

ВПЛИВ ТРИВАЛОСТІ ЕКВІЛІБРАЦІЇ НА ЯКІСТЬ СПЕРМИ БАРАНІВ

І. В. Лобачова
LIV-e@rambler.ru

Інститут тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова
“Асканія-Нова” – Національний науковий селекційно-генетичний
центр з вівчарства
вул. Червоноармійська, 1, смт Асканія-Нова, Чаплинський р-н,
Херсонська обл., 75230, Україна

Для визначення можливості скорочення тривалості еквілібрації проти традиційних 3,5–4-годин при кріоконсервації сперми асканійських тонкорунних баранів (n=6) у травні-червні проведено 2 досліді. Дослідом 1 вивчали якість сперми, фасованої у пайети та підданої еквілібрації різної тривалості і заморожуванню у парах азоту за мінус 65 °С. Дослідом 2 вивчали активність сперми, фасованої у скляні флакони або пайети та підданої різним строкам витримки за 2–4 °С або 37 °С. У досліді 1 скорочення еквілібрації до 48 хв. вірогідно поліпшувало активність еквіліброваної сперми, але вело до повної зупинки руху спермій після розморожування ($p<0,05$). Скорочення еквілібрації до 103 або 115 хв. невірогідно поліпшувало активність сперми після еквілібрації, проте не мало руйнівної дії на заморожену, хоча і погіршувало її якість проти показників 4-годинної витримки ($p>0,05$). Скорочення еквілібрації до 115 хв. знижувало виживаність ($p>0,05$) і абсолютну виживаність ($p<0,05$) розмороженої сперми. У досліді 2 активність сперми, фасованої у флакони і витриманої за 37 °С (вар. 1), та фасованої у пайети і витриманої за 37 °С (вар. 2) або 2–4 °С (вар. 3), після 57 хв. вірогідно не різнилась ні між варіантами, ні від показника нативної сперми. При пролонгації витримки до 137 хв. активність за всіх варіантів вірогідно зменшувалась проти початкового показника, але між варіантами вірогідно не різнилася. При збільшенні витримки до 205 хв. активність у вар. 2 зменшувалася майже до нуля ($0,3\pm 0,18$ бал.), в той час як у вар. 1 і 3 залишалася на задовільному рівні ($6,0\pm 0,57$ і $5,5\pm 0,73$). Припущено, що однією з причин погіршення якості сперми, фасованої, еквіліброваної і замороженої у пайетах, може бути відсутність вільного доступу кисню, що гальмує адаптацію спермій. Зроблено

висновок, що зменшення тривалості етапу еквілібрації можливе, але необхідне вдосконалення складу кріопротекторного розчину.

Ключові слова: баран, сперма, заморожування, еквілібрація, активність, виживаність, абсолютна виживаність.

THE INFLUENCE of DURATION of the EQUILIBRATION on the QUALITY of RAM SPERM

I. V. Lobachova
LIV-e@rambler.ru

Ascania Nova Institute of Animal Breeding in the Steppe Regions
named after M. F. Ivanov - National Scientific Selection-Genetics
Center for Sheep Breeding
Chervonoarmiyska Street, 1, Ascania Nova, Chaplinka district, Kherson
region, 75230, Ukraine

To determine the possibility to reduce the equilibration phase at freezing of sperm of Ascanian Merino ram (n=6) two experiments were carried out in May-June. In experiment 1 the quality of sperm packaged in straws and subjected to different time of equilibration and frozen in nitrogen vapour at (-65 °C) was researched. In experiment 2 the activity of sperm packed in glass vials or straws and subjected to various periods of exposure at 2-4 °C or 37 °C was studied. In experiment 1 reduction of the equilibration time to 48 min. against the traditional 3,5-4 h. significantly improved activity of equilibrated sperm, but led to full stop of movement of sperm after thawing (p<0,05). Shortening of equilibration to 103 or 115 min. insignificantly improved activity of equilibrated sperm, but no had such destructive action on thawed sperm, though worsened a little its quality against the parameters of 4-hours exposure (p>0,05). Shortening of equilibration time to 115 min. reduced survival rate (p>0,05) and absolute survival rate (p<0,05) too. In experiment 2 the activity of sperm packaged in vials and exposed at 37 °C (var. 1) and packaged in straws and exposed at 37 °C (var. 2) or 2-4 °C (var. 3) after 57 min. did not differ significantly both between variants and against parameters of the native sperm. After prolonging of exposition to 137 min. activity decreased against the initial parameters in all variants, but between the variants did not differ significantly. After prolonging of exposition to 205 min. activity sperm in var. 2 reduced almost to zero (0,3 ± 0,18 bal.), while in the var. 1 and 3 remained at a satisfactory level (6,0 ± 0,57 and 5,5 ± 0,73). It was supposed that one of the reasons of reduction of quality of sperm packaged, equilibrated and frozen in straws

may be the lack of free access of oxygen that inhibits adaptation of sperm. It was concluded that a reduction of duration of equilibration stage is possible, but necessary to improve the composition of cryoprotective solution.

Keywords: ram, sperm, freezing, equilibration, activity, survival rate, total survival rate

ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЭКВИЛИБРАЦИИ НА КАЧЕСТВО СПЕРМЫ БАРАНОВ

И. В. Лобачева
LIV-e@rambler.ru

Институт животноводства степных районов имени М. Ф. Иванова
"Аскания-Нова" – Национальный научный селекционно-
генетический центр по овцеводству
ул. Красноармейская, 1, пгт Аскания-Нова, Чаплинский р-н,
Херсонская обл., 75230, Украина

Для определения возможности сокращения этапа эквilibрации против традиционных 3,5–4 час. при криоконсервации спермы асканийских баранов (n=6) в мае-июне проведено 2 опыта. Экспериментом 1 изучали качество спермы, фасованной в пайетты и подвергнутой эквilibрации различной продолжительности и замораживанию в парах азота при (–65 °С). Экспериментом 2 изучали активность спермы, фасованной в стеклянные флаконы или пайетты и подвергнутой различным срокам выдержки при 2–4 °С или 37 °С. В эксперименте 1 сокращение длительности эквilibрации до 48 мин. достоверно улучшало активность эквilibрированной спермы, но вело к полной остановке движения спермиев после размораживания (p<0,05). Сокращение эквilibрации до 103 и 115 мин. недостоверно улучшало активность спермы после эквilibрации, но не имело такого разрушительного действия на замороженную, хотя и несколько ухудшало ее качество против показателей 4-часовой выдержки (p>0,05). Сокращение эквilibрации до 115 мин. снижало выживаемость (p>0,05) и абсолютную выживаемость (p<0,05) размороженной спермы. В эксперименте 2 активность спермы, фасованной во флаконы и выдержанной при 37 °С (вар. 1), и фасованной в пайетты и выдержанной при 37 °С (вар. 2) или 2–4 °С (вар. 3), после 57 мин. до-

стоверно не отличалась ни между вариантами, ни против показателя нативной спермы. При продлении выдержки до 137 мин. активность при всех вариантах уменьшалась против начального показателя, но между вариантами достоверно не отличалась. При продлении выдержки до 205 мин. активность спермы в вар. 2 уменьшалась почти до нуля ($0,3 \pm 0,18$ бал.), в то время как в вар. 1 и 3 оставалась на удовлетворительном уровне ($6,0 \pm 0,57$ и $5,5 \pm 0,73$). Предположено, что одной из причин ухудшения качества спермы, фасованной, эквilibрированной и замороженной в пайеттах, может быть отсутствие свободного доступа кислорода, что тормозит адаптацию спермиев. Можно сделать следующий вывод: уменьшение длительности этапа эквilibрации возможно, но необходимо совершенствование состава криопротекторного раствора.

Ключевые слова: баран, сперма, замораживание, эквilibрация, активность, выживаемость, абсолютная выживаемость.

Розробка методики кріоконсервації сперми триває вже кілька десятиліть. Аналіз літератури показує, що якісні показники деконсервованої сперми баранів не поступають таким у інших видів тварин [1]. Проте, ефективність використання замороженої сперми у вівчарстві набагато нижча [2, 3]. Останнє обумовлено складною будовою шийки матки вівці і труднощами доставки сперми у передню частину цервіксу. При введенні сперми безпосередньо у матку показник запліднення вівцематок не поступається використанню нативної сперми [4].

Одним із етапів процесу кріоконсервації сперми є еквilibрація, під час якої спермії витримують за субнульової температури і в них відбувається ряд реакцій, зокрема, урівноваження концентрації кріопротекторів у внутрішньо- і позаклітинному просторі, фортифікація плазматичної мембрани тощо [5]. Показано, що для отримання задовільних показників активності і виживаності сперми баранів за різних типів розбавлювачів цей етап має тривати від 3,5 до 4 годин [6].

Разом з тим, відомо, що для набуття здатності запліднити яйцеклітину спермії мають пройти процес капацитації, який проявляється перебудовою і зміною співвідношення вмісту ліпідів і протеїнів у

плазматичній мембрані [7], перерозподілом розташування холестерину [8]. В процес капацитації залучається ряд послідовних та пара-

лельних реакцій, деякі з яких розпочинаються відразу після еякуляції, інші – після потраплення у статеві шляхи самиці [9]. Тривалість цього етапу для нативної сперми ссавців приблизно дорівнює чотирьом-шістьом годинам [10, 11]. Почавшись, процес капацитації не відновлюється після зупинки [12].

Зменшення температури до субнульової гальмує, але не припиняє метаболізм в сперміях [13]. Ми припустили, що охолодження спермій до температури 2–5 °С не здатне повністю завадити протіканню біохімічних реакцій, схожих з тими, що відбуваються при капацитації. Зважаючи на те, що час, необхідний для накопичення достатньої кількості спермій у місці їх з'єднання із яйцеклітиною, та тривалість капацитації приблизно однакові і дорівнюють у овець 5–6 годинам [14, с. 77], однією з причин низької ефективності використання розмороженої сперми може бути передчасний розвиток капацитаційних явищ [15]. Тому при розробці методу кріоконсервації сперми баранів у пайетах поставлено за мету зменшити тривалість процедури еквілібрації сперми. У цих дослідях вивчали можливість скорочення часу витримки при використанні розбавлювача і режиму, які показали придатність при заморожуванні сперми за методом відкритих гранул.

Мета роботи – дослідити залежність фізіологічних параметрів еквіліброваної та розмороженої сперми баранів від тривалості етапу еквілібрації.

Матеріал та методика досліджень. Дослідження проведено протягом травня-початку червня двома дослідками.

У досліді 1 варіантами 1, 2 і 3 вивчали залежність якості заморожування сперми від тривалості етапу еквілібрації. Для цього із еякулятів кожного плідника відразу після розбавлення сперми заготовляли по 6 пайет, 1 з яких тестували і 2 піддавали заморожуванню після першого тестового терміну еквілібрації, 3 інші – після другого. В досліді використовували сперму від 6 одних і тих самих баранів-плідників. Маніпуляції із спермою здійснювали у наступній послідовності: 1) оцінка еякуляту за органолептичними і фізіологічними показниками; 2) розбавлення еякуляту кріопротекторним розчином у співвідношенні 1:2; 3) фасування розбавленої сперми у пайети (0,25 мл); 4) витримка пайет за кімнатної температури (20–22 °С) протягом 10 хвилин; 5) перенос пайет у термос із льодом і витримка за температури 2–4 °С протягом першого або другого терміну еквілібрації; 6) оцінка сперми за активністю – 1 пайета; 7) перенос 2 пайет на площадку для заморожування; 8) витримка площадки з розміщеними пайетами у парах азоту за температури мінус 65 °С протягом 10 хвилин; 9) занурення пайет у

зріджений азот і перенос їх на 24-годинне зберігання у посудину Дьюара. У варіанті 1 порівнювали дані щодо тривалості еквілібрації 48 і 219 хвилини, у варіанті 2 – 103 і 258, у 3 – 115 і 264. Розморожування усіх пайєт здійснювали їх заглибленням на 20 секунд у воду із температурою 37 °С. Після розморожування вміст пайєти переносили у скляний пеніциліновий флакон із 1 мл 2,9 %-го розчину цитрату натрію п'ятиводного і аналізували за активністю (бал). У варіантах 1 і 3 визначали також показники виживаності (год.) і абсолютної виживаності (абс. од.). Для цього розморожену у цитраті натрію сперму у флаконі переносили у термостат із температурою 37 °С і тестували за активністю через кожну годину. Активність, виживаність і абсолютну виживаність сперми визначали за ГОСТ 20909-75.

Дослідом 2 трьома варіантами вивчали залежність активності розбавленої сперми від тривалості і температури витримки та способу фасування. Для цього 0,5 мл нативної сперми розбавляли кріопротекторним середовищем у співвідношенні 1:2. 1 мл суміші фасували у 4 пайєти, 0,5 мл залишали у пеніциліновому флаконі, який щільно закривали гумовою пробкою. По флакону і 2 пайєти зі спермою від кожного плідника переносили у термостат і витримували за температури 37 °С. Дві інші пайєти від кожного барана переносили у термос із льодом і витримували за температури 2–4 °С. Після певного часу усі зразки аналізували за активністю. Дослід 2 провели трьома варіантами з використанням сперми від одних і тих самих тварин (n=6).

Як кріопротекторний розчин в обох дослідах застосовували середовище наступного складу: сахароза – 1,0 г, сечовина – 0,25 г, гліцерин – 1,5 мл, жовток курячого яйця – 5 мл, суміш антибіотиків (пеніцилін:стрептоміцин 1:1) – 20 мг, вода дистильована до 25 мл.

Статистичну обробку даних та обчислення рівня вірогідності р здійснювали за допомогою математичного апарату програми «Excel» пакету «MS Office 2010» за стандартними алгоритмами.

Результати досліджень. У досліді 1 скорочення тривалості еквілібрації проти традиційного 3,5–4-годинного терміну позитивно вплинуло на якість еквіліброваної сперми. При цьому, за тривалості 48 хвилин (варіації від 44 до 52) активність сперми була вірогідно вища за таку у сперми, витриманої протягом 219 хвилин. Збільшення часу еквілібрації до 103 (варіації від 96 до 110) та 115 (від 111 до 119) хвилин зменшувало різницю з показниками 4-годинної витримки до невірогідного рівня (табл. 1).

На протилежність вище наведеної позитивної тенденції якість сперми після заморожування/розморожування при скороченні терміну еквілібрації погіршувалась. Зокрема, при витримці протягом

48 хвилин активність сперми дорівнювалась нулю, спостережено рух лише одиноких спермій. Скорочення часу еквілібрації до 103 або 115 хвилин не мало такого руйнівного впливу, хоча і зумовило певне погіршення якості розмороженої сперми проти показників

Таблиця 1. Активність розмороженої сперми за різної тривалості еквілібрації у досліді 1

Тривалість еквілібрації, хв.	n	Активність сперми, бал		
		нативної	після еквілібрації	після розморожування
<i>Варіант 1</i>				
219,00±4,10	6	8,50±0,37	5,00±0,40 ^a	2,88±0,29 ^a
48,33±4,29	6	8,50±0,37	6,50±0,47 ^b	0,0 ^b
<i>t_d</i>			2,430	9,931
<i>Варіант 2</i>				
258,33±7,70	6	9,33±0,23	6,50±0,24 ^a	2,42±0,23 ^a
103,33±7,70	6	9,33±0,23	7,00±0,28 ^a	2,17±0,23 ^a
<i>t_d</i>			1,356	0,769
<i>Варіант 3</i>				
264,60±3,65	6	9,00±0,61	5,80±0,42 ^a	2,80±0,39 ^a
115,20±3,65	6	9,00±0,61	6,60±0,27 ^a	2,40±0,23 ^a
<i>t_d</i>			1,602	1,152

Примітка. Тут і далі: показники в одній колонці з різними субскриптами різняться між собою з вірогідністю $p < 0,05$.

4-годинної витримки. Отже, зменшення часу еквілібрації до 100-120 хвилин хоча і погіршує якість розмороженої сперми, але є технологічно допустимим.

Скорочення терміну еквілібрації негативно позначалось і на виживаності та абсолютній виживаності розмороженої сперми (табл. 2). При цьому, вірогідне зменшення показника абсолютної виживаності було як за 48-хвилинної тривалості еквілібрації, так і за 115-хвилинної.

При визначенні показника виживаності спостережено невелике покращення активності сперми через певний інтервал витримки.

Для одних зразків цей факт відмічали через 1, для інших – 2 або 3 години від початку культивування. У деяких зразках активність зростала на 1,5 бали проти значення попередньої перевірки. В якості загальної тенденції було помічено, що чим раніше відбувалося таке збільшення, тим меншою була виживаність сперми. Зміну активності сперми на різних етапах тестування показано на рис. 1 і 2.

Варто відзначити, що активність зразків у досліді навіть за най-

кращих варіантів була доволі низькою порівняно із показниками, які отримують в лабораторії при заморожуванні сперми баранів за методом відкритих гранул. Варіювання температури робочої зони заморожування від мінус 53 до мінус 102 °С не поліпшило суттєво

Таблиця 2. Вживаність і абсолютна вживаність розмороженої сперми, підданої різним строкам еквілібрації у досліді 1

Тривалість еквілібрації, хв.	N	Активність нативної сперми, бал	Після розморожування	
			вживаність, год.	абс. вживаність, у.о.
<i>Варіант 1</i>				
219,0±2,6	12	8,5±0,24	4,58±0,27 ^a	9,52±0,85 ^a
48,3±2,8	12	8,5±0,24	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
<i>t_d</i>			16,963	11,200
<i>Варіант 3</i>				
264,6±2,29	10	9,00±0,38	4,40±0,17 ^a	8,58±0,95 ^a
115,2±2,29	10	9,00±0,38	3,70±0,32 ^a	4,95±0,89 ^b
<i>t_d</i>			1,932	2,789

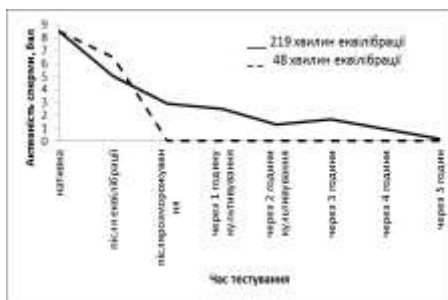


Рис. 1. Активність сперми, яку піддавали 48- або 219-хвилинній еквілібрації, на різних етапах тестування.

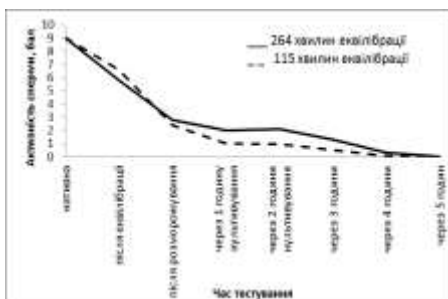


Рис. 2. Активність сперми, яку піддавали 115- або 264-хвилинній еквілібрації, на різних етапах тестування.

показники – активність сперми коливалась в межах від 1,63 до 2,88 балів. Для встановлення ймовірних причин цього проведено дослід 2 (табл. 3).

Таблиця 3. Активність розбавленої сперми, підданої витримці за різних умов, у досліді 2

	Варіант 1*	Варіант 2	Варіант 3
Час витримки, хв.	57,0±7,7	136,7±13,0	205,5±5,5
Кількість зразків, n	6/12**	6/12	6/12
Активність нативної сперми	8,5±0,47 ^a	9,0±0,28 ^a	8,7±0,46 ^a
Активність сперми (бал) за витримки:			
– у флаконі за 37 °С,	7,5±0,47 ^a	7,8±0,18 ^b	6,0±0,57 ^b
– у пайєті за 37 °С,	7,2±0,72 ^a	6,0±1,02 ^b	0,3±0,18 ^c
– у пайєті за 2–4 °С,	6,8±0,66 ^a	7,5±0,37 ^b	5,5±0,73 ^b

Примітка. * - дослідження за варіантами 1, 2 і 3 не були суміщені за часом;

** – для сперми, фасованої у флакони, кількість зразків становила 6 шт., для пайєт – 12.

Після 57,0±7,7 годин витримки активність сперми зменшувалась проти показників нативної, але невірогідно, при цьому сильніше у зразках, які зберігали у пайєтах за низькою температурою (2–4 °С).

При збільшенні часу витримки до 136,7±13,0 годин зниження активності проти показника нативної сперми набувало вірогідності, але при цьому різниця між варіантами фасування не мала ще вірогідного значення.

Збільшення терміну витримки до 205,5±5,5 годин вело до катастрофічного погіршення якості сперми, яку тримали фасованою у пайєтах за температури 37 °С. При зменшенні температури зберігання до 2–4 °С активність сперми, фасованої у пайєти, також падала, але залишалася на задовільному рівні.

Обговорення. Наші результати щодо негативного впливу скорочення тривалості етапу еквілібрації на якісні показники сперми узгоджуються із результатами інших досліджень на спермі баранів [6], бугаїв [16, 17] тощо.

Разом з тим, отримані дані і літературні джерела свідчать про принципову можливість скорочення терміну еквілібрації як мінімум до 2 годин. У досліді I. Ashrafi із співавт. (2011) скорочення терміну еквілібрації при 5 °С до 80 хвилин поліпшувало фізіологічні показники розмороженої сперми баранів. Варто, проте, зазначити, що автори використовували контрольований режим зниження температури [1]. У досліді H. Paulenz із співавт. (2007) при еквілібрації сперми, фасованої у пайетах, протягом лише 2 годин показник запліднення вівцематок при одноразовому вагінальному осіменінні був достатньо високим – 57 % [18].

У досліді L. A. Lodhi зі співавт. (1995) при скороченні часу еквілібрації навіть до 30 хвилин від 16 до 23 відсотків сперміїв зберігали активність [6]. Зважаючи на майже однакові технологічні умови цих дослідів з нашими (використання пайет, температура еквілібрації 4 °С, нелінійний режим зниження температури) найбільш ймовірно причиною відмінності результатів слід визнати різницю складу розбавлювача – цитовані дослідники використовували середовище на основі трісу. Тож, скорочення терміну еквілібрації сперми баранів перед її глибоким заморожуванням без погіршення якісних параметрів і запліднювальної здатності сперми можливе, але, зважаючи на результати наведених дослідів, склад кріопротекторного середовища потребує доопрацювання. Підтвердженням значення композиції кріорозчину дають результати роботи D.R. Samaga із співавт. (2011), в якій додавання антиоксидантів нівелювало різницю за кількістю пошкоджених сперміїв баранів після нульової та 12-годинної еквілібрації [19].

Вважається, що однією з причин погіршення виживаності сперми є зменшення у середовищі кількості енергетичних речовин і накопичення продуктів метаболізму. За даними табл. 3 можна припустити, що за використання скляних флаконів газові продукти метаболізму дифундують із середовища у повітря і зменшують свій негативний вплив на спермії. Зниження температури еквілібрації до 2–4 °С послаблює метаболізм в сперміях, знижує кількість кінцевих продуктів і, отже, діє позитивно. Разом з тим, потребує відповіді питання, чи можна достатньо високий показник активності сперми, яку зберігали у флаконі за температури 37 °С, пояснити лише послабленням впливу газових продуктів обміну, адже така температура є оптимальною для максимальної інтенсивності метаболізму і, отже, має прискорювати використання енергетичних ресурсів. На нашу

думку, одним із пояснень високого показника виживаності при зберіганні спермій у флаконі може бути запуск у сперміях процесів з участю кисню, якого достатньо навіть у щільно закритому флаконі і доступ якого у середовище не ускладнений. За таких умов в сперміях можуть активізуватися процеси аеробного дихання, що і відображається збільшенням виживаності клітин. За фактом того, що при визначенні виживаності в процесі культивування через 1–3 години від початку витримки спостерігали збільшення активності розмороженої сперми, можна припустити, що реакції аеробного дихання повною мірою включаються саме через такий термін. Але це дійсно лише для сперми, яку зберігають у флаконі і до якої доступ кисню не ускладнений. В сперміях, які витримують у пайєтах, протікання реакцій з участю кисню неможливе, що підтверджують дані витримки сперми у пайєтах за 37 °С (табл. 3).

Висновки: 1. Скорочення тривалості еквілібрації сперми баранів, розбавленої кріопротекторним середовищем використаного складу, до 44-52 хвилин негативно позначається на якості розмороженої сперми і недопустиме. Скорочення тривалості еквілібрації до 100-120 хвилин не має руйнівного впливу на активність розмороженої сперми і технологічно є допустимим.

2. Однією з ймовірних причин зменшення показника активності сперми, фасованої, еквіліброваної і замороженої у пайєтах, може бути відсутність вільного доступу кисню, що гальмує становлення адаптаційних процесів в сперміях.

Перспективою подальших досліджень є оптимізація складу кріопротекторного середовища, використання якого сприяло б скороченню етапу еквілібрації без погіршення якісних показників розмороженої сперми.

Список використаної літератури

1. Ashrafi I. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa / I. Ashrafi, H. Kohram, H. Najjian, M. Poorhamdollah, H. Mirzak // *African J. Biotechnology*. – 2011. – Vol. 10, Issue 44. – P. 8965–8969.

2. Gil J. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination / J. Gil, M. Rodriguez-Irazaqui, N. Lundeheim, L. Söderquist, H. Rodriguez-Martinez // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 59, Issue 5-6. – P. 1157-1170.

3. Donovan A. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen thawed semen at a natural or synchronized oestrus / A. Donovan, J. P. Hanrahan, E. Kummenb, P. Duffycm, M.P. Boland // *Anim. Reprod. Sci.* – 2004. – Vol. 84, Issue 3–4. – P. 359–368.

4. Fair S. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination / S. Fair, J.P. Hanrahan, C.M. O'Meara, P. Duffy, D. Rizos, M. Wade, A. Donovan, M.P. Boland, P. Lonergan, A.C. Evans // *Theriogenolo-*

gy. – 2005. – Vol. 63, Issue 7. – P. 1995–2005.

5. Осташко Ф. И. Разработка вопросов теории и практики глубокого охлаждения и длительного хранения спермы производителей: автореф. дисс. на соискание. науч. степени д-ра биол. наук / Ф. И. Осташко. – Х., 1968. – 55 с.

6. Lodhi L.A. Effect of various equilibration periods on frozen-thawed Lohi ram semen / L.A. Lodhi, A. Hameed, I. Ahmad, Z.I. Qureshi, A. Sattar // *Pakistan Vet. J.* – 1995. – Vol. 15, Issue 2. – P. 65–68.

7. Evans R.W. Diacyl, alkenyl and alkyletherphospholipids in ejaculated, in utero-, and in vitro-incubated porcine spermatozoa / R.W. Evans, D.E. Weaver, E.D. Clegg // *J. Lipid Res.* – 1980. Vol. 21. – P. 223–228.

8. Lin Y. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation / Y. Lin, F.W.K. Kan // *Biol. Reprod.* – 1996. – Vol. 55. – P. 1133–1146.

9. Morgan D.J. A chemical-genetic approach to study the role of PKA in specific tissues: Analysis of sperm capacitation / D.J. Morgan, M. Weisenhaus, S. Shum, T. Su, R. Zheng, C. Zhang, K.M. Shokat, B. Hille, D.F. Babcock, G.S. McKnight // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105, Issue 55. – P. 20740–20745.

10. Chang M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes / M.C. Chang // *Nature.* – 1951. – Vol. 168. – P. 697–698.

11. Austin C.R. The capacitation' of the mammalian sperm / C.R. Austin // *Nature.* – 1952. – Vol. 170. – P. 326.

12. Cohen-Dayag A. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors / A. Cohen-Dayag, I. Tur-Kaspa, L. Dor, S. Mashiach, M. Eisebach // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 11032–11043.

13. Шергин Н. П. Дыхание спермы / Н. П. Шергин // Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных: труды лаборатории искусственного осеменения животных. – ВАСХНИЛ, 1940. – Т. 1. – С. 207–215.

14. Лопырин А. И. Биология размножения овец / А. И. Лопырин. – М.: Колос, 1971. – 320 с.

15. Bailey J.L. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon / J.L. Bailey, J.-F. Bilodeau, N. Cormier // *J. Andrology.* – 2000. – Vol. 21, No. 1. – P. 1–7.

16. Dhama A.J. Effect of various cooling rates (from 30°C to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of and semen / A.J. Dhama, K.L. Sahni, G. Mohan // *Theriogenology.* – 1992. – Vol. 38, Issue 3. – P. 565–574.

17. Leite T.G. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry / Leite T.G., do Vale Filho do V.R., de Arruda R.P., de Andrade A.F.C., Emerick L.L., Zaffalon F.G., Martins J.A.M., de Andrade V.J. // *Anim. Reprod. Sci.* – 2010. – Vol. 120, Issue 1–4. – P. 31–38.

18. Paulenz H. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen / H. Paulenz, T. Ådnøy, L. Söderquist // *Acta Veterinaria Scandinavica.* – 2007. – Vol. 49. P. 26–33.

19. Camara D.R. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen / D.R. Câmara, S.V. Silva, F.C. Almeida, J.F. Nunes, M.M.P. Guerra // *Theriogenology.* – 2011. – Vol. 76, Issue 2. – P. 342–350.