



animals. Track the evolution of industry basic and applied research as a result of the work of scientists in the scientific field for the needs of livestock practice.

During the study period (1932-1999) the institution changed its name several times: Southern Institute of Dairy Science (1930-1934), Ukrainian Research Institute of Cattle (1934-1935), Ukrainian Research Institute of Animal Husbandry (1935-1956), Research Institute of Animal Husbandry of the Forest-Steppe and Polissya of the Ukrainian SSR (1956-1992), Institute of Animal Husbandry of UAAS (1992-2010), now - Institute of Animal Husbandry of NAAS.

The formation of scientific research on the problems of artificial insemination dates back to 1932-1941. In the period of postwar reconstruction (1946-1948), scientific topics are characterized by more in-depth development of topics and experiments. The period of the highest creative activity of scientists in 1949-1990 - the existing and new methods of artificial insemination were improved. With the opening of state breeding stations and artificial insemination stations, the widespread use of this method in the practice of animal husbandry began. IV Smirnov's work was the impetus for the development of methods for freezing and long-term storage of sperm of broodstock. Embryo transplant work has been developed. The embryo has been established to implement the latest advances in farm animal biotechnology and to significantly expand the scope of international scientific contacts. At the beginning of the period of revival of Ukrainian statehood: 1991 - 1999 the issues of animal reproduction theory and further improvement on this basis of technologies for obtaining, cryopreservation and use of gametes and zygotes in artificial insemination and embryo transplantation, as well as development of more efficient biological environments and technical means new technologies.

*Keywords:* artificial insemination, history, cattle, scientific research, Southern Institute of Dairy Science, Ukrainian Research Institute of Animal Husbandry, Research Institute of Animal Husbandry of the Forest-Steppe and Polissya of the Ukrainian SSR.

УДК 636.082

DOI 10.32900/2312-8402-2022-127-23-31

## **ІСТОРИЧНІ ПЕРЕДУМОВИ ТА ТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМИ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН**

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

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

**Мартинюк І. М.**, к.с.-г. н., <https://orcid.org/0000-0002-3675-124X>

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

Інститут тваринництва НААН

*Наведено основні історичні етапи створення методів і технологій глибокого заморожування сперми. Зокрема показано роль Лаццаро Спалланцані (Lazzaro Spallanzani), який вперше здійснив штучне осіменіння сук охолодженою спермою. Показано історичне місце Іванова І. І., що вперше запропонував використання штучного осіменіння тварин для якісного поліпшення тварин. Відмічено роль робіт Р. Н. Fillips, Н. А. Lardi, які відкрили захисні властивості яєчного жовтка у складі розбавника при охолодженні сперми. Відмічено, що G. W. Salisbury, Н. К. Fuller, E. L. Willett вперше використали натрій лимонно-кислий у складі се-*



редовиц для подовження життя сперміїв. Відображено значення піонерської роботи І. В. Смирнова, який успішно застосував заморожування сперми до дії низьких температур і отримав живих тварин після штучного осіменіння. Детально викладено питання щодо першовідкривачів гліцерину як захисної речовини при заморожуванні сперми. Традиційно вважалось, у західній історіографії, що С. Polge, A. Smith, A. Parks відкрили протективні властивості гліцерину. Але, ще задовго до їх досліджень А. Д. Берштейн та В. В. Петропавловський використали цю речовину при заморожуванні сперми до мінус 21 °С. Показано значення методу Nagase H., Niva T., що розробили технологію заморожування сперми в формі відкритих гранул. Відмічена роль Роберта Кассу (Cassou R.) – винахідника пайет, які на теперішній час є основним технологічним засобом при кріоконсервуванні сперми та штучному осіменінні тварин. Відзначено, що створена під керівництвом Ф. І. Осташка Харківська технологія асептичного отримання та кріоконсервування сперми бугаїв є важливим етапом подальшого розвитку біотехнології кріоконсервування сперми тварин.

У результаті тривалої роботи вчених здобуті фундаментальні знання, створені кріобіотехнології, які дозволяють зберігати сперму тварин *in vitro* у глибоко замороженому стані практично необмежений проміжок часу.

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

Консервування й зберігання сперми самців за низьких температур є найпоширенішою у практиці тваринництва біотехнологією. Сьогодні кріоконсервування сперми є сегментом загальної системи репродукції багатьох видів сільськогосподарських та свійських тварин, побудованої на використанні методу штучного осіменіння. Ця репродуктивна технологія пройшла тривалий шлях розвитку, а її сучасний рівень є результатом праці багатьох тисяч науковців і практиків.

Перші достовірно відомі праці зі збору та використання сперми тварин належать італійському природодосліднику аббату Лаццаро Спалланцані (Lazzaro Spallanzani) і датовані 1776 р. Ним були проведені успішні досліди з охолодженою спермою кобелів, що завершилися народженням після штучної інсемінації сук трьох здорових цуценят за нормальної тривалості вагітності [1].

Після перших досліджень пройшло ще більше ніж сто років, до того часу, коли російський біолог Ілля Іванович Іванов знайшов принципово нове поле для застосування штучного осіменіння, заклавши основи методу для якісного поліпшення племінних і продуктивних властивостей тварин [2]. До того штучна інсемінація самиць використовувалась лише як спосіб подолання проблем відтворення у окремих тварин при неможливості природного парування (аномалії статевих органів, значна порідна диференціація, агресивна поведінка, захворювання кінцівок тощо).

Забігаючи наперед, слід зазначити, що саме платформа застосування сперми для вирішення завдань якісного поліпшення тварин І. І. Іванова стала надалі благодатною базою для розробки та впровадження методів глибокого заморожування та зберігання у кріобанках статевих клітин самців.

Іванов І. І. вперше довів, що секрети придаткових статевих залоз активізують обмінні процеси у спермі, що має негативний вплив для зберігання сперми поза організмом. Ним було запропоновано видалення цих секретів або радикальне зменшення їх концентрації шляхом розведення еякуляту фізіологічним розчином хлористого натрію та іншими розбавниками. У 1932 р. В. К. Мілованов і О. А. Се-



ліванова вперше довели позитивний ефект від застосування фосфоліпідів у середовищах для розрідження сперми тварин [3].

Суттєвий прогрес у вирішенні проблем захисту спермій ссавців забезпечила робота Р. Н. Phillips, Н. А. Lardi (1940 р.) щодо протективних властивостей яєчних жовтків птиці [4]. Після цього відкриття абсолютна більшість практично значимих рецептур захисних середовищ сперми мали у своєму складі жовток курячого яйця або компоненти з нього отримані. Використання жовтка, який містить у своєму складі фосфоліпідів, суттєво підвищило ефективність зберігання статевих клітин поза організмом, запобігаючи негативному впливу перепаду температур на фізіологічні показники сперми, тим самим підвищуючи заплідненість самиць. Технологія виготовлення розбавників сперми з застосуванням жовткових компонентів, що домінувала протягом кількох десятиріч, не втратила своєї актуальності для окремих видів і до цього часу.

Salisbury G. W., Fuller H. K., Willett E. L. [5] суттєво поліпшили протективні середовища, запропонувавши використовувати в них порід жовтком Na-цитрат (натрій люмоноксидний) як буфер для подовження життєздатності сперми при зберіганні поза організмом. Надалі це знайшло широке практичне застосування.

Можливість тривалого зберігання сперми сільськогосподарських тварин за низьких температур та отримання повноцінних нащадків після осіменіння самиць відтаненою спермою вперше була доказана роботами І. В. Смірнова та І. І. Соколовської, під керівництвом В. К. Мілованова [6]. У процесі виконання дисертаційної роботи у Всесоюзному науково-дослідному інституті тваринництва (м. Подольск, Московська область) І. В. Смірнов у 1948 р. вперше у світі одержав кроленят після штучного осіменіння кролиць глибокозамороженою спермою. У його дослідах, сперма охолоджувалася за допомогою твердого вуглецю ( $-78^{\circ}\text{C}$ ) та після переносу зберігалася за температури рідкого кисню ( $-183^{\circ}\text{C}$ ) до 32 діб [7]. У 1949 р. ним, на підставі отриманих результатів, було захищено дисертаційну роботу на тему «Збереження сперми сільськогосподарських тварин шляхом глибокого охолодження». У 1950 – 1951 рр. І. І. Смірнов, працюючи у Науково-дослідному інституті тваринництва Лісостепу і Полісся УРСР (нині Інститут тваринництва НААН, м. Харків), отримав здорових нащадків після осіменіння самиць глибокозамороженою спермою баранів та бугаїв, тим самим започаткувавши новий етап розвитку репродуктивних технологій у тваринництві [8, 9].

При цьому слід відмітити, що І. І. Соколовська також активно працювала в цьому напрямі, але її досліди з заморожування сперми кролів до температури  $-78^{\circ}\text{C}$  не мали успіху. Після перебування спермій більше 15 хв за цієї температури вони не відновляли руху. Успішними були досліди, проведені у 1947 р. І. І. Соколовською, із заморожування сперми кролів до температури  $-20$  та  $-40^{\circ}\text{C}$  з короткочасним перебуванням статевих клітин за цієї температури (5 хв), після яких 10 кролиць народили повноцінних кроленят [8, 10]. І хоча ця робота була важливим кроком вперед, однак з рівня сьогоднішніх знань, заморожування до цієї температури й короткочасність зберігання сперми у такому стані, навряд чи можливо назвати глибоким та тривалим.

Чергова знакова подія у цій галузі сталася, як вважається у західній історіографії, коли у 1949 р. С. Polge, А. Smith, А. Parks виявили захисну роль гліцерину для статевих клітин самців при заморожуванні до низьких температур [11]. Слід відзначити існування альтернативної думки відносно відкриття захисних властивостей гліцерину стосовно спермій тварин. Існують дані, що ще у 1937 р. А. Д. Берштейн та В. В. Петропавловський використовували 9,6 % розчин гліцерину для захисту спермій ссавців та птиці при заморожуванні до  $-21^{\circ}\text{C}$  [12]. Про



це автори повідомили у своїй роботі «Вплив неелектролітів на переживання сперматозоїдів». Цілком вірогідно, що ці відкриття захисних властивостей гліцерину до сперми, були зроблені радянськими й англійськими вченими незалежно один від одного. За певних причин, праця А. Д. Берштейна та В. В. Петропавлівського на момент «повторного відкриття» С. Polge зі співавторами гліцерину як захисного компонента для сперми, могла бути невідомою у широких наукових колах.

Питання пріоритету відкриття цих радянських вчених щодо застосування гліцерину у розбавниках сперми було розглянуто у 1968 р. на VI Міжнародному конгресі зі розмноження і штучного осіменіння тварин [13–15]. Пізніше ця інформація знайде відображення у низці відомих публікацій з кріобіології сперми тварин та людини. У цьому контексті не можливо не згадати, що перше застосування гліцерину як захисного компонента для біологічних об'єктів за впливу на них температури нижче 0 °С було зроблене М. А. Максимовим, хоча дослідження не стосувалося сперми тварин. Про це автор повідомив у своїй роботі «Про вимерзання та холодостійкість рослин: експериментальні і теоретичні дослідження» у 1913 р., де гліцерин був використаний для захисту черенів [16].

У 50–70-х роках ХХ ст. було створено велику кількість рецептур середовищ для розбавлення сперми тварин, різні методи упаковки та технологічні регламенти процедури кріоконсервування, які значно підвищили результативність заморожування сперми тварин та ефективність штучного осіменіння нею самиць.

У 1952 р. англійські вчені С. Polge і L. Rowson повідомили про створення достатньо ефективного методу кріоконсервування сперми бугаїв у скляних ампулах на основі глюкозо-цитратно-жовткового середовища з додаванням гліцерину [17, 18].

Японські вчені Н. Nagase., Т. Niva у 1964 р. розробили спосіб кріоконсервування сперми бугаїв у формі відкритих гранул, які отримувались шляхом внесення розбавленої сперми у лунки на блоках сухого льоду [19]. Пізніше, у 1966 р., цими дослідниками було реалізовано подібний метод для глибокого заморожування сперми жеребців [20]. Метод японських вчених також дозволив суттєво знизити концентрацію гліцерину в середовищі до 3,5 % (з коливаннями 1,75 – 5 %).

Розроблений Н. Nagase, Т. Niva метод набув широкої популярності у світі та був покладений за основу багатьох наступних модифікацій заморожування сперми тварин у відкритих гранулах. Зокрема це стосується й способу, популярного до теперішнього часу для певних задач, з нанесенням розбавленої сперми тварин на фторопластову пластину з лунками, попередньо охолоджену у рідкому азоті [21, 22].

Сперма заморожена у відкритих гранулах демонструє добру рухливість після відтавання (40–55 % сперміїв з прогресивним рухом). Проте метод вважається недостатньо надійним з точки зору санітарії. Кріоконсервовані спермодози захищені від контамінації мікроорганізмами, які можуть переноситися від однієї партії сперми до другої рідким азотом під час зберігання. Крім того, відкриті гранули потребують додаткових маніпуляцій перед штучним осіменінням, а саме, розведення окремим середовищем при деконсервації.

Найбільш поширеною сьогодні у світі є технологія кріоконсервування сперми, пов'язана з розфасуванням біоматеріалу у пайети – полімерні соломинки зі спеціальними пробками та ультразвуковою запайкою. Вона застосовується практично для всіх основних видів сільськогосподарських тварин. Технологія розроблена вперше у Франції у 1964 р. Робертом Кассу (R. Cassou) та надалі багатократно модернізована [23]. Слід відмітити, що прототипом пайетної технології був



спосіб В. К. Мілованова з розфасовкою сперми у тросникові стеблини, започаткований ще у 1936 р.

Оригінальні полімерні пайєти виготовляються об'ємом 0,25 і 0,5 мл. Основними компаніями з виготовлення витратних матеріалів та обладнання є «IMV technologies» (Франція) [26] та «Minitube» (Німеччина) [27], що придбали відповідні авторські права. Ці ж компанії мають дослідно-конструкторські та випробувальні центри, в яких постійно проводиться науково-обґрунтована робота з вдосконалення обладнання для кріоконсервування, оцінки сперми та інструментарію для штучного осіменіння самиць.

Ще однією з оригінальних технологій, яка набула широкого застосування на практиці, є Харківська технологія асептичного отримання, кріоконсервування і використання сперми бугаїв, розроблена колективом вчених під керівництвом академіка Осташко Ф. І. [28–30]. Технологія використовувалась у тваринництві більш ніж 30 областей колишнього Радянського Союзу протягом тривалого періоду і локально застосовується до цього часу. Її особливістю є те, що сперма протягом всього технологічного процесу – отримання, розбавлення, охолодження, еквілібрації, кріоконсервування, кріозберігання, деконсервації і введення в статеві шляхи самиць не має контакту з зовнішнім середовищем і, таким чином, не контамінується мікроорганізмами. Харківська технологічна лінія забезпечує розфасовку сперми у так звані облицьовані гранули. Сперма закачується у тонкостінну полімерну трубку діаметром 3,8 мм. Після цього спеціальний апарат в автоматичному режимі герметизує розбавлену сперму і розрізає трубку на окремі сегменти, утворюючи м'які контейнери об'ємом 0,25 мл. У такій формі спермодози проходять усі подальші етапи охолодження, кріоконсервування й використання [31, 32].

**Висновок.** У результаті тривалої роботи вчених здобуті фундаментальні знання, створені кріобіотехнології, які дозволяють зберігати сперму тварин *in vitro* у глибоко замороженому стані практично необмежений проміжок часу. Вагомий внесок у ці знання та розробку практично значимих методів зроблено вітчизняними вченими.

Запропоновані технології дозволяють 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 природним відтворенням тварин. Однак, створення нових кріозахисних середовищ та методів глибокого заморожування, направлених на підвищення ефективності біотехнології кріоконсервування статевих клітин, продовжується і є перспективним напрямом наукової роботи.

### Бібліографічний список

1. Spallanzani L. Opuscoli di Fisica. Animale e Vegetabile, Opuscola.2. Osservazioni, e Sperienze intorno ai Vermicelli Spermatici dell'Uomo e degli Animali. Modena, 1776. 138 p.
2. Осташко Ф. І., Сушко О. Б. Ілля Іванович Іванов – видатний біолог ХХ століття (1870-1932 рр.). *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. Харків, 2010. № 102. С. 222–226.
3. Мілованов В. К., Селиванова О. А. Разбавители для спермы сельскохозяйственных животных. *Проблемы животноводства*. 1932. № 2. С. 75–86.
4. Phillips P. H., Lardy H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.* 1940. Vol. 23. P. 399–404. doi: 10.3168/jds.S.0022-0302 (40) 95541-2



5. Salisbury G. W, Fuller H. K, Willett E. L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *J. Dairy Sci.* 1941. Vol. 24. P. 905–910. doi: 10.3168/jds.S0022-0302 (41) 95476-0.

6. Милованов В. К. Свойство живчиков млекопитающих сохранять биологическую полноценность после быстрого замораживания. Диплом на открытие № 103 от 28.11.1972 г., с приоритетом – июнь 1947 г.

7. Смирнов И. В. Сохранение спермы сельскохозяйственных животных при температуре 78 °С. *Социалистическое животноводство.* 1951. № 1. С. 94–95.

8. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. Москва : Сельхозиздат, 1962. 696 с.

9. Кунець В. В. Відділ біотехнології репродукції сільськогосподарських тварин: історія, вчені, досягнення (історичний нарис) / НААН. Інститут тваринництва. Харків, 2013. С. 45-46.

10. Соколовская И. И. Может ли замороженная сперма оплодотворять и давать нормальное потомство. *Доклады ВАСХНИЛ.* 1947. № 6. С. 13–18.

11. Poldge C., Smith A., Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949. Vol. 164. № 4219. P. 666.

12. Бернштейн А. Д. Влияние неэлектролитов на переживание сперматозоидов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины:* (сообщ. 111). 1937. Т. 3. № 1. С. 21–25.

13. Смирнов Л. Н. Советский Союз – родина искусственного осеменения сельскохозяйственных животных. *Доклады советских ученых к VI Международному конгрессу по размножению и искусственному осеменению животных.* Москва : Колос, 1968. С. 5–10.

14. Смирнов Л. Н. VII Международный конгресс по размножению и искусственному осеменению животных. *Животноводство.* 1969 № 2. С. 77–85.

15. Бугров А. Д. Криоконсервация и криозащита спермиев быков при глубоком замораживании. 2-е изд., доп. и перераб. Харьков : Институт животноводства НААН, 2015. 330 с.

16. Максимов Н. А. О вымерзании и холодостойкости растений. Экспериментальные и теоретические исследования. *Известия Санкт-Петербургского лесного института.* Санкт-Петербург, 1913. Вып 25. С. 1–330.

17. Poldge C., Rowson L. E. A. Fertilization capacity of bull spermatozoa after freezing – 79 °C. *Nature.* 1952. № 169. P. 626–627.

18. Poldge C., Rowson L. E. A. Results with bull semen stored at – 79 ° C. *Vet. Rec.,* 1952. Vol. 64. P. 851.

19. Nagase H., Niwa T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. A .I.* Trento, 1964. P. 410–415.

20. Nagase H., Suejima S., Niwa T., Oshida H., Sagara Y., Ishizaki N., Hoshi S. Studies in the freezing storage of stallion semen. I. Fertility results of stallion semen frozen in concentrated pellet from Jap. *J. Anim. Reprod.* 1966. Vol. 12. P. 48–52.

21. Ющенко Н. П., Семаков В. Г., Левин К. Л. Замораживание спермы быков в гранулах без применения сухого льда. *Молочное и мясное скотоводство.* 1968. № 5. С. 36–37.

22. Ющенко Н. П. Семаков В. Г., Левин К. Л. Замораживание спермы быков в гранулах. *Молочное и мясное скотоводство.* 1970. № 10. С. 30–31.

23. Cassou R. La method des paillettes en plastique et son adaption la generalization de la congelation. *C.R. Acad. Agric.* 1964. № 50. P. 881–887.

24. Курбатов А. Д., Платонов Е. М., Корбан Н. В. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. Ленинград : Агропромиздат, 1988. 256 с.



25. Милованов В. К. Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Москва : Сельхозгиз, 1936. 192 с.
26. IMV Group and missions - IMV Technologies. Retrieved from <https://www2.imv-technologies.com/imv-group-and-missions.html>
27. About Minitube: [Electronic resource]. Retrieved from: <https://www.minitube.com/about-minitube>.
28. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев : Урожай, 1968. 254 с.
29. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев : Урожай, 1978. 256 с.
30. Осташко Ф. И., Чирков В. А., Бугров А. Д., Канцедаль В. И., Павленко М. П. Воспроизведение стада в промышленном скотоводстве. Киев : Урожай, 1982. 168 с.
31. Осташко Ф. И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. Киев : Аграрна наука, 1995. 184 с.
32. Осташко Ф. И., Руденко Є. В., Сушко О. Б., Савельева М. С. Національна технологія кріоконсервації та використання сперми племінних плідників у системі крупномасштабної селекції (Харківська технологія асептичного одержання кріоконсервації сперми бугаїв в облицьованих гранулах). Харків : Інститут тваринництва НААН, 2011. 98 с.

### References

1. Spallantsani, L., & Opuskoli di Fiska (1776). *Animale e Vegentable*, Opuscola. 2. Osservazioni, e Sperienze intorno ai Vermicelli Spermatici dell'Umo e degli. Animal. Modena, 138.
2. Ostashko, F. I., & Sushko, O. B. (2010). Il'ya Ivanovich Ivanov – vudatnyy biolog XX veka (1870-1932) [Illia Ivanovych Ivanov – vydatnyi bioloh KhKh stolittia]. *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 : NAAN, 102. P. 222 – 226 [in Ukrainian].
3. Milovanov, V. K., & Selivanova, O. A. (1932). Razbaviteli dlja spermy sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh. [Diluents for sperm of agricultural animals]. *Problemy zhivotnovodstva*, 2, 75–86 [in Russian].
4. Fillips, P. H., & Lardi, H. A. (1940). Zheltok-bufernaya pasta dlya sokhraneniya spermybykov. *J. Dairy Sci.*, 23, 399–404. doi:10.3168/jds.S0022-0302(40)95541-2 [in Russian].
5. Salisbury, G. W., Fuller, H. K., & Willett, E. L. (1941). Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *J. Dairy Sci.*, 24, 905–10. doi: 10.3168/jds.S0022-0302. (41). 95476-0.
6. Milovanov, V. K. (1947). *Svoystvo zhivchikov mlekopitajushhih sohranjat' biologicheskiju polnocennost' posle bystrogo zamorazhivaniya* : diplom na otkrytiye s prioritom [The property of living mammals to maintain biological usefulness after rapid freezing]: opening diploma with priority – 103. 28.11.1972 [in Russian].
7. Smirnov, I. V. (1951). Sohranenie spermy sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh pri temperature 78 °S [ Preservation of sperm of farm animals at a temperature of 78 °C]. *Sotsialisticheskoye zhivotnovodstvo*, 3, 94–95 [in Russian].
8. Milovanov, V. K. (1962). *Biologiya vosproizvodstva i is- kusstvennoye osemeneniye zhivotnykh* [Biology of reproduction and artificial insemination of animals.]. Moscow : Sel'khozizdat [in Russian].



9. Kunets, V. V. (2013). *Viddil biotekhnolohii reproduksii silskohospodarskykh tvaryn: istoriia, vcheni, dosiahnennia (istorychnyi narys)* [Department of Biotechnology of Reproduction of Farm Animals: History, Scientists, Achievements (historical essay)]. Kharkiv, 45-46 [in Ukrainian].
10. Sokolovskaya, I. I. (1947). *Mozet li zamorogenaya sperma oplodotvoryat' i davat' normal'noye potomstvo* [Can frozen sperm fertilize and produce normal offspring]. *Doklady VASHNIL*, 6, 13-18 [in Russian].
11. Poldge, C., Smith, A., & Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164, 4219, 666.
12. Bernshteyn, A. D., & Petropavlovskiy, V. V. (1937). *Vliyanie nejelektrolitov na perezhivanie spermatozoidov* [Effect of Non-Electrolytes on Sperm Survival]. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i medicyny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 111, 3, 1, 21–25 [in Ukrainian].
13. Smirnov, L. N. (1968). *Sovetskij Sojuz – rodina iskusstvennogo osemnenija sel'skohozjajstvennyh zhyvotnyh* [The Soviet Union is the birthplace of artificial insemination of farm animals]. *Doklady sovetskih uchenyh k VI Mezhdunarodnomu kongressu po razmnozheniju i iskusstvennomu osemneniju zhyvotnyh* [Reports of Soviet scientists to the VI International Congress on reproduction and artificial insemination of animals]. Moscow : Kolos, 5-10 [in Russian].
14. Smirnov, L. N. (1969). *VII Mezhdunarodnyj kongress po razmnozheniju i iskusstvennomu osemneniju zhyvotnyh* [International Congress on Animal Breeding and Artificial Insemination]. *Zhyvotnovodstvo*, 2, 77-85 [in Russian].
15. Bugrov, A. D. (2015). *Kriokonservacija i kriozashhita spermiev bykov pri glubokom zamorazhivanii* [Cryopreservation and cryoprotection of bull sperm at deep freezing]. Kharkov : Instytut tvarynnytstva NAAN [in Russian].
16. Maksimov, N. A. (1913). *O vymerzanii i holodostojkosti rastenij. Jeksperimental'nye i teoreticheskie issledovanija* [On the freezing and cold resistance of plants. Experimental and theoretical studies]. *Izvestija Sankt-Peterburgskogo lesnogo instituta* [Proceedings of the St. Petersburg Forestry Institute], 25, 1–330 [in Russian].
17. Poldge, C., & Rowson, L. E. A. (1952). Fertilization capacity of bull spermatozoa after freezing – 79 °C. *Nature*, 169, 626-627.
18. Poldge, C., & Rowson, L. E. A. (1952). Results with bull semen stored at – 79 °C. *Vet. Rec.*, 64, 851.
19. Nagase, H. & Niwa, T. (1964). Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. *Proc.5<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod.* Trento, 410 – 415.
20. Nagase, H., Suejima, S., Niwa, T., Oshida, H., Sagara, Y., Ishizaki, N. & Hoshi, S. (1966). Studies in the freezing storage of stallion semen. I. Fertility results of stallion semen frozen in concentrated pellet from Jap. *J. Anim. Reprod*, 12, 48-52.
21. Yushchenko, N. P., Semakov, V. G., & Levin, K. L. (1968). *Zamorazhivanie spermy bykov v granulach bez primenenija suhogo l'da* [Freezing of bull semen in granules without the use of dry ice] *Molochnoye i myasnoye skotovodstvo*, 5, 36–37 [in Russian].
22. Yushchenko, N. P., Semakov, V. G., & Levin K. L. (1970). *Zamorazhivanie spermy bykov v granulach* [Freezing bull semen in granules]. *Molochnoye i myasnoye skotovodstvo*, 10, 30-31 [in Russian].
23. Cassou, R. (1964). *La method des paillettes en plastique et Son Adaptation la Generalization de la Congelation* *C.R. Acad. Agric.*, 50, 881-887.
24. Kurbatov, A. D., Platov, Ye. M., & Korban, N. V. (1988). *Kriokonservacija spermy sel'skohozjajstvennyh zhyvotnyh* [Cryopreservation of semen from farm animals]. Leningrad : Agropromizdat [in Russian].





25. Milovanov, V. K. (1936). *Iskusstvennoe osemenenie sel'skhozjajstvennyh zivotnyh* [Artificial insemination of farm animals]. Moscow : Sel'khozgiz [in Russian].
26. IMV Group and missions - IMV Technologies [Electronic resource] Retrieved from <https://www2.imv-technologies.com/imv-group-and-missions.html>
27. About Minitube. Retrieved from <https://www.minitube.com/about-minitube>
28. Ostashko, F. I. (1968). *Glubokoe zamorazhivanie i dlitel'noe hranenie spermy proizvoditelej* [Deep freezing and long-term storage of sperm producers]. Kiev : Urozhay [in Russian].
29. Ostashko, F. I. (1978). *Glubokoe zamorazhivanie i dlitel'noe hranenie spermy proizvoditelej* [Deep freezing and long-term storage of sperm producers]. Kiyev : Urozhay [in Russian].
30. Ostashko, F. I., Chirkov, V. A., Bugrov, A. D., Kancedal, V. I., & Pavlenko, M. P. (1982). *Vosproizvedenie stada v promyshlennom skotovodstve* [Herd reproduction in industrial cattle breeding]. Kiev : Urozhay [in Russian].
31. Ostashko, F. I. (1995). *Biotehnologija vosproizvedenija krupnogo rogatogo skota* [Biotechnology of reproduction of cattle]. Kiyev : Agrarna nauka [in Russian].
32. Ostashko, F. I., Rudenko, Y. V., Sushko, O. B., & Savelyeva, M. S. (2011). *Natsionalna tekhnolohiya kriokonservatsiyi ta vykorystannya spermy pleminykh plidnykiv u systemi krupnomasshtabnoyi selektsiyi (Kharkivska tekhnolohiya aseptychnoho oderzhannya kriokonservatsiyi spermy buhayiv v oblytsovanykh hranulakh)* [National technology of cryopreservation and use of semen of breeding breeders in the system of large-scale selection (Kharkiv technology of aseptic production of cryopreservation of bull semen in lined granules)]. Kharkiv [in Ukrainian].

#### *HISTORICAL PREREQUISITES AND TECHNOLOGICAL APPROACHES CRYOCORPRESERATION OF AGRICULTURAL SPERM*

*Sushko A., Saveliya M., Martynyk I., Yeletska L., Institute of Animal Science  
NAAS*

*An overview of domestic and foreign literature sources, as well as data from published own research on cryopreservation of animal sperm. The main historical stages of the creation of methods and technologies for deep freezing of sperm are given. The effectiveness of germ cell freezing depending on the applied endocellular and exocellular cryoprotectants is shown. Own experimental data on the effect of combinations of glycerol with substances of the amide group in cryophylactic media on the state of plasma membranes of sperm after deconservation are presented. Based on the literature data and published results of our experiments, the influence of cooling regimes of animal sperm on its physiological parameters after freezing thawing is shown. Data on the influence of protocols on deconservation of sperm of germs on the state of germ cells are given.*

*As a result of long-term work of scientists, fundamental knowledge has been gained, created cryobiotechnologies that allow storing animal sperm in vitro in a deep-frozen state for almost an unlimited period.*

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