metabolic and motility studies relating to the low temperature storage of ram and bull spermatozoa. *Australian Veterinary Journal*, 30(4), 85–94. doi: 10.1111/j.1751-0813.1954.tb08161.x.
- Wiggin, H. B., & Almquist, J. O. (1975). Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws. *Journal of animal science*, 40(2), 302–305. doi: 10.2527/jas1975.402302x.
- Wilmot, I., & Polge, C. (1977). The low temperature preservation of boar spermatozoa. 1. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. *Cryobiology*, 14(4), 471–478. doi: 10.1016/0011-2240(77)90009-8.
- Yatsun, A. S., & Ilinskaya, T. P. (1969). O pronitsaemosti glitserina cherez obolochku spermiev. V sb. Aktualnyie voprosyi povysheniya produktivnosti selskohozyaystvennyih zhivotnyih. Minsk, Urozhay, 75–78 (in Russian).
- Yuschenko, N. P., Semakov, V. G., & Levin, K. A. (1963). Zamorazhivanie spermyi byikov v granulakh bez primeneniya suhogo lida. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo*, 5, 36–37 (in Russian).

- Zheltobryuh, N. A., & Ivahnenko, V. K. (1977). Primeneniya saharno-zheltochnyih sred dlya zamorazhivaniya spermy barana. Tr. VNIIOK, 39(1), 111–118 (in Russian).
- Zheltobryuh, N. A., & Ivahnenko, V. K. (1977). Sovershenstvovanie tehnologii zamorazhivaniya i ottaivaniya spermy barana. Mat. nauchno-proizv, 27–28 (in Russian).
- Zhiltsov, N. Z. (1970). Kotsentratsiya kisloroda v kanale epididimisa krolika. Doklady VASHNIL, 5, 34–35 (in Russian).
- Zhiltsov, N. Z., Golub, V. S., Varnavskaya, V. A. i dr. (1974). O vozmozhnosti primeneniya prostaglandinov dlya povysheniya effektivnosti oshemeneniya ovets. Zhivotnovodstvo, 8, 67–70 (in Russian).
- Zhiltsov, N. Z. (1999). Novoe v biologii vosproizvedeniya selskohozyaystvennyih zhivotnyih. Zootehniya, 11, 31 (in Russian).
- Zvereva, A. P. (1976). Sovershenstvovanie tehnologii zamorazhivaniya spermy bykov-proizvoditeley i ispytanie novyih krioprotektorov. Avtoreferat kand. dis (in Russian).
- Zvereva, A. P. (1977). Vliyanie protsessov adaptatsii i ekvilibratsii na biologicheskie svoystva spermiev bykov pri zamorazhivanii. Fiziologiya vosproizvodstva selskohozyaystvennyih zhivotnyih, 229–232 (in Russian).
- Zvereva, G. V., & Chernomaz, L. A. (1977). Nekotorye voprosy morfologii spermiev byika. V kn. Novoe v plemennom dele i iskusstvennom oshemenenii selskohozyaystvennyih zhivotnyih, 378–388 (in Russian).