



ЗАХИСНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ СПЕРМИ ТВАРИН: ЕВОЛЮЦІЯ МЕТОДІВ І АКТУАЛЬНІ АСПЕКТИ (ОГЛЯДОВА)

Сушко О. Б., к. с.-г. н., с.н.с., <https://orcid.org/0000-0003-3552-064X>

Інститут тваринництва НААН

Жегунов Г. Ф., д.б.н., професор <https://orcid.org/0000-0003-0104-7890>

Державний біотехнологічний університет

Савельєва М. С., к.с.-г. н., <https://orcid.org/0000-0003-2221-933X>

Слецька Л. М., наук. спів., <https://orcid.org/0000-0001-6029-0183X>

Мартинюк І. М. к.с.-г. н <https://orcid.org/0000-0003-3552-064X>

Інститут тваринництва НААН

Представлено ретроспективний огляд вітчизняних та іноземних джерел літератури, а також дані опублікованих власних досліджень щодо кріоконсервування сперми тварин. Наведено основні історичні етапи створення захисних середовищ для глибокого заморожування сперми.

У 30 роках минулого сторіччя було відкрито явище, що характеризується загибеллю спермій при різкому охолодженні в діапазоні плюсових температур. Воно назване температурним шоком спермій. Для його запобігання запропоновано введення до складу розбавників речовин, що містять фосфоліпіди. Такі середовища можуть містити як прості компоненти – нативний жовток курячого яйця або молоко, так і високотехнологічні – ліпопротеїни, ізольовані фосфоліпіди різного походження. Для стабілізації білково-ліпідних комплексів плазматичних мембран і акросом спермій в процесі охолодження до складу розбавників вводять вуглеводи. Цукри є компонентами енергозабезпечення для спермій і поряд із солями вони є основними осмотичними регуляторами. Традиційною вважалась за необхідне комбінація двох-трьох вуглеводів у середовищі. Проте харківською школою репродуктологів на значному практичному досвіді доведено можливість створення ефективних захисних середовищ за застосування лише одного цукру – сахарози або лактози. Показано ефективність заморожування статевих клітин залежно від застосованих кріопротекторів. Гліцерин – перший відомий ендоцелюлярний кріопротектор, який до теперішнього часу є неперевершеним при кріоконсервуванні сперми плідників. Представлено власні експериментальні дані щодо впливу комбінацій гліцерину з речовинами групи амідів на основні біологічні показники сперми після деконсервації. У власних експериментах на спермі жеребців було випробувано кріопротектори диметилацетамід (ДМАЦ) і диметилформамід (ДМФА). У дослідях вивчали вплив різних концентрацій вищезазначених проникаючих кріопротекторів як на основні фізіологічні характеристики сперми жеребців (рухливість, виживаність), так і на ступінь ушкодження мембранного апарату спермій. Доведено ефективність певних комбінацій цих речовин.

Представлено методи запобігання негативному впливу кисню і розвитку процесів перекисного окислення ліпідів у спермі в процесі кріоконсервування. Розкрито поняття щодо застосування у розбавниках додаткових гормональних компонентів, зокрема простагландину F_{2a}. Відображено матеріали відносно впливу на якість статевих клітин санууючих препаратів.

Ключові слова: **штучне осіменіння, середовища, сперма, тварини, бугаї, жеребці, кріопротектори, заморожування.**



Відкриття методу кріоконсервації сперми бугаїв стало потужним інструментом збереження генетичного різноманіття тварин [1]. Глибоке заморожування сперми значною мірою сприяє поширенню репродуктивних технологій, таких як штучне осіменіння та запліднення *in vitro*.

У галузі кріобіології сперми тварин одним із головних завдань є з'ясування якомога більше чинників, що спричиняють ушкодження клітин та розробка ефективних методів попередження цих ушкоджень для захисту сперміїв. У процесі багаторічних досліджень накопичено значний експериментальний матеріал, який демонструє залежність ступеня ушкодження статевих клітин від кількісних і якісних характеристик кріопротекторних середовищ. Фізіологічні і морфологічні зміни в сперміях, які відбуваються в процесі впливу на них температурних градієнтів залежать від типу проникних і непроникних кріопротекторів, наявності речовин здатних забезпечувати оптимальний рН і осмотичний тиск, а також речовин здатних загальмовувати метаболічні процеси.

Мета досліджень – розкрити основні історичні етапи розвитку методів застосування захисних середовищ в розбавленні та кріоконсервуванні сперми у технології штучного осіменіння тварин.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для дослідження є були друковані праці вітчизняних та іноземних науковців, а також опубліковані результати власних досліджень. У роботі використано загальнонаукові методи: аналіз, синтез і узагальнення.

Результати досліджень. Ще у 30 роках минулого сторіччя було відкрито явище, що характеризується загибеллю сперміїв при різкому охолодженні і названо температурним шоком сперміїв [2, 3]. Тоді ж вперше для попередження холододового шоку або мінімізації його наслідків запропоновано введення фосфоліпідів [4]. Згідно з існуючим уявленням холододовий шок розглядається як процес ушкодження плазматичних мембран статевих клітин, обумовлений різким зсувом температури в умовах зміни тоничності середовища [5-7]. При цьому відбувається деформація мембрани, фазові переходи ліпідів, зміни бар'єрних властивостей іонів [8].

Незважаючи на те, що існує багато думок відносно механізмів і природи холододового шоку сперміїв, у практичному аспекті для запобігання цьому чиннику негативного впливу абсолютна більшість сучасних середовищ передбачають наявність у рецептурі фосфоліпідних компонентів [9]. Це можуть бути як достатньо прості розбавники з нативним жовтком курячого яйця або молоком, так і високо-технологічні середовища з ліпопротеїнами, ізольованими фосфоліпідами різного походження [10].

Незалежно від природи антишокового компоненту, його місія полягає у досягненні так званого ефекту фортифікації плазматичних мембран сперміїв. Термін «ефект фортифікації плазматичних мембран клітин ліпідними сполуками», введений Ф. І. Осташко у 1980 році. Під ним розуміють підвищення міцності поверхневих структур мембранного апарату статевих клітин. Адсорбція ліпідів ліпофільними компонентами цитоплазматичної мембрани сприяє підвищенню її міцності й попереджає негативний вплив окремих чинників глибокого заморожування на статеві клітини. При цьому ліпідні захисні компоненти нашаровуються не щільно, а сітчасто-мозаїчно. За рахунок цієї обставини не порушуються обмінні процеси між клітиною і середовищем.

Незважаючи на значні переваги застосування жовтка для захисту сперміїв від температурного шоку слід відмітити і його незначні недоліки. Насамперед це значні коливання хімічного складу, і, як наслідок, фізико-хімічних властивостей.



Але головним його недоліком є вірогідність потрапляння в середовище патогенної мікрофлори, так як він може бути носієм бактерій та інших мікроорганізмів. Саме тому дослідниками розроблено ряд рецептур зі застосуванням антишокових компонентів рослинного походження, здатних витримувати термічну обробку. Як правило, мова йде про рослинний лецитин. Такі рослинні антишокові компоненти отримують переважно з насіння сої різних сортів шляхом водної або спиртової екстракції [11–13]. За фізико-хімічними властивостями, зокрема вмістом наявності ліпопротеїнів, вони можуть певною мірою наближатися до жовткових антишокових компонентів, забезпечуючи фортифікаційний ефект [14–18].

Випробувано з позитивним ефектом, як захисний компонент, комплекс холестерин-циклодекстрин з виключенням яєчного жовтка із складу розбавника для сперми бугаїв [19].

Вуглеводи є необхідними компонентами середовищ для сперми тварин і використовуються достатньо давно, практично з перших робіт із розбавлення і збільшення об'єму сперми для можливості підвищення кількості осіменінь самиць. Згідно з сучасними уявленнями механізм їх позитивної дії пов'язаний зі стабілізацією білково-ліпідних комплексів плазматичних мембран і акросом спермій в процесі охолодження. При цьому цукри є енергозабезпечуючими компонентами середовищ для сперми і, поряд з солями, вони є основними осмотичними регуляторами.

Доведено кріопротекторну здатність цукрів щодо сперми навіть в умовах відсутності проникаючих кріопротекторів. Зокрема, було встановлено можливість відновлення активності часткою спермій бугаїв після заморожування відтавання в присутності рафінози [20]. Проте показники рухливості деконсервованої сперми бугаїв в цьому випадку значно поступалися контролю, де цукри застосовувались разом з гліцерином. Аналогічні дослідження з подібними висновками були проведені на спермі лабораторних тварин [21, 22].

Вважається, що комбінація вуглеводів у середовищі є більш ефективною порівняно з наявністю в рецептурі лише одного цукру. Тому в багатьох рецептурах поєднуються в різних співвідношеннях моносахариди, дисахариди і трисахариди [23]. Найбільш поширені це глюкоза, фруктоза, лактоза, сахароза, а також рафіноза. Проте Ф. І. Осташко розробив ефективні кріозахисні середовища за спрощеною рецептурою для поетапного, в два прийоми, розбавлення сперми бугаїв для наступного охолодження і кріоконсервування у формі облицьованих гранул. В ній передбачається використання тільки одного цукру (лактози або сахарози) за двохмоментного розбавлення сперми. Нижче приводиться рецептура цих середовищ (табл. 1).

Середовища наведеної рецептури пройшли широку апробацію більш ніж у 30 племінних підприємствах і селекційних центрах та були рекомендовані як для промислового виготовлення довгозбережених середовищ (стерильні середовища тривалого строку зберігання), так і для експрес-виготовлення в умовах виробничих лабораторій [24, 25]. Використання середовищ при заморожуванні сперми бугаїв забезпечує рухливість спермій не менш ніж 40 %, виживаність за температури 38 °C – не менше 5 годин, кріорезистентність за умови відбору повноцінних еякулятів – на рівні 50 % і більше, заплідненість корів і телиць – від 50 % до 90 %.

Повідомлялось про позитивний ефект введення до розбавнику сперми барана комплексного полісахариду гуміарабіку в концентраціях 1,5–2,5 %. Ця речовина здатна формувати навколо клітин полімерно-гідратну оболонку, яка сприяє збереженню сперміями поверхневого заряду та бар'єрних якостей мембранними компонентами клітин [26, 27].



Таблиця 1

Рецептура захисних середовищ для Харківської технології асептичного отримання, кріоконсервації і використання сперми бугаїв

Назва складових	% введення
Середовище № 1	
Розчин лактози 11 %- $C_{12}H_{22}O_{11} \times H_2O$ або сахарози $C_{12}H_{22}O_{11}$, мл	63,0
Жовток курячого яйця, мл	30,0
Гліцерин $C_3H_8O_3$, мл	7,0
Середовище № 2	
Лактоза - $C_{12}H_{22}O_{11} \times H_2O$ або сахароза $C_{12}H_{22}O_{11}$, г	6,0
Натрій-цитрат, тризаміщений п'ятиводний $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5,5 H_2O$	1,4
Гліцерин $C_3H_8O_3$, мл	5,0
Вода дистильована, мл	100,0

Проникаючі кріопротектори є одним із найголовніших складових кріозахисних середовищ. Гліцерин, перша з відомих кріозахисних речовин, не тільки не втратила свого значення до цього часу, але й є неперевершеною в багатьох випадках для кріоконсервування сперми самців основних видів тварин сільськогосподарського призначення.

Тривалий час вважалося, що її першовідкривачами як захисного компонента середовищ для сперми є С. Polge, А. Smith, А. Parks, які повідомили про свої дослідження у 1949 році [28]. Однак пізніше було доведено, що ще у 1937 році А. Д. Берштейн та В. В. Петропавловський застосували 9,6 % розчин гліцерину для захисту спермійів ссавців і птиці при заморожуванні до мінус 21 °С [29]. Про це автори повідомили у своїй роботі «Влияние неэлектролитов на переживание сперматозоидов», яка, однак, тривалий час не була широко відомою у наукових колах.

В історичному аспекті неможливо не відмітити дослідження Н. А. Максимова, як першовідкривача захисних властивостей гліцерину для біологічних об'єктів. У своїй роботі, датованій ще 1913 роком «О вымерзании и холодостойкости растений: экспериментальные и теоритические исследования», він повідомив про заморожування живців плодкових дерев під захистом гліцерину [30].

У процесі пошуку альтернативних кріофілактиків відкрито чимало речовин із захисними для спермійів властивостями. Як кріопротектори для сперми в різні роки були випробувані етиленгліколь, 1,2 пропандіол діметилсульфоксид (ДМСО), полімери (ПВП) та ще ціла низка інших сполук [31].

Здійснено експерименти спрямовані на порівняння ефективності кріоконсервації сперми бугаїв за застосування кріопротекторів гліцерину або етиленгліколю, доповнених трегалозою або цистеїном. Використання 5 % етиленгліколю призвело до меншого пошкодження хроматину та мінімізації згубного впливу заморожування на рух хвоста спермійів. Також застосування спермодоз, виготовлених на розбавниках з етиленгліколем, супроводжувалося незначним (недостовірним) збільшенням заплідненості корів [32]. Повідомлялося про відносно високу (до 34 %) в окремих випадках ступінь активації спермійів після заморожування-відтавання за використання ДМСО [33]. Однак за більш детального аналізу видно, що ДМСО забезпечує суттєво нижчу результативність кріоконсервування статевих клітин, зокрема бугаїв, ніж заморожування під захистом гліцерину. О. Д. Буг-



ровим проведено широкомасштабні дослідження із застосування різних кріопротекторних речовин за кріоконсервування сперми бугаїв [34, 35]. Результати багаторічних досліджень узагальнені у монографії «Криоповреждения и криозащита спермиев быков при глубоком замораживании» [36]. У його дослідженнях, зокрема, використання ДМСО за концентрації 2–4 % забезпечило рухливість деконсервованої сперми на рівні лише 24–29 %, за виживаності 3,5–5 годин. При збільшенні або зменшенні концентрації ДМСО від цих меж фізіологічні показники деконсервованої сперми були ще нижчими. Крім вищеназваних речовин автор значну увагу приділив випробуванням як кріопротектору, диметилформаміду (ДМФА). В дослідженнях застосовували ДМФА за концентрації від 1 % до 4 %. При цьому О. Д. Бугров отримав після заморожування-відтавання сперму бугаїв з рухливістю від 22,7 % до 30,0 % і виживаністю від 6,15 годин до 7,5 годин.

Ліннік Т. П. та іншими авторами проведено дослідження з кріоконсервування сперми птахів та доведено унікальний фізико-хімічний вплив дії заміщених амідів (диметилформамід, диметилацетамід), які мають високу проникність в середину статевих клітин півнів і проявляють достатньо високу кріозахисну активність [37, 38]. Використовуючи суміш амідів і діолів у складі кріозахисних середовищ, можна істотно скоротити час насичення спермій кріопротекторами перед кріоконсервуванням та підвищити функціональну активність спермій птиці.

У наших дослідженнях на спермі жеребців також були випробувані кріопротектори групи амідів. При цьому застосовували комбінації диметилацетаміду (ДМАЦ) і диметилформаміду (ДМФА) з гліцерином. В експериментах вивчали вплив різних концентрацій вищезазначених проникаючих кріопротекторів як на основні фізіологічні показники сперми жеребців, так і на ступінь ушкодження мембранного апарату спермій. Для визначення ступеня ушкодження мембранного апарату спермій після заморожування, застосовували подвійне фарбування вітальними фарбниками SYBR-14 і пропідіум йодід (PI) з наступним цитометричним аналізом за використання проточного цитометра DAKO Galaxy з довжиною хвилі 488 нм для збудження флюоресценції клітин.

При цьому за ступенем ушкодження мембран спермії відповідно до методики розділяли на три умовні категорії: «живі» – з неушкодженими мембранами; «ушкоджені» – спермії з частково порушеним мембранним апаратом і «мертві» – спермії з сильно ушкодженими, зруйнованими мембранами. Загальна кількість оцінюваних методом проточної цитометрії клітин становила 25 тисяч за один аналіз. Результати цієї роботи наведено у табл. 2. При цьому було встановлено, що найвищу ступінь захисту статевих клітин спостерігали за комбінації 2 % ДМАЦ і 2 % гліцерину, або 2 % ДМФА і 2 % гліцерину. Зокрема, ступінь клітин з не ушкодженими мембранами становила: 37,18 і 39,84 %, що ефективніше, ніж за окремого застосування гліцерину на 10,3 і 18,2 % відповідно. Слід відмітити, що комбінація кріопротекторів (ДМАЦ з гліцерином та ДМФА з гліцерином) надала більший захисний ефект і за показниками рухливості та виживаності сперми.

Розбавлення сперми синтетичними середовищами призводить до суттєвого зниження концентрації білків у плазмі сперми. Вважають, що це може бути чинником порушень певних ферментативних процесів, пов'язаних з акросомальною реакцією спермій. Тому в низці робіт, зокрема на спермі птахів, рекомендується використання додаткових білкових компонентів [40, 41]. Для покращення результатів кріоконсервування сперми бугаїв було запропоновано використання гомологічної сироватки крові [42].



Таблиця 2

Фізіологічні показники і ступінь ушкодження мембран спермійів жеребця залежно від вживаних кріопротекторів [39]

Кріопротектор, концентрація в середовищі, п	Рухливість, %	Вживаність при T=37 °C, години	Ступінь ушкодження мембран спермійів ($n_{кл}=25000 \times n_e$)		
			живі, %	ушкоджені, %	мертві, %
Гліцерин 2% $n_e = 4$ (контроль)	43,75±3,75	4,75±0,48	33,69±0,15	10,71±0,10	55,59±0,16
Гліцерин 1%+1% ДМАЦ $n_e=3$	43,33±3,34	4,67±0,33	32,03±0,17	7,44±0,10	60,53±0,18
Гліцерин 2%+2% ДМАЦ $n_e=3$	48,33±4,41	5,33±0,33	37,18±0,18	12,06±0,12	50,75±0,18
Гліцерин 2%+1% ДМАЦ $n_e=3$	46,67±3,34	5,33±0,33	32,39±0,17	14,34±0,13	53,28±0,18
ДМАЦ 2% $n_e=3$	45,00±5,01	5,00±0,58	31,58±0,17	13,51±0,12	54,91±0,18
Гліцерин 1%+1% ДМФА $n_e=3$	48,33±6,01	5,67±0,87	33,83±0,17	13,82±0,13	52,78±0,18
Гліцерин 2%+2% ДМФА $n_e=3$	55,00±2,89	6,00±0,58	39,84±0,18	14,37±0,13	43,64±0,18
Гліцерин 2%+1% ДМФА $n_e=3$	51,67±1,36	5,67±0,66	35,99±0,18	15,82±0,13	48,17±0,18
ДМФА 2% $n_e=3$	50,00±5,78	5,33±0,66	33,64±0,17	14,77±0,13	51,59±0,18

Примітка. n_e – кількість вивчених еякулятів в досліді; $n_{кл}$ – кількість оцінених клітин (спермійів)

Значні зусилля дослідників були сконцентровані на пошуках методів запобігання негативному впливу кисню і розвитку процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у спермі в процесі кріоконсервування. Точний механізм генерації та функціонування активних форм кисню у спермі не достатньо вивчений. Вважається, що при оптимальних рівнях ці молекули відіграють значну роль у фізіології сперми, а саме у акросомній реакції і капацитації. Проте вони здатні негативно впливати на функціонування спермійів у високих концентраціях через токсичність [43]. Так як плазматична мембрана спермійів у своєму біохімічному складі має достатньо велику кількість ненасичених жирних кислот, то вочевидь, поступове перекисне окислення їх може бути чинниками дестабілізації і порушення іонного гомеостазу клітин та негативного впливу на ступінь фрагментації ДНК [44, 45].

Випробувано як компоненти для гальмування перекисного окислення ліпідів мембран спермійів значну кількість речовин антиоксидантної дії [46–48]. Розвиток процесів ПОЛ характеризується на першому етапі утворенням дієнових, триєнових, тетраєнових кон'югатів. Кінцевим продуктом окислювальної дегідратації ліпідів є малоновий діальдегід. Активація процесів ПОЛ призводить до



утворення довгих ланцюгів альдегідів, полімерів, лізофосфоліпідів, у білках знижується кількість SH –груп. У зв'язку з цим, оцінка показників вільнорадикального окиснення сперми бугаїв перед її технологічною обробкою та після деконсервації, може використовуватись, як вважається, додатковим критерієм біологічної якості статевих клітин.

Однак, серією власних експериментів, де було визначено інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів за концентрацією дієнового кон'югату (ДК) та малонового діальдегіду (МДА) у нативній спермі, не встановлено кореляційної залежності між рівнем продуктів перекисного окиснення у нативній спермі з концентрацією спермій в еякуляті та біологічною якістю сперми після заморожування-відтавання [50, 51].

В ряді робіт пропонувалося введення до розбавників гормональних засобів як для покращення рухливості і виживаності сперми після реконсервації, так і для підвищення заплідненості самиць після штучного осіменіння. Повідомлялося про підвищення результативності штучної інсемінації овець після застосування в розбавниках сперми баранів простагландину F_{2a} [51, 52], а також простагландину E₂ [53].

Аналогічним чином випробовувались синтетичні аналоги гонадотропін-релізінг-гормонів, які вводились до середовища для сперми бугаїв. Однак ефективність їх застосування у складі розбавників залишилася чітко не визначеною [54]. Проте парентеральне застосування аналогів гонадотропін-релізінг-гормонів перед процедурою штучного осіменіння широко застосовується для високопродуктивних молочних корів, у яких може відбуватися затримка овуляційного процесу і, таким чином, може знижуватися заплідненість після введення до статевих шляхів заморожено-відтаненої сперми у зв'язку з її відносно обмеженим періодом життєздатності [55]. Нами також доведено ефективність окремих синтетичних аналогів гонадотропін-релізінг-гормонів за застосування штучного осіменіння кролематок [56].

Антибіотики широко використовують у розбавниках сперми як сануючі засоби. Проте вони можуть негативно впливати не тільки на мікрофлору, але й на статеві клітини самців, знижуючи їх фізіологічні показники після заморожування-відтавання. Тому за вибору цих засобів рекомендується проводити чіткий контроль щодо їх спермотоксичності і використовувати антибіотики з добре перевіреною ефективністю [57–61].

Висновок. Розроблені кріобіологічні методи дають змогу зберігати запліднюючу здатність значної частки спермій, достатньої для реалізації репродуктивної програми і отримання нащадків. При цьому кількість отриманих нащадків може бути значно більшою, ніж за використання природного відтворення тварин. Однак, створення нових захисних середовищ для глибокого заморожування, спрямованих на підвищення ефективності біотехнології кріоконсервування статевих клітин, продовжується і є перспективним напрямом наукової роботи.

Бібліографічний список

1. Смирнов И. В., Милованов В. К., Соколовская И. И. Диплом на открытие № 103 «Экспериментально установлено неизвестное раннее свойство живчиков млекопитающих сохранять биологическую полноценность и генетическую информацию после замораживания при температуре ниже -20 °С, например, в сжиженных газах с получением нормального потомства от замороженного семени» с приоритетом от июня 1947 года.

2. Милованов В. К. Искусственное осеменение сельскохозяйственных жи-



вотных. М.: Сельхозгиз. 1936. 192 с.

3. Милованов В. К., Соколовская И. И. Теория холодового удара живчиков млекопитающих. *Животноводство*. 1960. №1. С. 44-45

4. Милованов В. К., Селиванова О. А. Разбавители для спермы сельскохозяйственных животных. *Проблемы животноводства*. 1932. № 2. С. 75

5. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев: Урожай, 1968. 254 с.

6. Белоус А. М., Бондаренко Т. П., Бондаренко В. А. Молекулярные механизмы криповреждения мембранных структур. *Криобиология и криомедицина*, 1979, вып.5, С. 3-13.

7. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Теория и практика криогенного и сублиминационного криоконсервирования. Киев: Наук. Думка, 1984. 263 с.

8. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев: Наук. Думка, 1982. 255 с.

9. Бугров А. Д. Криоконсервация и криозащита спермиев быков при глубоком замораживании. Харьков: Институт животноводства НААН, 2015. 330 с.

10. Курбатов А. Д., Платов Е. М., Корбан Н. В. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. Л.: Агропромиздат, 1988. 256 с.

11. Павленко М. П. Нові альтернативні антишокові компоненти рослинної природи і їхній вплив на кріорезистентність та біологічні показники статевих клітин бугаїв при кріоконсервації у безжовткових середовищах. *Розведення і генетика тварин*. К. : Аграрна наука, 2001. № 34. С. 24-30

12. Сушко А. Б., Павленко Б. М., Савельєва М. С., Кіндя В. І. Протективное действие сред для разбавления спермы быков, изготовленных с применением альтернативных антишоковых компонентов. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. Харків. 2013. № 109 С. 205-211.

13. Chelucci S., Pasciu V., Succu S., Addis D., Leoni G. G., Manca M. E., Naitana S., Berlinguer F. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*. 2014 Dec 13. pii: S0093-691X(14) article in press.

14. Mutalik S., Salian S. R, Adiga S. K. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Syst. Biol. Reprod. Med*. 2014. 60(3) P. 183-188.

15. Sharafi M., Zhandi M., Akbari S.A Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell Tissue Bank*. 2014. Jun 8.

16. Najafi A., Najafi M., Zanganeh Z., Adeldust H. Cryopreservation of ram semen in extenders containing soybean lecithin as cryoprotectant and hyaluronic acid as antioxidant. *Reprod Domest Anim*. 2014. 49 (6) P. 934-40.

17. Motlagh M. K. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology*. 2014. 69 (2). P. 217-222.

18. Najafi A., Motlagh M. K., Sharafi M., Zhandi M. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology*. 2014. 69(1) P. 68-73.

19. Anzar M., Rajapaksha K., Boswall L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *Plos one*. 2019. 1-18 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223977>.

20. Лопатко М., Тюпина Л. Замораживание спермы быка без глицерина. *Молочное и мясное скотоводство*. 1971. № 4, с. 24



21. Storey B. T., Noiles E. E., Thompson K. A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 1998. Vol. 37, № 1. P. 46–58.
22. Sztejn J. M., Noble K., Farley J. S., Mobraaten L. E. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 2001. Vol. 41, № 1. P. 28–39.
23. Курбатов А. Д., Платов Е. М., Корбан Н. В. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. Л.: Агропромиздат. 1988. 256 с.
24. Осташко Ф. І., Руденко Є. В., Сушко О. Б., Савельєва М. С. та ін. Національна технологія криоконсервації та використання сперми племінних плідників у системі крупномасштабної селекції (Харківська технологія асептичного одержання криоконсервації сперми бугаїв в облицьованих гранулах) Мін. АПУ. Національна академія аграрних наук України. ІТ НААН. Харків. 2011. 98 с.
25. Осташко Ф. І. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. Київ: Аграрна наука. 1995. 184 с.
26. Платов Е. М., Волков А. С. Технология замораживания спермы барана. Овцеводство. 1978. № 9. с. 35-36.
27. Платов Е. М., Малиновский А. М., Леонтьева Л. И. и др. Итоги и перспективы замораживания спермы. *Овцеводство*. 1981. № 9. с. 34-36.
28. Poldge C., Smith A., Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (London)*. 1949. 164. N 4219. P. 666
29. Бернштейн А. Д., Петропавловский В. В. Влияние неэлектролитов на переживание сперматозоидов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. сообщений* 111. 1937. Т. 3, № 1. С. 21-25.
30. Максимов Н. А. О вымерзании и холодостойкости растений. Экспериментальные и теоретические исследования. *Известия Санкт-Петербургского лесного института*. 1913. 149 с.
31. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С. Криоконсерванты. Киев: Наук. думка, 1979. 198 с.
32. Büyükleblebici S., Barbaros P. T., Numan M. B., Ayşe E., Sariözkan S., Taşdemir U., ÜnlüEndirlik B. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results *Reprod Science Anim*. 2014 30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>
33. Белоус А. М., Грищенко В. И., Паращук Ю. С. Криоконсервация репродуктивных клеток. Киев: Наук. думка, 1986. 208 с.
34. Бугров А. Д. Изучение криозащитных свойств ряда соединений при замораживании спермы быков. *Научно-технический бюллетень НИИ животноводства Лесостепи и Полесья УССР*. Харьков 1980. № 28. С. 73-77.
35. Бугров А. Д., Осташко Ф. И. Роль некоторых криопротекторов при замораживании спермы. *Криобиология и криомедицина*. 1980. № 6. С. 5-9.
36. Бугров А. Д. Криоконсервация и криозащита спермиев быков при глубоком замораживании. Изд. 2-е, дополненное и переработанное, Харьков. Институт животноводства НААН. 2015. 330 с.
37. Линник Т. П. Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. I. Физико-химические свойства соединений ряда амидов. *Проблемы криобиологии*. 1998. № 3. С. 21–28.
38. Линник Т. П. Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. II. Криозащитные свойства соединений ряда амидов. *Проблемы криобиологии*. 1999. № 2. С. 22–32.



39. Сушко О. Б., Сморгонь З., Бохенек М., Міщенко А. Г. Ушкодження мембран сперміїв жеребця при різних методах криоконсервації. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. Харків. 2010. №102. С. 147-152.

40. Сахацкий Н. И., Терещенко А. В., Артеменко А. Б. и др. Разработка защитной среды для консервации спермы петухов. *Научно-техн. бюл. УкрНИИП*, Харьков. 1988. Вып. 24. С. 29–32.

41. Линник Т. П., Терещенко А. В., Артеменко А. Б. Влияние белковых добавок к криозащитной среде на сохранность спермиев петухов при криоконсервировании. *Проблемы криобиологии*. 1996. № 2. С. 35–39.

42. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев: Урожай. 1978. 256 с.

43. Aitken R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*. 1995. 7. P. 659–68.

44. Мартинюк І. М. Структурно-функціональний стан сперматозоїдів півня та індика під дією криопротекторів і низьких температур. автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.19. „Криобіологія”. Харків, 2011. 21 с.

45. Roujeinikova S., Sedelnikova de G. J. Boer Inhibitor binding studies on enoyl reductase reveal conformation changes related to substrate recognition. *Boil Chem*. 1999. Vol. 247, № 43. P. 811-817.

46. Borges J. C., Silva M. R., Rodrigues L. Effect of antioxidant in the cryo-preserved bovine semen evaluated by artificial insemination and in vitro fertilization. *Reproduction in Domestic Animals Book of Abstracts of the 16 - th International Congress on Animal Reproduction*. Budapest, Hungary, 2008. Vol. 43, supplement 3. P. 231-232.

47. Подуфалий В. В., Черкашина И. В., Кучков И. Н. Процессы перекисного окисления липидов в активно-подвижной фракции спермиев человека, выделенной до и после криоконсервирования. *ПКіК*. Харків. 2008. Т. 18, № 4. С. 520-523.

48. Кава С. Й., Яремчук І. М., Остапів Д. Д. Ліпопротеїни сперми бугая за додавання антиоксидантів у розріджувач. *НТЖ інст. біол.твар.* Льв. 2010. Т. 12, № 1. С. 76-81

49. Савельєва М. С. Концентрація продуктів перекисного окислення ліпідів при підготовці та після криоконсервування сперми бугаїв-плідників. *Наук. вісн. Луганського національного аграрного університету*. Луганськ: „Елтон-2”, 2011. № 31. С. 157–160.

50. Савельєва М. С. Поліпшення якісних показників сперми племінних бугаїв у процесі заготівлі, криоконсервування і штучного осіменіння: дис. ... канд. с-г. наук за спеціальністю 06.02.01 – розведення та селекція тварин. ІТ НААН, Харків, 2013.

51. Edqvist, S., Einarsson, S. and Gustafsson, B. Effect of prostaglandin F_{2α} on sperm transport in the reproductive tract of the ewe. *Acta. Vet. Scand*. 1975. 16 P. 149-151

52. Gustafsson, B., Edqvist, S., Einarsson, S. and Linge, F. The fertility of deep frozen ram semen supplemented with PDF_{2α} *Acta. Vet.Scand*. 1975. 16. P. 468-470.

53. Dimov, V. and Stefanov, G. Studies on the content of prostaglandin and fertility of sheep semen. *Proc Int. Conf. Prostaglandins*. (Florence) Italy. 1975. 108

54. Convey R. V., Beck T. W., Neitzel, R Release of HL following, intrauterine administration gonadotropinreleasing hormone. *Can. J. Ahim, Sci*. 1980. 60, P. 1023-1026.



55. Сушко О. Б. Співвідношення різних форм оваріальних дисфункцій у корів високопродуктивних молочних стад. *Таврійський науковий вісник*. Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС. 2018. Вип. 99. с. 203-209

56. Лисин В. И., Сушко А. Б. Результаты применения сурфагона в практике искусственного осеменения кроликов. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. Харків. 2013. № 109. С. 174-181

57. Бугров О. Д., Тихона Г. С., Склярів П. М. Використання комплексу антибіотиків гентаміцину з ампіциліном для деконтамінації ембріонів та сперми бугаїв. Сучасні проблеми ветеринарної медицини, зооінженерії, технологій продуктивних тваринництва : зб. матеріалів міжнар. наук.- практ. конф. м. Львів, 9-11 жовт. 1997 р. М-во АПК України. Львів. акад. вет. медицини ім. С. З. Гжицького. Львів, 1997. С. 121-122.

58. Бугров О. Д., Склярів П. М. Додавання гентаміцину та ампіциліну в середовища для заморожування сперми бугаїв. *Науково-технічний бюлетень УААН*. Харків. 1998. № 75. С. 53-57.

59. Бугров О. Д., Склярів П. М. Додавання антибіотиків в сперму бугаїв. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*. Харків. 1998. Вип. № 27. С. 52-54.

60. Склярів П. Н. Использование комплекса антибиотиков гентамицина и ампициллина для санации спермы и эмбрионов. Використання трансплантації ембріонів в селекції вітворення сільськогосподарських тварин : матеріали міжнар. наук.-вироб. конф. Асканія-Нова, жовт. 1997 р. УААН. Нац. об-ня по плем.справі у тваринництві, Ін-т тваринництва степ. р-нів ім. М.Ф. Іванова «Асканія-Нова». 1997. С. 78-79.

61. Склярів П. М. Вплив комплексу антибіотиків гентаміцин ампіцилін на переживаємість і запліднювальну здатність бугаїв-плідників. *Проблеми зооінженерії та ветеринарії, медицини*. Харків. 1998, С. 36-38.

References

1. Smirnov, I. V., Milovanov, V. K., & Sokolovskaya, I. I. Diplom na otkrytie № 103 «*Ekspperimentalno ustanovleno neizvestnoe ranee svojstvo zhivchikov mlekopitayushih sohranyat biologicheskuyu polnocennost i geneticheskuyu informaciyu posle zamorazhivaniya pri temperature nizhe -20°S, naprimer, v szhizhennyh gazah s polucheniem normalnogo potomstva ot zamorozhenogo semeni*» s prioriteto ot iyunya 1947 goda. [Diploma for the discovery No. 103 “The previously unknown property of mammalian gums to maintain biological usefulness and genetic information after freezing at temperatures below -20 °C, for example, in liquefied gases with obtaining normal offspring from frozen semen ”with a priority of June 1947]

2. Milovanov, V. K. (1936). *Iskusstvennoe osemnenie selskohozyajstvennyh zhivotnyh* [Artificial insemination of agricultural animals] Moscow : Selhooziz [in Russian].

3. Milovanov, V. K., & Sokolovskaya, I. I. (1960). Teoriya holodovogo udara zhivchikov mlekopitayushih [The theory of cold shock in mammals]. *Zhivotnovodstvo*, 1, 44-45 [in Russian].

4. Milovanov, V. K., & Selivanova, O. A. (1932). Razbaviteli dlya spermy selskohozyajstvennyh zhivotnyh [Diluents for sperm of farm animals]. *Problemy zhivotnovodstva*, 2 [in Russian].

5. Ostashko, F. I. (1968). *Glubokoe zamorazhivanie i dlitelnoe hranenie spermy proizvoditelej*. [Deep freezing and long-term storage of sperm producers] Kiev: Urozhaj, [in Russian].



6. Belous, A. M., Bondarenko, T. P., & Bondarenko, V. A. (1979). Molekulyarnye mehanizmy kriopovrezhdeniya membrannykh struktur [Molecular mechanisms of cryodamage of membrane structures]. *Kriobiologiya i kriomedicina - Cryobiology and cryomedicine*. 5, 3-13 [in Russian].
7. Pushkar, N. S., Belous, A. M., & Cvetkov, C. D. (1984). *Teoriya i praktika kriogenogo i sublimacionnogo kriokonservirovaniya* [Theory and practice of cryogenic and sublimation cryopreservation]. Kyiv : Nauk. Dumka [in Russian].
8. Belous, A. M., & Bondarenko, V. A. (1982). *Strukturnye izmeneniya biologicheskikh membran pri ohlazhdenii* [Structural changes in biological membranes during cooling]. Kyiv : Nauk. Dumka [in Russian].
9. Bugrov, A. D. (2015). *Kriokonservaciya i kriozashita spermiev bykov pri glubokom zamorazhivanii* [Cryopreservation and cryoprotection of bull sperm at deep freezing] Institut zhivotnovodstva NAAN. Kharkiv: Institute of Animal Science of NAAS [in Russian].
10. Kurbatov, A. D., Kurbatov, A. D., Platov, E. M., & Korban, N. V. (1988). *Kriokonservaciya spermy sel'skohozyajstvennykh zhivotnykh* [Cryopreservation of sperm of agricultural animals] Leningrad : Agropromizdat [in Russian].
11. Pavlenko, M. P. (2001). Novi alternativni antishokovi komponenti roslinnoyi prirodi i yihnij vpliv na kriorezistentnist ta biologichni pokazniki statevikh klitin bugayiv pri kriokonservaciyi u bezzhovtkovykh seredovishah [New alternative anti-shock components of the dewy nature and their influence on cryoresistance and biological indications of state bugs during cryopreservation in bezzhovtkovy mediums] *Rozvedennya i genetika tvarin*. Kyiv: Agrarna nauka 34, 24-30 [in Ukrainian].
12. Sushko, A. B., Pavlenko, B. M., Savelyeva, M. S., & Kindya, V. I. (2013). *Protektivnoe dejstvie sred dlya razbavleniya spermy bykov, izgotovlennykh s primeneniem alternativnykh antishokovykh komponentov* [Protective effect of media for diluting bull semen, made using alternative anti-shock components] *Naukovo-tekhnichniy biuleten Instytutu tvarynnystva NAAN – Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Science of the National Academy of Agrarian Science of Ukraine*. Harkiv, 109, 205-211 [in Russian].
13. Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G. G., Manca, M. E., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2014). Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, 13, pii: S0093-691X(14) article in press.
14. Mutalik, S., Salian, S. R., & Adiga, S. K. (2014). Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 60 (3), 183-8.
15. Sharafi, M., Zhandi, M., & Akbari, S. A. (2014). Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell Tissue Bank*.
16. Najafi, A., Najafi, M., Zanganeh, Z., & Adeldust, H. (2014). Cryopreservation of ram semen in extenders containing soybean lecithin as cryoprotectant and hyaluronic acid as antioxidant. *Reprod Domest Anim.*, 49 (6), 934-40.
17. Motlagh, M. K., Sharafi, M., & Zhandi, M. (2014). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology*, 69(2), 217-22.
18. Najafi, A., Kia, H. D., & Adeldust, H. (2014). Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology*, 69 (1): 68-73.
19. Anzar, M., Rajapaksha, K., & Boswall, L. (2019). Egg yolk-free cryopreser-



vation of bull semen. *Plos one*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223977>

20. Lopatko M., & Tyupina L. (1971). Zamorazhivanie spermy byka bez glicerina [Freezing of bull semen without glycerin]. *Molochnoe i mjasnoe skotovodstvo - Dairy and beef cattle breeding*, 4, 24.

21. Storey B. T., Noiles E. E., & Thompson K. A. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. Vol. 37, N 1. P. 46–58.

22. Szein J. M., Noble K., Farley J. S., & Mobraaten, L. E. (2001). Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. Vol. 41, N1. P. 28–39.

23. Kurbatov, A. D., Platov, E. M., & Korban, N. V. (1988). *Kriokonservaciya spermy selskohozyajstvennyh zhivotnyh* [Cryopreservation of sperm of agricultural animals] Leningrad : Agropromizdat [in Russian].

24. Ostashko, F. I., Rudenko, Ye. V., Sushko, O. B., Savelyeva, M. S., & Pavlenko, B. M. (2011). Nacionalna tehnologiya kriokonservaciyi ta vikoristannya spermi plemennyh plidnykiv u sistemi krupnomasshtabnoyi selekciyi (Harkivska tehnologiya asepticnogo oderzhannya kriokonservaciyi spermi bugayiv v oblicovanih granulakh) [National technology of cryopreservation and vicarization of sperm of pedigree pups in the system of large-scale selection (Kharkiv technology of aseptic preservation of cryopreservation of sperm of bugs in coated granules)]. *Min. APU, Nacionalna akademiya agrarnih nauk Ukrainy, IT NAAN, Kharkiv* [Ukrainian].

25. Ostashko, F. I. (1995). *Biotehnologiya vosproizvedeniya krupnogo rogatogo skota* [Biotechnology of cattle reproduction] Kiyv : Agrarna nauka [in Russian].

26. Platov, E. M., & Volkov, A. S. (1978). Tehnologiya zamorazhivaniya spermy barana [Ram sperm freezing technology]. *Ovcevodstvo*, 9, 35-36 [in Russian].

27. Platov, E. M., Malinovskij, A. M., & Leonteva, L. I. (1981). Itogi i perspektivy zamorazhivaniya spermy [Results and prospects of sperm freezing]. *Ovcevodstvo*, 9, 34-36 [in Russian].

28. Poldge, C., Smith, A., & Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, London, 164, 4219, 666.

29. Bernshtejn, A. D., & Petropavlovskij, V. V. (1937). Vliyanie neelektrolitov na perezhivanie spermatozoidov [Influence of non-electrolytes on survival of spermatozoa] *Byulleten eksperimentalnoj biologii i medicyny: soobshenij* 111, T.3, 1, 21-25 [in Russian].

30. Maksimov, N. A. (1913). O vmerzhanii i holodostojkosti rastenij. Eksperimentalnye i teoreticheskie issledovaniya. [About freezing and cold resistance of plants. Experimental and theoretical studies] *Izvestija Sankt-Peterburgskogo lesnogo instituta*. [in Russian].

31. Belous, A. M., Shrago, M. I., & Pushkar, N. S. (1979). *Kriokonservanty* [Cryopreservatives]. Kyiv: Nauk. Dumka [in Russian].

32. Buyukleblebici, S., Barbaros, P. T., Numan, M. B., Ayse, E., Sarozkan, S., Tademir, U., & Unluendirlik, B. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Reprod Science Anim.* 30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>

33. Belous, A. M., Hryshchenko, V. Y., & Parashchuk, Yu. S. (1986). *Kryokonservatsiya reproduktyvnykh kletok* [Cryopreservation of reproductive cells] Kyiv : Nauk.dumka [in Russian].

34. Bugrov, A. D. (1980). Izuchenie kriozashitnyh svojstv ryada soedinenij pri zamorazhivanii spermy bykov [Study of the cryoprotective properties of a number of



compounds during freezing of bull sperm]. *Nauchno-tehnicheskij byulleten NII zhivotnovodstva Lesostepi i Polesya USSR*. 28 [in Russian].

35. Bugrov, A. D., & Ostashko, F. I. (1980). Rol nekotoryh krioprotektorov pri zamorazhivanii spermy [The role of some cryoprotectors in sperm freezing] *Kriobiologiya i kriomedicina*, 6, 5-9 [in Russian].

36. Bugrov, A. D. (2015). Kriokonservaciya i kriozashita spermiev bykov pri glubokom zamorazhivanii [Cryopreservation and cryoprotection of bull sperm during deep freezing] *Izd.2-e, dopolnennoe i pererabotannoe - Kharkiv: Institut zhivotnovodstva NAAN* [in Russian].

37. Linnik, T. P. (1998). Amidy alifaticeskikh kislot – effektivnye krioprotektory. I. Fiziko-himicheskie svojstva soedinenij ryada amidov [Physico-chemical properties of compounds of a number of amides] *Problemy kriobiologii*. 3, 21–28 [in Russian].

38. Linnik T. P. (1999). Amidy alifaticeskikh kislot – effektivnye krioprotektory. II. Kriozashitnye svojstva soedinenij ryada amidov [Amides of aliphatic acids are effective cryoprotectors. II. Cryoprotective properties of compounds of a number of amides] *Problemy kriobiologii*. 2, 22–32 [in Russian].

39. Sushko, O. B., Smorong, Z., Bohenek, M., & Mishenko, A. G. (2010). Ushkodzhennya membran spermiyiv zherebcya pri riznih metodah kriokonservaciyi [Damage to stallion sperm membranes during various cryopreservation methods]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu tvarynyystva NAAN – Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Science of the National Academy of Agrarian Science of Ukraine*. Kharkiv, 102. 147-152[in Ukrainian].

40. Sahackij, N. I., Tereshenko, A. V., & Artemenko, A. B. (1988). Razrabotka zashitnoj sredy dlya konservacii spermy petuhov [Development of a protective environment for the preservation of rooster sperm] *Naukovo-tekhnichnyi biuleten UkrNIIP*. Harkov 24, 29–32 [in Russian].

41. Lynnyk, T. P., Tereshchenko, A. V., & Artemenko, A. B. (1996). Vlyanye belkovykh dobavok k kryozashchytnoi srede na sokhrannost spermyev petuhov pry kryokonservyrovanny [The influence of protein additives to the cryoprotective medium on the safety of rooster sperm when cryopreserved] *Problemy kriobiologii*. 2, 35–39 [in Russian].

42. Ostashko, F. Y. (1978). *Hlubokoe zamorazhyvanye y dlytelnoe khranenyje spermy proyzvodytelei* [Deep freezing and long-term storage of sperm of producers] Kyev: Urozhai [in Russian].

43. Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*. 7, 659–68.

44. Martyniuk, I. M. (2011). Strukturno-funktsionalnyi stan spermatozoidiv pivnia ta indyka pid diieiu krioprotektoriv i nyzkykh temperatur [The structural and functional state of rooster and turkey spermatozoa under the influence of cryoprotectants and low temperatures]. (*Extended abstract of candidate's thesis*) Kharkiv: Institute of Animal Science of NAAS [in Ukrainian].

45. Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., & Boer, de G. J. (1999). Inhibitor binding studies on enoyl reductase reveal conformation changes related to substrate recognition *Boil Chem*. 247, 43, 811-817.

46. Borges, J. C., Silva, M. R. & Rodrigues, L. (2008). Effect of antioxidant in the cryopreserved bovine semen evaluated by artificial insemination and in vitro fertilization. *Reproduction in Domestic Animals, Book of Abstracts of the 16 - th International Congress on Animal Reproduction*. Budapest, Hungary, 43, supplement 3, 231-232.



47. Podufalyi, V. V., Cherkashyna, Y. V., & Kuchkov, Y. N. (2008). Protsessy perekysnoho okysleniia lypidov v aktyvno-podvyzhnoi fraktsyyi spermyev cheloveka, vydelennoi do y posle kryokonservuvannia. [Processes of lipid peroxidation in the active-motile fraction of human sperm isolated before and after cryopreservation]. *Problemy kryobyolohyy*. Kharkov, 18, 4, 520-523 [in Russian].
48. Kava, S. Y., Yaremchuk, I. M., & Ostapiv, D. D. (2010). *Lipoproteiny spermy buhaia za dodavannia antyoksydantiv u rozridzhuvach* [Sperm lipoproteins due to the addition of antioxidants to the diluent]. Lviv, 12, 1, 76-81[in Ukrainian].
49. Savelieva M. S. (2011). Kontsentratsiia produktiv perekysnoho okyslennia lipidiv pry pidhotovtsi ta pislia kriokonservuvannia spermy buhaiv-plidnykiv. [Concentration of lipid peroxidation products during preparation and after cryopreservation of semen of breeding bulls] *Nauk. visn. Luhanskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu*. Luhansk: „Elton-2”, 31, 157 – 160 [in Ukrainian].
50. Savelieva M. S. (2013). Polipshennia yakisnykh pokaznykiv spermy plemynykh buhaiv u protsesi zahativli, kriokonservuvannia i shtuchnoho osimeninnia [Improvement of quality indicators of semen of pedigree bulls in the process of procurement, cryopreservation and artificial insemination] (*Extended abstract of candidate's thesis*) Kharkiv: Institute of Animal Science of NAAS [in Ukrainian].
51. Edqvist, S., Einarsson, S. & Gustafsson, B. (1975). Effect of prostaglandin F_{2α} on sperm transport in the reproductive tract of the ewe. *Acta.Vet.Scand.*16, 149-151
52. Gustafsson, B., Edqvist, S., Einarsson, S. & Linge, F. (1975) The fertility of deep frozen ram semen supplemented with PDF_{2α}. *Acta. Vet. Scand.*16, 468-470.
53. Dimov, V., & Stefanov, G. (1975). Studies on the content of prostaglandin and fertility of sheep semen. *Proc Int. Conf. Prostaglandins*. Florence, Italy, 108
54. Convey, R. V., Beck, T.W., & Neitzel, R (1980) Release of HL following, intrauterine administration gonadotropinreleasing hormone. *Can. J. Ahim, Sci.*60, 1023-1026.
55. Sushko, O. B. (2018). Spivvidnoshennia riznykh form ovarialnykh dysfunktsii u koriv vysokoproduktyvnykh molochnykh stad [Ratio of various forms of ovarian dysfunctions in cows of high-yielding dairy herds] *Tavriiskyi naukovi visnyk. Naukovi zhurnal*. Kherson, 99. 203-209.
56. Lysyn, V. Y., & Sushko, A. B. (2013). Rezultaty pryimeneniia surfahona v praktyke yskusstvennoho osemeneniia krolykov [The results of using surfagon in the practice of artificial insemination of rabbits]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu tvarynnytstva NAAN – Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Science of the National Academy of Agrarian Science of Ukraine*. Kharkiv, 109. 174-181[in Russian].
57. Buhrov, O. D., Tykhona, H. S., & Skliarov, P. M. (1997). Vykorystannia kompleksu antybiotykyv hentamitsynu z ampitsylinom dlia dekontaminatsii embrioniv ta spermy buhaiv [Use of a complex of antibiotics gentamicin with ampicillin for decontamination of embryos and sperm of bulls] *Zb. materialiv mizhnar. nauk. prakt. konf. Lviv. akad.vet.medytsyny im. S.Z. Hzhyskoho*, 121-122 [in Ukrainian].
58. Buhrov, O. D., & Skliarov, P. M. (1998) Dodavannia hentamitsynu ta ampitsylinu v seredovyshcha dlia zamorozhuvannia spermy buhaiv. [Addition of gentamicin and ampicillin to bull sperm freezing medium]: *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu tvarynnytstva*, Kharkiv 75, 53-57 [in Ukrainian].
59. Buhrov, O. D., & Skliarov, P. M. (1998). Dodavannia antybiotykyv v spermu buhaiv [Addition of antibiotics to the semen of bulls]. *Problemy zoolozheniia ta veterynarnoi medytsyny*. Kharkiv, 27, 52-54 [in Ukrainian].
60. Skliarov, P. N. (1997). Yspolzovanye kompleksa antybyotykyv hentamy-



tsyna y ampitsyllyna dlia sanatsyy spermy i embryonov [The use of a complex of antibiotics gentamicin and ampicillin for the sanitation of sperm and embryos] *Vykorystannia transplantatsii embrioniv v seleksii vitvorennia silskohospodarskykh tvaryn, Askaniia-Nova: materily mizhnar.nauk.-vyrob. konf.*, 78-79 [in Russian].

61. Skliarov, P. M. (1998). Vplyv kompleksu antybiotykyv hentamitsyn+ ampitsylin na perezhyvaiemist i zaplidniuvalnu zdatnist buhaiv-plidnykiv [The influence of the complex of antibiotics gentamicin + ampicillin on the survivability and fertilizing ability of breeder bulls] *Problemy zoonzhenerii ta veterynarii medytsyny*. Kharkiv, 36-38 [in Ukrainian].

PROTECTIVE ENVIRONMENTS FOR ANIMAL SPERM: EVOLUTION OF METHODS AND TOPICAL ASPECTS (REVIEW ARTICLE)

Sushko A., Institute of Animal Science NAAS.

Zhegunov G., State University of Biotechnology.

Savelieva M., Yeletska L., Martyniuk I., Institute of Animal Science NAAS.

A retrospective review of domestic and foreign sources of literature is presented, as well as data of published own research on cryopreservation of animal sperm. The main historical stages of the creation of protective environments for deep freezing of sperm are given.

In the 30s of the last century, a phenomenon characterized by the death of spermatozoa upon sharp cooling in the range of positive temperatures was discovered. It is called temperature shock of sperm. To prevent it, it is proposed to add substances containing phospholipids to the composition of diluents. Such environments can contain both simple components - native chicken egg yolk or milk, and high-tech - lipoproteins, isolated phospholipids of various origins. To stabilize protein-lipid complexes of plasma membranes and acrosomes of sperm during the cooling process, carbohydrates are added to the diluents. Sugars are components of energy supply for sperm and, along with salts, they are the main osmotic regulators. A combination of two or three carbohydrates in the medium was traditionally considered necessary. However, the Kharkiv school of reproductive specialists has proven the possibility of creating effective protective environments using only one sugar - sucrose or lactose - based on considerable practical experience.

The effectiveness of germ cell freezing is shown depending on the cryoprotectants used. Glycerin is the first known endocellular cryoprotectant, which is still unsurpassed in sperm cryopreservation. Our own experimental data on the effect of combinations of glycerol with substances from the amide group on the main biological indicators of sperm after deconservation are presented. Cryoprotectants dimethylacetamide (DMAC) and dimethylformamide (DMF) were tested in own experiments on stallion semen. The experiments studied the effect of different concentrations of the above-mentioned penetrating cryoprotectants both on the main physiological characteristics of stallion sperm (motility, survival), and on the degree of damage to the membrane apparatus of sperm. The effectiveness of certain combinations of these substances has been proven.

Methods of preventing the negative impact of oxygen and the development of lipid peroxidation processes in sperm during cryopreservation are presented. The concept of using additional hormonal components in diluents, in particular prostaglandin F2a, is revealed. The materials related to the effect on the quality of reproductive cells of healing preparations are displayed.

Keywords: artificial insemination, environments, semen, animals, bulls, stallions, cryoprotectants, freezing.