

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

БОГДАНЮК АНАСТАСІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 599.735.52:636.393.6:636.393.9:612.616:57.086.13:636.082.1

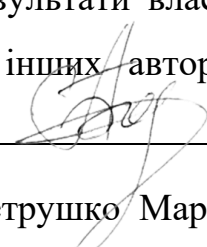
**ДИСЕРТАЦІЯ**

СЕЗОННА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ КРІОРЕЗИСТЕНТНОСТІ  
РЕПРОДУКТИВНИХ КЛІТИН САМЦІВ  
ЗААНЕНСЬКОЇ ТА АЛЬПІЙСЬКОЇ ПОРІД КІЗ

09 Біологія

091 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело \_\_\_\_\_  Богданюк А.О.

Науковий керівник Петрушко Марина Павлівна, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу кріобіології системи репродукції ІПКіК НАН України

Харків – 2023

## АНОТАЦІЯ

Богданюк А.О. Сезонна варіабельність кріорезистентності репродуктивних клітин самців зааненської та альпійської порід кіз. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (галузь знань 09 Біологія). – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2023.

Дисертаційна робота присвячена вивченню сезонної варіабельності кріорезистентності сперматозоїдів самців зааненської та альпійської порід кіз (*Capra hircus*) шляхом аналізу сперміологічних характеристик їх еякулятів: об'єму, загальної кількості сперматозоїдів, їх рухливості, морфологічних особливостей та рівня фрагментації ДНК; підбору оптимальних кріозахисних розчинів з урахуванням їх токсичного впливу на життєздатність сперматозоїдів під час експозиції; визначенню оптимальних режимів експозиції з кріопротектором; аналізу біохімічних параметрів сім'яної плазми, які можуть впливати на характеристики сперматозоїдів та визначенню рівня транскриптів гену білка теплового шоку; аналізу частоти розвитку ембріонів *in vitro* та настання вагітності і окоту.

Вирішення проблеми харчової безпеки України у час воєнної агресії росії проти України та післявоєнний період набувають першочергового значення. Використання продуктів козівництва дозволить забезпечити країну корисним гіпоалергенним молоком за умов переведення технології розмноження молочних кіз на цілорічний режим, адже репродуктивні характеристики кіз характеризуються сезонністю. Застосування кріоконсервованої сперми цапів з метою проведення екстракорпорального запліднення дозволило б підвищити показники продуктивності сільськогосподарських підприємств та забезпечити країну необхідними продуктами. На жаль, на сьогодні існують поодинокі дані щодо сезонної

варіабельності сперміологічних характеристик еякуляту цапів. Так, описано сезонні зміни характеристик сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід у тропічних та середземноморських кліматичних зонах, але відсутні ці дані у помірних, де чергування пір року має більш виражений характер, а відповідно і температурні коливання та зміни споживного раціону. Сезонні зміни еякулятів цапів можуть призвести до зміни кріочутливості, що необхідно враховувати при виборі методу кріоконсервування. Варто зазначити, що не визначено відмінності у морфологічних показниках та функціональних параметрах сперматозоїдів цапів різних порід, які знаходяться у племінних фермах України, з урахуванням кліматичних умов та географічного положення нашої країни; не розроблено оптимальне середовище кріоконсервування сперми цапів з урахуванням сезонності. Тому метою дослідження було дослідити вплив сезонності на кріорезистентність сперматозоїдів самців кіз зааненської та альпійської порід.

Пошук сезоннозалежного маркера кріорезистентності, який характеризував би запліднювальну здатність сперматозоїдів, було розпочато з проведення аналізу еякулятів цапів зааненської та альпійської порід у різні сезони. Було виявлено, що цапи альпійської породи у парувальний сезон мають значуще вищі сперміологічні характеристики, порівняно з зааненською ( $p < 0,05$ ). Так, об'єми еякулятів склали  $1575 \pm 275$  та  $(850 \pm 375)$  мл, концентрація сперматозоїдів –  $3,2 \pm 0,2$  та  $(1,9 \pm 0,5)$  млрд/мл, рухливість –  $91,1 \pm 3,1$  та  $(80,4 \pm 4,1)\%$ , життєздатність –  $95,9 \pm 3,98$  та  $(88,3 \pm 2,9)\%$ , відповідно для альпійської та зааненської порід. В непарувальний сезон еякуляти цапів альпійської породи також характеризувалися значуще вищими сперміологічними показниками, ніж зааненської породи: об'єм еякуляту  $1065 \pm 235$ , порівняно з  $(560 \pm 195)$  мл; концентрація сперматозоїдів –  $2,8 \pm 0,3$  та  $(1,6 \pm 0,4)$  млрд/мл, рухливість  $67,8 \pm 3,3$  та  $(55,2 \pm 3,7)\%$  і життєздатність  $80,2 \pm 4,8$  та  $(67,8 \pm 4,1)\%$  відповідно ( $p < 0,05$ ).

Аналіз морфологічних варіантів статевих клітин дозволив виявити їх значущу різницю між парувальним та непарувальним сезонами. Кількість сперматозоїдів з нормальними характеристиками становила  $93,4 \pm 1,1$  і  $(87,1 \pm 1,9)\%$  для зааненської породи та  $95,1 \pm 0,9$  і  $(88,3 \pm 2,1)\%$  – для альпійської відповідно у парувальний та непарувальний сезони ( $p < 0,05$ ). За допомогою методу дисперсії хроматину сперматозоїдів (SCD) було з'ясовано, що рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів не був сезоннозалежним. Результати дослідження сперміологічних параметрів еякулятів цапів показали, що рухливість та життєздатність гамет є тими характеристиками, які мають чітку сезонну залежність та породоспецифічність.

На наступному етапі визначали оптимальний склад кріозахисного середовища та швидкість охолодження з урахуванням сезону парування. При аналізі рухливості та життєздатності сперматозоїдів цапів зааненської породи у парувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% гліцерину (Гл) та 5% і 10% етиленгліколю (ЕГ) протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв при температурі  $23^{\circ}\text{C}$  було виявлено, що ці показники починають значуще зменшуватися, порівняно з контролем, з 40 хв при використанні 5% розчинів обох кріопротекторів та з 30 хв при використанні 10% розчинів обох кріопротекторів. Аналіз вищезазначених характеристик сперматозоїдів цапів альпійської породи дозволив виявити, що при використанні розчинів 5% Гл і ЕГ та 10% Гл і ЕГ рухливість та життєздатність починає значуще знижуватись після 40 хв та 30 хв експозиції відповідно ( $p < 0,05$ ). Визначення впливу розчинів кріопротекторів для сперматозоїдів цапів обох порід у непарувальний сезон дозволило виявити значне зниження показників рухливості та життєздатності сперматозоїдів з 30 хв експозиції з розчинами 5% Гл та ЕГ і з 20 хв – з розчинами 10% Гл та ЕГ.

Після кріоконсервування сперматозоїдів цапів зааненської породи у парувальний сезон значуще знижувалися рухливість та життєздатність

клітин, порівняно зі свіжоотриманими сперматозоїдами. Найкраще ці параметри зберігалися при використанні розчину 10% Гл:  $64,23 \pm 6,1$  та  $(77,23 \pm 5,9)\%$ , відповідно. Для альпійської породи у парувальний сезон найкращі показники рухливості та життєздатності гамет ( $57,15 \pm 5,6$  та  $(68,15 \pm 7,1)\%$ ) були відмічені при використанні 10% Гл. У непарувальний сезон менше половини сперматозоїдів цапів зааненської породи зберігали рухливість та життєздатність після кріоконсервування, порівняно зі свіжовиділеними клітинами, що свідчить про значні пошкодження клітин під час охолодження-відігріву. Після кріоконсервування сперматозоїдів цапів альпійської породи у той самий сезон було виявлено зниження показників їх рухливості та життєздатності, порівняно зі свіжоотриманими. Таким чином, було показано, що у непарувальний сезон більшість клітин після кріоконсервування втрачала рухливість та життєздатність, що може свідчити про меншу кріорезистентність сперматозоїдів цапів у цей сезон.

Наші дослідження показали, що кінетичні характеристики та життєздатність свіжоотриманих та кріоконсервованих сперматозоїдів цапів залежать від сезону, в який збирається еякулят. Це може вказувати на те, що певні зовнішні та внутрішні чинники, спричинені сезонними змінами, можуть впливати на характеристики сперматозоїдів, зокрема, на їх кріорезистентність.

Ми припустили, що біохімічний склад сім'яної плазми цапів може також варіювати, залежно від сезону, і бути пов'язаним зі змінами кінетичних, морфологічних та інших функціональних характеристик сперматозоїдів, та впливати на їх кріорезистентність. Цікавим виявився факт, що у парувальний сезон кількість альбуміну та глобуліну у сім'яній плазмі цапів зааненської породи більш, ніж у дев'ять та п'ять разів, відповідно, перевищувала його кількість, порівняно з вмістом у сім'яній плазмі непарувального сезону ( $1,92 \pm 0,31$ , порівняно з  $(0,37 \pm 0,08)$  г/дл та  $2,10 \pm 0,39$  порівняно з  $(0,41 \pm 0,11)$  г/дл відповідно ( $p < 0,05$ )). Концентрація глюкози була значущо вищою у парувальний сезон та знижувалася майже втричі у

непарувальний ( $8,28 \pm 1,15$ , порівняно з ( $3,6 \pm 0,51$ ) мг/дл) ( $p < 0,05$ ). Така ж тенденція спостерігалася і при аналізі рівня фруктози:  $446,07 \pm 26,26$  та ( $165,21 \pm 9,54$ ) мг/дл відповідно ( $p < 0,05$ ). Ми виявили, що особливо значущі зміни спостерігалися при аналізі рівня холестерину. Так, у парувальний сезон його кількість у сім'яній плазмі цапів зааненської породи сягала максимальних значень і становила ( $40,22 \pm 0,27$ ) мг/дл та знижувався до ( $3,48 \pm 0,29$ ) мг/дл у непарувальний ( $p < 0,01$ ). У цапів альпійської породи спостерігалась та сама тенденція сезонних змін біохімічних характеристик сім'яної плазми, яку ми відзначили щодо зааненської породи. Значуще зменшувалися кількісні показники альбуміну ( $2,03 \pm 0,42$ , порівняно з ( $0,49 \pm 0,11$ ) г/дл), глобуліну ( $2,93 \pm 0,51$ , порівняно з ( $0,78 \pm 0,13$ ) г/дл) та загального білку ( $4,960 \pm 0,81$ , порівняно з ( $1,267 \pm 0,35$ ) г/дл); падав рівень моносахаридів: глюкози ( $7,86 \pm 1,21$ , порівняно з ( $3,1 \pm 0,49$ ) мг/дл) та фруктози ( $416,75 \pm 31,25$ , порівняно з ( $125,15 \pm 10,47$ ) мг/дл) ( $p < 0,05$ ); більше, ніж у 10 разів зменшувався рівень холестерину ( $37,96 \pm 2,85$ , порівняно з ( $3,12 \pm 0,34$ ) мг/дл), ( $p < 0,01$ ) у парувальний, порівняно з непарувальним сезоном, відповідно. Кореляційний аналіз виявив, що вміст загального білку у сім'яній плазмі цапів має значущий ( $p < 0,05$ ) прямий середній зв'язок з життєздатністю гамет цапів зааненської породи після кріоконсервування в парувальний ( $r = 0,536$ ) та непарувальний ( $r = 0,513$ ) сезони, і сперматозоїдів цапів альпійської породи у парувальний ( $r = 0,551$ ) та непарувальний ( $r = 0,509$ ) сезони. Рівень глюкози у сім'яній плазмі корелював з життєздатністю після кріоконсервування сперматозоїдів цапів зааненської породи цапів у парувальний ( $r = 0,649$ ) та непарувальний ( $r = 0,594$ ) сезони. Аналогічну кореляцію встановили щодо зазначених показників альпійської породи у парувальний ( $r = 0,541$ ) та непарувальний ( $r = 0,520$ ) сезони. Був визначений значущий ( $p < 0,05$ ) прямий середній зв'язок вмісту фруктози та життєздатності кріоконсервованих сперматозоїдів цапів зааненської породи цапів у парувальний ( $r = 0,565$ ) та непарувальний ( $r = 0,479$ ) сезони. Аналогічна

кореляція була виявлена щодо альпійської породи у зазначені сезони: ( $r=0,526$ ) та ( $r=0,533$ ) відповідно.

Зниження кріотолерантності сперматозоїдів у непарувальний сезон може бути пов'язаним зі зміною транскрипції гену білка теплового шоку (HSP 90), який відповідає за стабілізацію білкових комплексів, їх деградацію та підтримку правильної конформації під час температурного стресу. Аналіз рівня транскриптів гену HSP 90 методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції дозволив дійти висновку, що вміст мРНК білка HSP 90 в сперматозоїдах цапів порід, що вивчалися, був значуще нижчим у непарувальний сезон: на 25% для зааненської породи та на 40% – для альпійської, порівняно з парувальним ( $p<0,05$ ). На основі отриманих даних можна зробити припущення, що знижений вміст транскриптів білка HSP 90 може впливати на підвищену чутливість сперматозоїдів до кріопошкоджень.

Відомо, що компоненти яєчного жовтка (ЯЖ) допомагають зберігати функціональні характеристики сперматозоїдів під час кріоконсервування, головним чином, шляхом запобігання ефлюксу ліпідів з мембрани сперматозоїдів. ЯЖ має у своєму складі холестерин, ліпопротеїни, фосфоліпіди, білки, пептиди та антиоксиданти. Оскільки ми виявили низьку виживаність сперматозоїдів в непарувальний сезон після кріоконсервування, що може бути пов'язано з нижчими концентраціями компонентів сім'яної плазми та білка теплового шоку 90, було вирішено дослідити вплив кріопротекторного середовища, збагаченого (ЯЖ) у концентрації 20%. Після його додавання сперматозоїди цапів зааненської породи зберігали значуще вищу рухливість та життєздатність після кріоконсервування ( $36,50\pm2,7$  та  $(46,97\pm3,1)\%$ ), що приблизно на 10% вище, ніж при кріоконсервуванні без ЯЖ ( $25,49\pm2,7$  та  $(40,48\pm3,1)\%$  відповідно ( $p<0,05$ )). Подібна тенденція спостерігалася і при аналізі результатів, отриманих для сперматозоїдів цапів альпійської породи. Так, рухливість та життєздатність клітин були значуще вищими після кріоконсервування з ЯЖ у кріозахисному середовищі ( $45,34\pm5,75$  та  $(53,06\pm6,1)\%$ ) відповідно ( $p<0,05$ )).

Кріоконсервування викликало значуще підвищення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів цапів обох порід незалежно від сезону парування. Після кріоконсервування з розчином 10% Гл сперматозоїдів цапів зааненської породи у парувальний сезон рівень фрагментації їх ДНК значуще збільшувався на 2,5%, а в непарувальний – на 4%, порівняно зі свіжоотриманими сперматозоїдами ( $p < 0,05$ ). Додавання у непарувальний сезон до кріопротекторного середовища 20% ЯЖ дозволяло зберігати цілісність ДНК на рівні такої при кріоконсервуванні сперматозоїдів у парувальний сезон. Для альпійської породи у парувальний сезон після кріоконсервування спостерігалось підвищення фрагментації ДНК сперматозоїдів на 2,8%, а в непарувальний сезон при заморожуванні з 10% Гл – на 7,3%. Додавання ЯЖ у кріопротекторне середовище дозволило зменшити фрагментацію ДНК клітин на 3,2%, порівняно з цим показником у кріоконсервованих без ЯЖ клітинах.

Після запліднення ооцитів кіз *in vitro* свіжоотриманими та кріоконсервованими в різні сезони сперматозоїдами було виявлено, що частота розвитку бластоцист була найвища у парувальний сезон, незалежно від використання свіжоотриманих чи кріоконсервованих сперматозоїдів:  $82,6 \pm 3,7$  та  $(71,9 \pm 9,2)\%$  відповідно ( $p < 0,05$ ). Даний показник при заплідненні ооцитів непарувального сезону свіжоотриманими в той самий сезон сперматозоїдами становив  $(69,6 \pm 9,6)\%$ , тоді як при заплідненні кріоконсервованими сперматозоїдами парувального сезону –  $(68,2 \pm 11,2)\%$ . Найнижча частота розвитку ембріонів була отримана при заплідненні отриманих в непарувальний сезон ооцитів кріоконсервованими сперматозоїдами того ж сезону  $(53,5 \pm 6,5)\%$  ( $p < 0,05$ ). Після трансплантації ембріонів в порожнину рогу матки не було виявлено значущої різниці у частоті настання вагітності та окоті між досліджуваними групами.

Таким чином, в результаті проведеної роботи було визначено, що альпійська порода, порівняно з зааненською, характеризується значущо вищими показниками об'єму еякуляту, загальної кількості сперматозоїдів,

рухливості та життєздатності клітин. Обидві породи мали значущо вищі сперміологічні характеристики у парувальний сезон, порівняно з непарувальним.

Частота виживання кріоконсервованих сперматозоїдів цапів для обох порід цапів була найвищою з використанням 10% Гл та залежала від сезону отримання еякуляту.

Біохімічні характеристики сім'яної плазми еякулятів цапів відрізняються, залежно від сезону отримання еякуляту та корелюють з життєздатністю сперматозоїдів після кріоконсервування.

Відносний рівень транскриптів гену HSP 90 знижується у непарувальний сезон.

Додавання 20% яєчного жовтку у кріопротекторне середовище з 10% Гл дозволяє збільшити рухливість сперматозоїдів з  $(25,49 \pm 2,7)\%$  до  $(36,50 \pm 2,7)\%$  цапів зааненської породи та з  $(31,43 \pm 5,75)\%$  до  $(45,34 \pm 5,75)\%$  цапів альпійської породи.

Після кріоконсервування рівень фрагментації ДНК клітин збільшувався. Додавання ЯЖ у кріозахисне середовище в непарувальний сезон дозволив зберегти цей показник на рівні кріоконсервованих у парувальний сезон.

Частота розвитку ембріонів є значущо вищою при заплідненні ооцитів парувального сезону свіжоотриманими  $(82,6 \pm 3,7)\%$  та кріоконсервованими  $(71,9 \pm 9,2)\%$  сперматозоїдами зазначеного сезону, порівняно з цим параметром з використанням кріоконсервованих сперматозоїдів непарувального сезону  $(57,9 \pm 9,7)\%$  ( $p < 0,05$ ). Після трансплантації ембріонів в порожнину рогу матки частота настання вагітності та окоту не залежала від сезону свіжоотриманої чи кріоконсервованої сперми.

**Ключові слова:** кріоконсервування, кріопротектори, гліцерин, життєздатність, виживання, культивування *in vitro*, сперматозоїди, статеві клітини, цапи, парувальний сезон.

## ANNOTATION

*Bogdaniuk A.O.* Seasonal variability of reproductive cells cryoresistance of Saanen and Alpine goat breeds males – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for the degree Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology (field of study 09 Biology). – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of seasonal variability of cryoresistance of Saanen and Alpine bucks spermatozoa (*Capra aegagrus hircus*) with analyzing the characteristics of their ejaculates: volume, total number of spermatozoa, their motility, morphology, and level of DNA fragmentation; selection of optimal cryoprotective solutions, incorporating considerations for their cytotoxicity; determination of optimal equilibration time with a cryoprotectant; analysis of biochemical parameters of seminal plasma that may affect the characteristics of spermatozoa and determination of the level of heat shock protein gene transcripts; analyzing of embryo development rate, pregnancy and kidding rates.

Solving the task of food security in Ukraine during russian military aggression against Ukraine and during the post-war period is of a high priority. The use of goat products will provide the country with healthy hypoallergenic milk if the technique of dairy goat breeding is adopted throughout the year, as the reproductive characteristics of goats are seasonal. The use of cryopreserved buck semen for *in vitro* fertilization would increase the productivity of agricultural production and provide the country with the necessary products. Unfortunately, currently, there is little data on the seasonal variability of the semen characteristics of bucks. Thus, seasonal changes in of Saanen and Alpine goat breeds spermatozoa in tropical and Mediterranean climatic zones have been described, but there are no such data in temperate zones, where the alternation of seasons and, accordingly,

temperature fluctuations are more pronounced. Fluctuations in seasonal characteristics of buck ejaculates necessitate careful consideration when selecting an appropriate cryopreservation technique, as these variations can impact cryosensitivity. It is worth mentioning that the differences in morphological and functional parameters of spermatozoa of different breeds of goats kept in breeding farms of Ukraine have not been explored, with emphasizing on the climatic conditions and geographical location of our country; the optimal medium for cryopreservation of buck sperm, considering seasonality, has not been developed. Therefore, the aim of the study was to investigate the effect of seasonality on the cryoresistance of spermatozoa of Saanen and Alpine bucks.

The study of a seasonally dependent marker of cryoresistance that would characterize the fertilizing ability of spermatozoa was started by analyzing ejaculates of Saanen and Alpine bucks in different seasons. It was found that Alpine bucks in the breeding season had significantly higher sperm characteristics than Saanen bucks ( $p < 0.05$ ). Thus, ejaculate volumes were  $1,575 \pm 275$  and  $(850 \pm 375)$  ml, sperm concentration was  $3.2 \pm 0.2$  and  $(1.9 \pm 0.5)$  billion/ml, motility was  $91.1 \pm 3.1$  and  $(80.4 \pm 4.1)\%$ , viability was  $95.9 \pm 3.98$  and  $(88.3 \pm 2.9)\%$ , respectively, for Alpine and Saanen breeds. In the non-breeding season, the ejaculates of Alpine goats were also characterized by significantly higher spermiological parameters than those of the Saanen breed: ejaculate volume  $(1,065 \pm 235)$  ml, compared to  $(560 \pm 195)$  ml; sperm concentration per ml of semen  $(2.8 \pm 0.3$  and  $(1.6 \pm 0.4)$  billion/ml), motility  $(67.8 \pm 3.3$  and  $(55.2 \pm 3.7)\%$ ) and viability  $80.2 \pm 4.8$  and  $(67.8 \pm 4.1)\%$ , respectively ( $p < 0.05$ ).

The analysis of sperm morphology revealed a significant difference between the breeding and non-breeding seasons. The number of spermatozoa with normal characteristics was  $93.4 \pm 1.1$  and  $(87.1 \pm 1.9)\%$  for the Saanen breed and  $95.1 \pm 0.9$  and  $(88.3 \pm 2.1)$  for the Alpine breed, respectively, in the breeding and non-breeding seasons ( $p < 0.05$ ). Using the sperm chromatin dispersion (SCD) method, it was found that the level of sperm DNA fragmentation was not seasonally dependent. The results of the study of semen characteristics of bucks showed that

the motility and viability of gametes are those characteristics that had a clear seasonal dependence and breed specificity.

The next step was to determine the optimal composition of the cryoprotective medium and cooling rate, in accordance with the breeding season. When analyzing the motility and viability of Saanen goat spermatozoa during the breeding season after incubation with cryoprotective media containing 5% and 10% glycerol (G) and 5% and 10% ethylene glycol (EG) for 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min at 23° C, it was found that these parameters begin to decrease significantly compared to the control, starting from 40 min with 5% solutions of both cryoprotectants and from 30 min with 10% solutions of both cryoprotectants. The analysis of the above characteristics of Alpine goat spermatozoa revealed that when using solutions of 5% G and EG and 10% G and EG, motility and viability began to decrease significantly starting from 40 and 30 min of exposure, respectively ( $p < 0.05$ ). Investigation of the cytotoxicity of cryoprotectant solutions for spermatozoa of both breeds in the non-breeding season revealed a significant decrease in sperm motility and viability compared to the control starting from 30 min of incubation with solutions of 5% G and EG and after 20 min with solutions of 10% G and EG.

After cryopreservation of Saanen buck spermatozoa in the breeding season, cell motility and viability significantly decreased compared to fresh spermatozoa. These parameters were best preserved when using a 10% G solution ( $64.23 \pm 6.1$  and  $77.23 \pm 5.9$ %, respectively). Cryopreservation of spermatozoa containing EG with the above-mentioned concentrations did not allow for maintaining cell motility and viability at the highest level. In the breeding season for Alpine breed, the best parameters of the sperm motility and viability ( $57.15 \pm 5.6$  and  $68.15 \pm 7.1$ %) were observed when using 10% G.

In the non-breeding season, less than half of Saanen buck spermatozoa retained motility and viability after cryopreservation compared to fresh cells, indicating significant cell damage during freeze-thawing. After cryopreservation of Alpine spermatozoa in the non-breeding season, a decrease in their motility and

viability was found compared to fresh spermatozoa. Thus, it was shown that in the non-breeding season, most cells lost their motility and viability after cryopreservation, which may indicate a lower cryoresistance of buck spermatozoa in this season.

Our studies have shown that the kinetic characteristics and viability of fresh and cryopreserved buck spermatozoa depend on the season of ejaculate collection. This may indicate that certain external and internal factors dependent on seasonal changes may affect the characteristics of spermatozoa, in particular, their cryopreservation.

We assumed that the biochemical composition of seminal plasma of bucks may also vary depending on the season and be associated with the changes in kinetic, morphological and other functional characteristics of spermatozoa, and affect their cryoresistance. Of interest was the fact that during the breeding season, the amount of albumin and globulin in the seminal plasma of Saanen bucks was more than nine and five times, respectively, higher than in the seminal plasma of the non-breeding season ( $1.92 \pm 0.31$  compared to  $(0.37 \pm 0.08)$  g/dl and  $2.10 \pm 0.39$  compared to  $(0.41 \pm 0.11)$  g/dl, respectively ( $p < 0.05$ )). Glucose concentration was significantly higher in the breeding season and decreased almost triple in the non-breeding season ( $8.28 \pm 1.15$  and  $(3.6 \pm 0.51)$  mg/dl) ( $p < 0.05$ ). The same trend was observed when analyzing the fructose levels:  $446.07 \pm 26.26$  and  $(165.21 \pm 9.54)$  mg/dl, respectively ( $p < 0.05$ ). We found that particularly significant changes were observed when analyzing cholesterol levels. Thus, in the breeding season, its amount in the seminal plasma of Saanen bucks reached maximum values and was  $(40.22 \pm 0.27)$  mg/dl, and decreased to  $(3.48 \pm 0.29)$  mg/dl in the non-breeding season ( $p < 0.01$ ). For Alpine bucks, the same trend of seasonal changes in the biochemical characteristics of semen plasma was observed as for Saanen bucks. The quantitative parameters of albumin ( $2.03 \pm 0.42$ , and  $(0.49 \pm 0.11)$  g/dl), globulin ( $2.93 \pm 0.51$ , and  $(0.78 \pm 0.13)$  g/dl), and total protein ( $4.960 \pm 0.81$ , and  $(1.267 \pm 0.35)$  g/dl) significantly decreased; the level of monosaccharides glucose ( $7.86 \pm 1.21$ , and  $(3.1 \pm 0.49)$  mg/dl) and fructose ( $416.75 \pm 31.25$ , and  $(125.15 \pm 10.47)$  mg/dl)

( $p < 0.05$ ); cholesterol level decreased more than 10 times ( $37.96 \pm 2.85$ , and  $(3.12 \pm 0.34)$  mg/dl), ( $p < 0.01$ ) in the breeding, compared to non-breeding season, respectively. Correlation analysis revealed that the content of total protein in seminal plasma of bucks was of significant ( $p < 0.05$ ) direct average relationship with the viability of gametes after cryopreservation in the breeding ( $r = 0.536$ ) and non-breeding seasons ( $r = 0.513$ ), and for Alpine spermatozoa in the breeding ( $r = 0.551$ ) and non-breeding seasons ( $r = 0.509$ ). The level of glucose in seminal plasma correlated with the viability after cryopreservation of Saanen buck spermatozoa in the breeding ( $r = 0.649$ ) and non-breeding ( $r = 0.594$ ) seasons. A similar correlation was established for the indicated parameters of the Alpine breed in the breeding ( $r = 0.541$ ) and non-breeding ( $r = 0.520$ ) seasons. A significant ( $p < 0.05$ ) direct average relationship between the fructose content and viability of cryopreserved spermatozoa of the Saanen buck in the breeding ( $r = 0.565$ ) and non-breeding ( $r = 0.479$ ) seasons was determined. A similar correlation was found for the Alpine breed in the breeding ( $r = 0.526$ ) and non-breeding ( $r = 0.533$ ) seasons.

The decrease in sperm cryotolerance during the non-breeding season may be associated with changes in the transcription of the heat shock protein (HSP 90) gene, which is responsible for stabilizing protein complexes, destroying them, and maintaining their correct conformation during temperature stress. The analysis of the HSP 90 gene transcript levels by quantitative polymerase chain reaction allowed us to conclude that the mRNA content of HSP 90 protein in the spermatozoa of the studied breeds was significantly lower in the non-breeding season: by 25% for the Saanen breed and by 40% for the Alpine breed, compared to the breeding season ( $p < 0.05$ ). Based on the data obtained, it can be assumed that the reduced content of HSP 90 protein transcripts may affect the increased sensitivity of spermatozoa to cryodamage.

The components of egg yolk (EY) are known to contribute to the preservation of sperm functional characteristics during cryopreservation, mainly by preventing the lipid efflux out of the sperm membrane. EY contains cholesterol, lipoproteins, phospholipids, proteins, peptides and antioxidants. Since we found

low sperm survival in the non-breeding season after cryopreservation, which was likely to be associated with lower concentrations of seminal plasma components and heat shock protein 90, we decided to investigate the effect of a cryoprotective medium enriched with EY at a concentration of 20%. When being added, spermatozoa of Saanen bucks retained significantly higher motility and viability after cryopreservation ( $36.50 \pm 2.7$  and  $(46.97 \pm 3.1)\%$ ), that were approximately 10% higher than when cryopreserved without EY ( $25.49 \pm 2.7$  and  $(40.48 \pm 3.1)\%$ , respectively ( $p < 0.05$ )). A similar trend was observed in the analysis of the results obtained for spermatozoa of Alpine bucks. Thus, cell motility and viability were significantly higher after cryopreservation with EY in a cryoprotective medium ( $45.34 \pm 5.75$  and  $(53.06 \pm 6.1)\%$ ), respectively ( $p < 0.05$ )).

Cryopreservation significantly increased the level of DNA fragmentation in spermatozoa of both breeds, regardless of the breeding season. After cryopreservation with a 10% G solution of Saanen buck spermatozoa in the breeding season, the level of DNA fragmentation significantly increased by 2.5%, and in the non-breeding season – by 4%, compared to fresh spermatozoa ( $p < 0.05$ ). Complementing the cryoprotective media with 20% EY in the non-breeding season allowed to maintain the DNA integrity at the level of that of spermatozoa cryopreserved in the breeding season. For the Alpine breed, a 2.8% increase in sperm DNA fragmentation was observed in the breeding season after cryopreservation, and a 7.3% increase in sperm DNA fragmentation was observed in the nonbreeding season when frozen with 10% G. The addition of EY to the cryoprotective medium reduced the DNA fragmentation of cells by 3.2% compared to this index in cryopreserved cells without EY.

After *in vitro* fertilization of goat oocytes with fresh and cryopreserved spermatozoa in different seasons, it was found that the blastocyst rate was the highest in the breeding season, regardless of the use of fresh or cryopreserved spermatozoa:  $82.6 \pm 3.7$  and  $(71.9 \pm 9.2)\%$ , respectively ( $p < 0.05$ ). This parameter for fertilization of oocytes in the non-breeding season with fresh spermatozoa was  $(69.6 \pm 9.6)\%$ , while for fertilization with cryopreserved spermatozoa of the

breeding season was  $(68.2 \pm 11.2)\%$ . The lowest embryo development rate was obtained when oocytes obtained in the non-breeding season were fertilized with cryopreserved spermatozoa of the same season  $(53.5 \pm 6.5)\%$  ( $p < 0.05$ ). After embryo transfer into the uterine cavity, no significant difference in the pregnancy and kidding rates was found between the studied groups.

Thus, we can conclude that the Alpine breed, in comparison with the Saanen breed, was characterized by significantly higher ejaculate volume, total sperm count, cell motility, and viability. Both breeds had significantly higher sperm characteristics in the breeding compared to the non-breeding season.

The survival rate of cryopreserved spermatozoa for both goat breeds was the highest with 10% G and depended on the season of ejaculate collection.

The biochemical characteristics of seminal plasma from buck ejaculates differed depending on the season and correlated with sperm viability after cryopreservation.

The relative level of HSP 90 gene transcripts decreased in the non-breeding season.

The addition of 20% egg yolk to the cryoprotective medium with 10% G allowed to increase of sperm motility from  $(25.49 \pm 2.7)\%$  to  $(36.50 \pm 2.7)\%$  in Saanen bucks and from  $(31.43 \pm 5.75)\%$  to  $(45.34 \pm 5.75)\%$  in Alpine bucks.

After cryopreservation, the level of sperm DNA fragmentation increased by 3–8%. The addition of EY to the cryoprotective medium during the non-breeding season allowed to maintain this indicator at the level of those cryopreserved during the breeding season.

The embryo development rate was significantly higher when oocytes of the breeding season were fertilized with fresh  $(82.6 \pm 3.7)\%$  and cryopreserved  $(71.9 \pm 9.2)\%$  spermatozoa of the breeding season, compared to this parameter using cryopreserved spermatozoa of the non-breeding season  $(57.9 \pm 9.7)\%$  ( $p < 0.05$ ). After the transfer of embryos to the uterine cavity, the pregnancy and kidding rates did not depend on the season of fresh or cryopreserved sperm.

**Key words:** cryopreservation, cryoprotectants, glycerol, viability, survival, *in vitro* culture, spermatozoa, sperm cells, goats, bucks, breeding season.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

*Статті у фахових виданнях України, які входять до міжнародних наукометричних баз даних*

1. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Petrushko M. Seasonal Variability in Cryoresistance of Saanen Goats Spermatozoa and Reproductive Characteristics. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2022;32(1):34–43. DOI: [10.15407/cryo32.01.034](https://doi.org/10.15407/cryo32.01.034) (Scopus, Q4)
2. **Bogdaniuk AO**, Yurchuk TO, Petrushko MP. Seasonal Differences in Sperm Characteristics and the Level of DNA Fragmentation in Fresh and Cryopreserved Sperm of Saanen Goats. *Cytology and Genetics*. 2022;56(5):410–416. DOI: [10.3103/S009545272205003](https://doi.org/10.3103/S009545272205003) (Scopus, Q3)
3. **Bogdaniuk A**, Petrushko M. Morphological and morphometric characteristics of fresh and cryopreserved spermatozoa of saanen bucks. *Agricultural Science and Practice*. 2022;9(3):29–35. DOI: [10.15407/agrisp9.03.029](https://doi.org/10.15407/agrisp9.03.029)

*Статті у фахових виданнях України*

4. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Petrushko M. Reproductive characteristics of Saanen and Alpine bucks. *Biologiya Tvarin*. 2023;25(3):8–13. DOI: [10.15407/animbiol25.03.008](https://doi.org/10.15407/animbiol25.03.008)

*Статті у закордонних журналах, внесених до міжнародних баз Scopus та Web of Science*

5. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Berestovoyy O, Tsvyk V, Yusifli N, Sigunov O, Kramareva O, Petrushko M. Kidding after Transfer of in Vitro Produced Saanen Goat Embryos into Local Ukrainian Breed Recipients in Different Seasons. *Open Journal of Ecology*. 2023;13(8):549–559. DOI: [10.4236/oje.2023.138034](https://doi.org/10.4236/oje.2023.138034) (Web of Science Zoological Record)

*Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації*

6. **Bogdaniuk AO**, Berestovyy OO, Tsvik VV. Kinetic Characteristics of Spermatozoa of Saanen Goats After Cryopreservation. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019;29(2):169. DOI: [10.15407/cryo29.02.169](https://doi.org/10.15407/cryo29.02.169) (oral presentation)
7. **Bogdaniuk A**, Berestovyy O, Tsvyk V, Garkavii V, Yusifli N, Sigunov O, Kramareva O. Different ovarian stimulation protocols used prior laparoscopic ovum pick-up in Saanen goats: preliminary results. *Proceedings of the 36th Annual Meeting of the Association of Embryo Technology in Europe – Animal Reproduction*. 2020;17(3):29. (poster)
8. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Tsvyk V. Effect of Sucrose and Glycerol Based Cryoprotective Media on Kinetic Characteristics of Saanen Goat Spermatozoa. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020;30(3):283. DOI: [10.15407/cryo30.03a.283](https://doi.org/10.15407/cryo30.03a.283) (oral presentation)
9. **Bogdaniuk A**, Garkavii V. The kinetic characteristics of semen from Saanen and Alpine goats after cryopreservation in different freezing media. *Cryobiology*. 2020;97:298. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.10.189](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.189) (poster)
10. **Bogdaniuk A**, Garkavii V. Embryo development rate after fertilization with fresh vs. Frozen sperm in goats. *Cryoletters*. 2021;42(6):376. Available online: <http://www.cryoletters.org/sltb-2020-42-6-366-379-abstracts.pdf> (poster)
11. **Богданюк АО**, Гарькавий ВВ. Цитотоксичний вплив гліцерину на рухливість сперматозоїдів самців кіз. *Матеріали XVII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» – Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна*. 2020:40–41. (усна доповідь)
12. **Bogdaniuk A**, Berestovyy O, Tsvyk V, Garkavii V, Yusifli N, Sigunov O, Kramareva O, Boiko D. Birth of kids after laparoscopic transfer of in vitro produced Saanen embryos into surrogate goats of Ukrainian local breed. *Reproduction In Domestic Animals*. 2021;57(S1):46. DOI: [10.1111/rda.14052](https://doi.org/10.1111/rda.14052) (poster)

13. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Petrushko M. Pregnancy Rate After Transfer of In Vitro Produced Goat Embryos Using Fresh Vs Frozen Sperm In Different Seasons. *Cryobiology*. 2021;103:182. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2021.11.087](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.11.087) (oral presentation)
14. **Bogdaniuk A**, Yurchuk T, Petrushko M. Cryopreservation influences goat spermatozoa characteristics in breeding and non–breeding season *Proceedings of the SLTB 2021*. 2021:14. (poster)
15. **Богданюк АО**, Гарькавий ВВ. Кріорезистентність сперматозоїдів цівів зааненської породи у нестатевий сезон. *Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини»* – Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2021:25. (усна доповідь)
16. **Bogdaniuk AO**, Yurchuk TO, Petrushko MP. DNA fragmentation rate of goat spermatozoa after cryopreservation with egg yolk contained and egg yolk–free cryoprotective media. *XV IMBG all–Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation. Biopolymers and Cell*. 2021;37(3):185. DOI: [10.7124/bc.000A56](https://doi.org/10.7124/bc.000A56) (усна доповідь)
17. **Богданюк АО**, Гарькавий ВВ. Репродуктивні характеристики сперматозоїдів самців кіз зааненської породи, кріоконсервованих у різні сезони. *Матеріали 45–ої щорічної міжнародної конференції молодих вчених Холод в біології і медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології; 2021 трав. 19–20, м. Харків; 2021:4.* (усна доповідь)
18. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Petrushko M. In vitro fertilization of Saanen goat oocytes in non–breeding season with epididymal spermatozoa. *Abstracts of The 1st Ukrainian–Polish Scientific Forum AGROBIOPERSPECTIVES. The Animal Biology*. 2021;23(3):15. DOI: [10.15407/animbiol23.03](https://doi.org/10.15407/animbiol23.03) (усна доповідь)
19. **Богданюк АО**, Гарькавий ВВ. Фертильність кози та цапа зааненської породи, народжених сурогатними козами української локальної породи

- після переносу ембріонів, створених *in vitro*. *Тези доповідей наукової конференції «Зоологія в сучасному світі: виклики XXI століття» (м. Київ, Інститут зоології НАН України, 1–3 червня 2021 р.)*. 2021:109. (усна доповідь)
20. **Bogdaniuk A**, Petrushko M. Morphological characteristics of freshly isolated and cryopreserved spermatozoa of Saanen bucks in different seasons. *Cryobiology*. 2022;109:69. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2022.11.221](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.221) (poster)
  21. **Bogdaniuk A**, Petrushko M. Seasonal variation of morphometrical characteristics of fresh and cryopreserved Saanen goat sperm. *Anim Reprod*. 2022;19(2):e22217. Available online: <https://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/62fe8726a953957f0c02b102> (oral presentation)
  22. **Bogdaniuk A**, Garkavii V. Seasonality in kidding after transfer of *in vitro* produced Saanen goat embryos into recipients of local Ukrainian breed. *Reproduction In Domestic Animals*. 2022;57(S4):59–60. DOI: [10.1111/rda.14243](https://doi.org/10.1111/rda.14243) (oral presentation)
  23. **Богданюк АО**, Петрушко МП. Сезонні зміни біохімічних показників сім'яної плазми цапів та їх вплив на характеристики сперматозоїдів. *Матеріали XIX Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» – Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна*, 2022:94–96. (усна доповідь)
  24. **Богданюк АО**, Юрчук ТО, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів кіз, як метод природоохоронної біотехнології. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали II міжнародної наук.–практ. інтернет–конф. (20 травня 2022 р., м. Харків)*. – Електрон. дані. – Х. : НФаУ. 2022:66. (усна доповідь)
  25. **Богданюк АО**, Гаркавий ВВ, Петрушко МП. Репродуктивні характеристики сперматозоїдів цапів залежать від породи. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XX Міжнародної наукової*

конференції студентів, молодих вчених та фахівців. (25–26 травня 2023 р., м. Харків, Україна). – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2023:25.

(усна доповідь)

26. **Bogdaniuk AO**, Petrushko MP, Garkavii VV. Cryotolerance of spermatozoa varies according to the breed of goat. *Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи: збірник тез доповідей всеукр. наук.– практ. конф. науковців, викладачів та аспірантів, 23 травня 2023 р. Харків:* ДБТУ. 2023:26–27.  
<https://repo.btu.kharkov.ua/handle/123456789/36580> (усна доповідь)
27. **Bogdaniuk AO**, Petrushko MP, Garkavii VV. Correlation between biochemical parameters of seminal plasma and cryoresistance of spermatozoa of Saanen bucks. *47th Annual International Conference of Young Scientists «Cold in Biology and Medicine: Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology»*. 2023:5. (oral presentation)

## ЗМІСТ

Стор.

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| АНОТАЦІЯ .....                                                                                        | 2  |
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....                                                                       | 26 |
| ВСТУП .....                                                                                           | 28 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....                                                                      | 36 |
| 1.1 Різноманіття порід кіз, функціонування їх репродуктивної системи та роль кіз в тваринництві ..... | 36 |
| 1.2 Кріоконсервування сперматозоїдів цапів: проблеми та невирішені питання .....                      | 41 |
| 1.3 Фактори, які впливають на кріорезистентність сперматозоїдів .....                                 | 47 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....                                                       | 52 |
| 2.1 Загальні положення.....                                                                           | 52 |
| 2.2 Біоетичні аспекти дослідження .....                                                               | 52 |
| 2.3 Загальна схема дослідження .....                                                                  | 53 |
| 2.4 Характеристика тварин, що були використані в дослідженнях.....                                    | 53 |
| 2.5 Отримання еякулятів цапів .....                                                                   | 54 |
| 2.6 Аналіз еякуляту цапів .....                                                                       | 55 |
| 2.6.1 Обчислення об'єму сперми та концентрації сперматозоїдів .....                                   | 55 |
| 2.6.2 Визначення рухливості сперматозоїдів .....                                                      | 55 |
| 2.6.3 Аналіз життєздатності сперматозоїдів .....                                                      | 56 |
| 2.6.4 Морфологічний аналіз сперматозоїдів .....                                                       | 57 |
| 2.6.5 Визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів .....                                          | 58 |
| 2.7 Визначення здатності сперматозоїдів до запліднення .....                                          | 59 |
| 2.7.1 Отримання ооцитів кіз.....                                                                      | 59 |
| 2.7.2 Дозрівання <i>in vitro</i> ооцитів кіз.....                                                     | 60 |
| 2.7.3 Запліднення <i>in vitro</i> ооцитів кіз .....                                                   | 61 |
| 2.7.4 Культивування <i>in vitro</i> зигот та ембріонів кіз.....                                       | 62 |

|                                                                      |                                                                                                               |    |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.7.5                                                                | Визначення частоти розвитку бластоцист кіз.....                                                               | 62 |
| 2.7.6                                                                | Трансплантація бластоцист кіз–донорів козам–реципієнтам .....                                                 | 63 |
| 2.7.7                                                                | Діагностика вагітності кіз–реципієнтів та отримання окоту .....                                               | 64 |
| 2.8                                                                  | Кріоконсервування сперматозоїдів цапів .....                                                                  | 65 |
| 2.8.1                                                                | Приготування розчинів кріопротекторних середовищ .....                                                        | 65 |
| 2.8.2                                                                | Визначення впливу розчинів кріопротекторних середовищ на<br>рухливість та життєздатність сперматозоїдів ..... | 65 |
| 2.8.3                                                                | Заморожування зразків .....                                                                                   | 66 |
| 2.8.4                                                                | Відігрів зразків та видалення кріопротекторного середовища .....                                              | 66 |
| 2.9                                                                  | Біохімічний аналіз сім'яної плазми цапів .....                                                                | 67 |
| 2.9.1                                                                | Виділення сім'яної плазми з цільного еякуляту .....                                                           | 67 |
| 2.9.2                                                                | Проведення біохімічного аналізу на полуавтоматичному та<br>автоматичному аналізаторах .....                   | 67 |
| 2.10                                                                 | Визначення рівня транскриптів генів білка теплового шоку у<br>сперматозоїдах цапів .....                      | 68 |
| 2.10.1                                                               | Підбір праймерів для генів .....                                                                              | 68 |
| 2.10.2                                                               | Виділення з еякуляту фракції сперматозоїдів.....                                                              | 69 |
| 2.10.3                                                               | Екстракція РНК зі сперматозоїдів .....                                                                        | 69 |
| 2.10.4                                                               | Синтез комплементарної ДНК .....                                                                              | 70 |
| 2.10.5                                                               | Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (rtPCR).....                                         | 70 |
| 2.11                                                                 | Статистична обробка отриманих результатів .....                                                               | 71 |
| <b>РОЗДІЛ 3. КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЦАПІВ</b>              |                                                                                                               |    |
| <b>ЗААНЕНСЬКОЇ ТА АЛЬПІЙСЬКОЇ ПОРІД В РІЗНІ СЕЗОНИ ПАРУВАННЯ</b> 72  |                                                                                                               |    |
| <b>РОЗДІЛ 4. СЕЗОННА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ БІОХІМІЧНОГО СКЛАДУ</b>          |                                                                                                               |    |
| <b>СІМ'ЯНОЇ ПЛАЗМИ ЦАПІВ ТА РІВНЯ ТРАНСКРИПТІВ ГЕНУ HSP 90...</b> 92 |                                                                                                               |    |
| <b>РОЗДІЛ 5. РЕПРОДУКТИВНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦАПІВ В РІЗНІ</b>          |                                                                                                               |    |
| <b>СЕЗОНИ ПАРУВАННЯ .....</b> 105                                    |                                                                                                               |    |
| <b>УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> 112       |                                                                                                               |    |
| <b>ВИСНОВКИ .....</b> 121                                            |                                                                                                               |    |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ..... | 123 |
| Додаток А .....                  | 150 |
| Додаток Б .....                  | 156 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AQP – aquaporin (білок–аквапорин)

BUSgp60 – 60-kDa glycoprotein from bulbourethral gland secretion (глікопротеїнова ліпаза 60кДа з секрету бульбоуретральної залози цапів)

CASA – Computer Assisted Semen Analysis (автоматизований аналіз сперми за допомогою комп'ютера)

EYCE – egg yolk–coagulating enzyme (фермент, що коагулює яєчний білок)

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (4-(2-гідроксиетил)-1-піперазиноетансульфонова кислота)

HSP – heat shock protein (білок теплового шоку)

IVC – *in vitro* culture (культивування ембріонів в умовах *in vitro*)

IVF – *in vitro* fertilization (запліднення в умовах *in vitro*)

IVM – *in vitro* maturation (дозрівання ооцитів в умовах *in vitro*)

PIPES – piperazine–N,N'–bis(2–ethanesulfonic acid) (піперазин–N.N'–біс(2–етансульфонова кислота))

rtPCR – real–time polymerase chain reaction (полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі)

SBUIII – secretion of the bulbourethral gland protein fraction (протеїнова фракція секрету бульбоуретральної залози цапів)

SCD – sperm chromatin dispersion (дисперсія хроматину сперматозоїдів)

TES – 2-{[1,3-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino}ethane-1-sulfonic acid (2-{[1,3-дигідрокси-2-(гідроксиметил)пропан-2-іл]аміно}етан-1-сульфонова кислота)

Tris – tromethamine; tris(hydroxymethyl)aminomethane (трометамін; трис(гідроксиметил)амінометан)

Гл – гліцерин

ГГВ – гіпоталамо-гіпофізарно-гонадна вісь

ГнРЛ – гонадотропін–рилізінг гормон

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДРТ – допоміжні репродуктивні технології

ЕГ – етилен гліколь

ЛГ – лютеїнізуючий гормон

ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності

РНК – рибонуклеїнова кислота

ФСГ – фолікулостимулюючий гормон

ЯЖ – яєчний жовток

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження.

За даними Державної служби статистики станом на початок 2023 року в Україні нараховується 422,8 тисяч голів кіз (*Capra aegagrus hircus*), що на 13,2% менше, ніж попереднього року. Переважну більшість з них складають особини української місцевої, зааненської та альпійської породи. Агресія російської федерації проти України вплинула на усі сфери нашого життя. В такі скрутні часи питання продовольчої безпеки нашої країни мають особливе значення. На сьогодні у племінних сільськогосподарських підприємствах утримуються 14,2 тисячі голів, які можуть бути найефективніше використані для отримання молока, шерсті та м'яса. Найактивніше розводять породи для молочного козівництва, оскільки козине молоко має ряд переваг перед молоком корів. Так, козине молоко вважається менш алергенним та більш легким у засвоюванні [1, 2] через те, що до його складу входить менше лактози, тому його можуть споживати люди з гіполактозією [3].

Україна є перспективною країною з точки зору козівництва [4, 5]. Однак, для підтримання чистого племінного поголів'я та збільшення його кількості є необхідність використання сучасних допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [6].

На сьогоднішній день штучне осіменіння кіз є найефективнішим способом розведення необхідних для фермерських господарств порід [7]. За допомогою штучного осіменіння є можливість регулювати поголів'я тварин, час їхнього окоту та контролювати чистоту породи. Через анатомічну будову цервікального каналу кіз, внутрішньоматкове осіменіння неможливе, тому концентрація та рухливість сперматозоїдів у дозі сперми, яку використовують для запліднення, мають бути достатньо високими, щоб мати можливість успішно застосовувати цервікальне та вагінальне осіменіння. Альтернативою може бути лапароскопічне осіменіння, проте воно потребує

додаткового обладнання та досвідчених техніків штучного осіменіння [8]. Оскільки для молочного господарства надається перевага особинам жіночої статі, запліднення спермою, в якій сперматозоїди були відібрані за статевою хромосомою, є важливою та доцільною процедурою. Використання спеціальних технологій надає таку можливість, однак може погіршувати морфофункціональні показники сперматозоїдів та їх здатність до запліднення [9].

Кози, що знаходяться в помірних широтах, мають чіткий парувальний сезон для розмноження – осінь. В цей період кози природно приходять в стан готовності до спарювання – еструс [10]. Існує можливість штучно викликати такий стан за допомогою введення гормонів (фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), прогестерон, гонадотропін), регулюючи тим самим період народження козенят [11]. Аналогічно до кіз, у цапів також існує різниця у показниках сперми в різні сезони. Велика кількість сперматозоїдів в одній дозі сперми цапа дозволяє розділити її на порції та запліднити одразу декілька самок. Це дає можливість зменшити кількість утримуваних на фермерських господарствах цапів–продукторів, що робить діяльність ферми економічно більш вигідною.

Застосовуючи кріоконсервування сперми, можливо заморожувати та зберігати еякулят з найкращими показниками і використовувати його у будь–який сезон.

На сьогоднішній день розроблені та впроваджені в сільськогосподарській практиці кріопротекторні середовища та методики заморожування сперми биків, хряків, баранів та коней (Minitube, IMV Technologies), проте спеціального середовища для кріоконсервування сперми цапів не розроблене. Пропонується застосовувати середовища, які створювалися для інших видів сільськогосподарських тварин. Однак, сперма цапів має певні особливості, що відрізняють її від сперми інших видів [12–14].

Процес кріоконсервування сперми викликає ультраструктурні, біохімічні та функціональні зміни сперматозоїдів. Мішенню дії цих факторів є плазматична мембрана та мембрана акросоми сперматозоїдів. В результаті чого виникають зміни проникності мембран, падає рухливість сперматозоїдів, порушується цілісність хроматину та білків. Крім того, під час заморожування–відігріву утворюються реакційні форми кисню, які можуть пошкоджувати мембрану мітохондрій та пригнічувати функції мітохондрій [14]. Для забезпечення виживання більшої кількості сперматозоїдів після кріоконсервування та збереження їх кращої запліднювальної здатності, необхідно враховувати морфологічні, кінетичні, біохімічні та генетичні особливості сперматозоїдів [15], особливості складу сім'яної рідини [16] та вплив сезону, в який відбувається отримання сперми [17].

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.**

Дисертаційна робота виконана у відділі кріобіології системи репродукції Інституту Проблем Кріобіології і Кріомедицини НАН України в рамках науково–дослідних тем №2.2.6.108 «Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів» (Державний реєстраційний номер – 0116U003498), №2.2.6.128 «Обґрунтування диференційованого підходу до кріоконсервування репродуктивних клітин з урахуванням їх вихідного стану та видоспецифічності» (Державний реєстраційний номер – 0120U100546) та №2.2.6.130 «Вплив кріоконсервування на стан фрагментації ДНК сперматогенних клітин різних стадій диференціювання» (Державний реєстраційний номер – 0120U100378). Дослідження біохімічного складу сім'яної плазми цапів проведено в рамках гранту RIS4Ukraine програми EID Food за співфінансування Європейського Союзу. Дослідження експресії генів

сперматозоїдів виконані в рамках гранту «Мільйони добрих справ від Епіцентр» від ТОВ «Епіцентр К».

**Мета і завдання дослідження.**

**Мета роботи** – оцінити вплив сезонності на кріорезистентність сперматозоїдів самців кіз зааненської та альпійської порід.

Для досягнення даної мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Порівняти сперміологічні показники цапів двох порід у парувальний і непарувальний сезони.
2. Визначити життєздатність сперматозоїдів після експозиції з кріозахисними середовищами та на основі аналізу отриманих даних визначити його оптимальний склад та час експозиції для кріоконсервування сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід у різні сезони парування.
3. Оцінити вплив кріоконсервування на функціональні характеристики сперматозоїдів цапів парувального та непарувального сезонів.
4. Проаналізувати взаємозв'язок біохімічних показників сім'яної плазми, отриманих у парувальний та непарувальний сезони, з кріорезистентністю сперматозоїдів.
5. Провести аналіз рівня транскриптів гену HSP 90 сперматозоїдів цапів в залежності від сезону розмноження.
6. Порівняти частоту розвитку передімплантаційних ембріонів *in vitro* після запліднення ооцитів свіжовиділеними та кріоконсервованими сперматозоїдами, які були отримані у парувальний та непарувальний сезони, та частоту настання вагітності та окоту тварин після трансплантації ембріонів досліджуваних груп.

**Об’єкт дослідження** – зміна кріорезистентності сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід, спричинена переходом від парувального до непарувального сезону.

**Предмет дослідження** – сперміологічні, біохімічні та молекулярно–генетичні характеристики нативної та кріоконсервованої сперми цапів у парувальний та непарувальний сезони.

**Методи дослідження.** Під час виконання роботи використовували такі методи: світлову мікроскопію для визначення морфологічних та функціональних характеристик сперматозоїдів цапів; SCD–тест для визначення рівня фрагментації ДНК; методи запліднення та культивування *in vitro* ембріонів; біохімічні методи для визначення складу сім’яної плазми цапів; молекулярно–генетичні методи (полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі – rtPCR) для визначення рівня транскриптів генів; кріобіологічні методи та статистичні методи обробки отриманих даних.

#### **Наукова новизна отриманих результатів.**

*Вперше* були отримані дані щодо різниці сперміологічних характеристик та кріорезистентності сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід, які утримуються в помірних широтах на території України, залежно від сезону розмноження. *Вперше* проаналізований біохімічний склад сім’яної плазми та визначено його зв’язок з кріотолерантністю сперматозоїдів цапів. *Вперше* проведений молекулярно-генетичний аналіз вмісту транскриптів гену білка теплового шоку (HSP 90) сперматозоїдів у різні сезони. *Вперше* визначено частоту запліднення, розвиток ембріонів *in vitro*, імплантацію бластоцист та окіт кіз у непарувальний сезон при використанні кріоконсервованої сперми цапів парувального сезону.

#### **Практичне значення отриманих результатів.**

Отримані результати зміни сперміологічних характеристик цапів, складу сім’яної плазми та рівня експресії генів, які відбуваються під впливом сезонних флуктуацій та впливають на частоту виживання сперматозоїдів після кріоконсервування, можуть дозволити оптимізувати склад середовищ для

кріоконсервування сперми різних порід цапів з урахуванням сезонності. Це дозволить зменшити навантаження на цапів–продукторів, утримувати меншу їх кількість в племінних господарствах, використовувати сперму у будь–який сезон, щоб рівномірно розподілити окіт та пов’язаний з цим пік вироблення молока козами. Ефективне кріоконсервування сперматозоїдів сприятиме оптимізації концентрації сперматозоїдів у спермодозі та збільшенню кількості доз, якими можна зробити осіменіння більшої кількості самок, що буде мати економічний ефект.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійним та оригінальним науковим дослідженням, основні результати якого були отримані особисто здобувачем. Автором проведено патентно–інформаційний пошук, аналіз літературних даних, спільно із керівником визначені мета та завдання роботи, а також шляхи їх вирішення з розробкою власних підходів та модифікацій методів дослідження. Здобувачем особисто одержано експериментальні дані усіх розділів дисертаційної роботи, проведені їх первинний аналіз та статистична обробка. Спільно з науковим керівником поставлені завдання роботи, здійснено інтерпретацію результатів і сформульовано остаточні висновки. Здобувачем спільно з ветеринарним лікарем Гаркавим В.В. заплановані та виконані маніпуляції з тваринами (отримання сперми, отримання яєчників, підготовка кіз–реципієнтів ембріонів, діагностика вагітності кіз, аналіз окоту), спільно з к.б.н., ст.н.с. Юрчук Т.О. проведені біохімічні дослідження сім’яної плазми цапів та дослідження рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів, на базі Інституту репродукції тварин та харчових досліджень Польської академії наук; на базі Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, спільно з к.б.н. Світіною Г.М. та Бойко О.І., проведені молекулярно–генетичні дослідження експресії генів сперматозоїдів.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

у роботах [18–35] – у проведенні аналізу сперміологічних характеристик сперми ців, у проведенні оцінки морфологічних та функціональних характеристик сперматозоїдів, аналізі результатів, формулювання висновків та підготовці матеріалів до друку.

у роботах [18–20, 22, 24, 25, 27–31, 33, 35] – у проведенні кріоконсервування сперматозоїдів, їх оцінці перед та після заморожування–відігріву, аналізі результатів, формулювання висновків та підготовці матеріалів до друку.

у роботах [25, 27, 36–39] – у проведенні дозрівання ооцитів *in vitro*, запліднення та культивування ембріонів кіз *in vitro*, оцінці морфологічних характеристик отриманих бластоцист, підготовці ембріонів для проведення трансплантації козам–реципієнтам, аналізі результатів, формулювання висновків та підготовці матеріалів до друку.

у роботах [32, 40] – у проведенні біохімічного аналізу сім'яної рідини, аналізі результатів, формулювання висновків та підготовці матеріалів до друку.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи були представлені на 44–47–тій щорічних конференціях молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, 2020–2023) та отримано дипломи першого та другого ступеня, 17–20–ій Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (м. Харків, 2020–2023) та отримано дипломи першого та другого ступеня, на 57–58–ій щорічній Конференції Співки Кріобіології (CRYO) (віртуально 2020, м. Чикаго 2021), 56–57–ій Конференції Співки Біології Низьких Температур (SLTB) (віртуально 2020–2021), 36 та 38–ій Щорічній Конференції Європейської Асоціації Ембріотехнологій (AETE) (віртуально 2020, м. Утрехт 2022), 15–ій Всеукраїнській конференції молодих учених з молекулярної біології та генетики (м. Київ 2021), конференції «Зоологія в сучасному світі: виклики XXI століття», присвяченої 90–річчю від часу заснування Інституту зоології ім. І. І. Шмальгаузена Національної академії

наук (м. Київ 2021), I-ому українсько–польському науковому форумі «Агробіоперспективи» (м. Львів, 2021), на 24–25–ій Конференції Європейської Спілки Репродукції Домашніх Тварин (ESDAR) (віртуально 2021, м. Салоніки 2022), конференції Joint Meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology CRYO 2022 (Дублін, 2022), II –й Міжнародній науково–практичній інтернет–конференції «Проблеми та Досягнення Сучасної Біотехнології» (м. Харків, 2022), Всеукраїнській науково–практичній конференції науковців, викладачів та аспірантів «Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи» (м. Харків, 2023).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 27 робіт, з них 5 статей (1 у закордонному виданні, що входить у міжнародну наукометричну базу Web of Science, та 4 у фахових виданнях України (2 – входять у міжнародну наукометричну базу Scopus та 1 – у міжнародну наукометричну базу Web of Science) та 22 публікації у збірках тез міжнародних та національних конгресів та конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 157 сторінках друкованого тексту і складається з таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи, 3 розділи результатів досліджень, узагальнення та обговорення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, додатки. Список використаної літератури включає 211 джерел, розміщених на 27 сторінках. Робота проілюстрована 28 рисунками, 9 мікрофотографіями та 9 таблицями.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Різноманіття порід кіз, функціонування їх репродуктивної системи та роль кіз в тваринництві**

Коза вважається першою одомашненою твариною, яку людина змогла приручити та використовувати її молоко, м'ясо та хутро для власних потреб. За різними археологічними свідченнями це відбулося приблизно у 8 тисячолітті до нашої ери на території Стародавнього Єгипту [41]. Більш пізні археологічні знахідки, датовані 2500 роком до нашої ери, підтверджують використання людьми кіз у молочному та м'ясному тваринництві на території долини річки Інд, в Китаї та в Центральній Америці [42].

Козівництво часто вважається напрямком тваринництва для бідних. А в багатьох регіонах утримання кіз навіть було заборонене через те, що вони можуть бути потенційно шкідливими для лісів та пасовищ. У країнах, що розвиваються, кози роблять дуже цінний внесок, особливо для незаможного сільського населення. Важливість цього цінного генетичного ресурсу недооцінюється, а його внесок у забезпечення засобів до існування малозабезпечених верств населення залишається недостатньо дослідженим. [43]. Інвестиції в наукові дослідження і розробки, спрямовані на підвищення відносно низького рівня продуктивності кіз, не відповідають їхньому потенційному значенню, що призводить до того, що багато порід кіз не є генетично дослідженими, особливо в країнах, що розвиваються.

Тим часом у розвинених країнах, і насамперед у Франції, зростаючий інтерес до молочного потенціалу кіз призвів до створення спеціального сектора молочного козівництва, яке з травня 1968 року в Європі вважається частиною екологічного сільського господарства [44].

Наразі у світі за даними Корпоративної статистичної бази даних продовольчої і сільськогосподарської організації (FAOSTAT) налічується приблизно один мільярд голів кіз. Існують величезні відмінності між різними

частинами світу щодо кількості кіз. Найбільша кількість кіз спостерігається в Азії, за нею йде Африка, на яку припадає близько 59,7% і 33,8%, відповідно, що в сумі становить 93,5% від загальної кількості у світі [45].

Існує небагато джерел літератури, що описують породи кіз, 136 порід були ідентифіковані в досить повному довіднику Галла [46]. Більшість популяцій кіз належать до невизначених груп, що походять від азійських, європейських або африканських предків, і використовуються місцевим населенням з невеликою економічною цінністю. Ці породи належать до так званих традиційних місцевих (локальних) порід, які, як правило, є багатоцільовими, тобто і молочними, і м'ясними, і хутряними. Крім того, лише деякі з ідентифікованих порід беруть участь у справжніх програмах селекції.

Не зважаючи на те, що всі породи кіз відносяться до одного виду, існує велика внутрішньовидова різниця багатьох ознак, переважна більшість з яких закріплені генетично. Так, наприклад, ідентифіковано різні ділянки геному кіз, що можуть бути цільовими для селекції. Це гени, пов'язані з розвитком зовнішнього вуха, фертильністю [47] і репродуктивними ознаками, ефективністю перетравлення їжі, складом жирних кислот молока [48], кількістю соматичних клітин і вмістом білка у молоці [49]. Доведено, що генетичні особливості породи можуть впливати на репродуктивний потенціал кіз – розвиток фолікулів, дозрівання яйцеклітин, гормональну регуляцію розвитку ендометрію [50]. Так, наприклад, показано, що експресія генів, які відповідають за фолікулярний розвиток та атрезію, відрізняється у різних порід кіз, тобто є генетично детермінованими [51]. В той же час, зв'язок породи кіз з характеристиками сперми [52] та кріотолерантністю сперматозоїдів вивчений недостатньо, тому потребує подальших досліджень.

Пристосованість кіз до суворих умов навколишнього середовища (висока стійкість до теплового стресу і посухи, ефективне використання і засвоюваність кормів) дозволяє місцевому населенню підвищувати

продуктивність тваринництва в різних кліматичних умовах від екстремальних умов тропічних дощових лісів до сухих пустель [53].

У кіз спостерігається сезонний характер репродуктивної активності, пов'язаний з річними коливаннями фотоперіоду [54]. Початок і тривалість періоду розмноження протягом року залежить від різних екологічних і фізіологічних факторів (широта і клімат, доступність їжі, порода і система розведення). Той факт, що їхня статевая активність є сезонною, впливає на розподіл їхньої продуктивності протягом року, і це є проблемою як для молочного, так і для м'ясного виробництва, яке намагається мати постійне виробництво цілий рік.

Репродуктивна сезонність спостерігається у більшості порід кіз, що походять з високих широт ( $>35^\circ$ ) і у деяких місцевих порід з субтропічних широт ( $25\text{--}35^\circ$ ). У кіз з помірних та субтропічних регіонів сезон розмноження починається на початку осені, а закінчується наприкінці зими. Самці цих порід також демонструють значні зміни у своїй статевій активності. У цих сезонних порід кіз статевая поведінка, розмір яєчок, індекс сперматогенетичної активності, а також кількісна та якісна продуктивність сперми цівів різко знижуються протягом непарувального сезону [55].

Річний репродуктивний ритм у порід кіз з помірних широт і деяких місцевих порід з субтропиків контролюється фотоперіодом [56]. У альпійських і зааненських самців кіз, які піддавалися чергуванню 1 або 2 місяців довгих днів (16 год світлового дня: ДД) і 1 або 2 місяців коротких днів (8 год світлового дня: КД), виражена сезонність сексуальної поведінки, розміру сім'яників і кількісного та якісного виробництва сперми була відсутня або зменшувалася. Ці результати були покращені за допомогою чергування 1,5 місяця ДД і 1,5 місяця КД [57].

Частота овуляції та еструсу у альпійських і зааненських молочних кіз, навіть якщо вони мають відмінну фізичну форму, характеризуються тривалим періодом статевого спокою, анестральним сезоном, оскільки частота овуляцій значно варіює від 0 (березень-вересень) до 100% (жовтень-

січень). У ців же, в свою чергу, сперматогенна активність і статеві поведінка не припиняються, проте вони сильно варіюють залежно від сезону. Так, наприклад, у баранів породи Іль-де-Франс вага яєчок і виробництво сперми на одне яєчко варіює від менш ніж 200 г і 1 млрд сперматозоїдів на день у березні до більш ніж 300 г і 5 млрд клітин на день у вересні, відповідно. Цив альпійської породи також демонструють різкі коливання в сексуальній поведінці, рухливості сперматозоїдів і здатності до запліднення між весняно-літнім і осінньо-зимовим періодами [58].

Цікаво також відзначити, що хоча кози відомі як сезонні тварини, існують деякі специфічні породи, які не виражають сезонного розмноження [59]. Подовжений сезон розмноження у таких порід, схоже, не пов'язаний з навколишнім середовищем, оскільки інші породи кіз демонструють репродуктивну циклічність у тих самих широтах. Можливо такі особливості можна пояснити генотипами кіз та рівнем годівлі [60].

Показано, що фотоперіод впливає на репродукцію через гормон епіфіза – мелатонін, оскільки використання мелатонінових імплантатів може змінювати сезон розмноження у кіз [61–63].

Також виявлений вплив температури навколишнього середовища на репродуктивну систему. Коли температура навколишнього середовища висока, репродуктивна активність тварин обмежується певним періодом року, щоб забезпечити виживання потомства. Надмірно високі температури навколишнього середовища можуть перешкоджати репродуктивній активності [64].

У дрібних жуйних тварин домінуюча реакція гіпоталамо-гіпофізарної системи на фактор навколишнього середовища залежить від генотипу тварини [65]. Така взаємодія між внутрішніми (генотип) і зовнішніми факторами дозволяє пояснити реакцію кіз на домінуючий сигнал у їхньому середовищі. З іншого боку, показано, що сезонна активність у альпійських кіз помірного поясу не змінюється, коли самки експериментально піддаються впливу змодельованого тропічного фотоперіоду, демонструючи нечутливість

до інших стимулів відмінних від звичайного біотопу цих кіз. На противагу цьому, є підтвердження, що в природних умовах кози різного походження і генотипів (альпійська, нубійська і кріольська × нубійська) демонструють сезонну репродуктивну поведінку, подібну до субтропічних кіз у Мексиці [66].

Парувальний сезон має помітний вплив на сім'яники цапів, причому розмір сім'яників змінюється в тому ж напрямку, що й жива маса. Це збільшення пов'язане зі збільшенням добового продукування сперми, що зумовлено як загальним збільшенням маси яєчок, так і підвищенням ефективності вироблення сперми на грам тканини яєчок [67].

Гіпоталамо–гіпофізарно–гонадна вісь (ГГВ) з'єднує гіпоталамус, гіпофіз і статеві залози. Регуляція репродуктивних процесів включає інтеграцію різних факторів та умов навколишнього середовища в ГГВ, а індикатором результату цих процесів є пульсуюча секреція гонадотропін-рилізінг-гормону (ГнРГ) з гіпоталамуса. Ці фактори включають споживання корму та стан харчування, статеві стероїди, сезон/фотоперіод, феромони, вік та стрес. Пульсуюча секреція ГнРГ впливає на характер секреції гонадотропінів: фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) і лютеїнізуючого гормону (ЛГ), які потім регулюють як ендокринну функцію, так і дозрівання гамет у гонадах. Це регулює вироблення гонадотропінів і тестостерону. Існують докази того, що у самців ГнРГ бере участь у різноманітних поведінкових і фізіологічних процесах, таких як вивільнення репродуктивних гормонів, перебіг сперматогенезу і функція сперматозоїдів, агресивна поведінка і фізіологічний метаболізм. ГнРГ активує рецептори, що експресуються на клітинах Лейдіга і Сертолі, відповідно, для стимуляції секреції тестостерону і сперматогенезу в яєчках. Фотоперіод впливає на репродуктивну систему гіпоталамо–гіпофізарної осі через ритмічну добову секрецію мелатоніну. Підвищене виділення мелатоніну сприяє сексуальній активності, виробленню ГнРГ, стимуляції ЛГ і виробленню тестостерону. Це індукує функції яєчок, сперматогенез та статеве дозрівання. ГнРГ зменшує

вивільнення ЛГ гіпофізом через каскадний ефект і знижує концентрацію тестостерона в плазмі крові. Мікробіота кишечника підтримує гомеостаз статевих стероїдів і може викликати зниження продуктивності відтворення. Нещодавні дослідження нейронної мережі кісспептин–нейрокінін–динорфін у головному мозку призвели до швидкого прогресу в розумінні того, як контролюється секреція ГнРГ. Нові дослідження також вказують на те, що інші аналоги нейропептидів можуть бути залучені до контролю розмноження різних порід кіз [68].

## **1.2 Кріоконсервування сперматозоїдів цапів: проблеми та невирішені питання**

Кріоконсервування сперматозоїдів є важливим етапом репродуктивних біотехнологій у тваринництві [69]. Завдяки кріотехнологіям є можливість легко обмінюватися генетичним матеріалом не тільки між країнами, а і між континентами, оскільки транспортування живих тварин на далекі відстані часто є неможливим. В той же час, кріоконсервування сперматозоїдів дозволяє вирішувати і локальні задачі фермерських господарств. Наприклад, зникає необхідність утримувати велику кількість самців на підприємствах, оскільки один еякулят можна розділити на декілька доз для осіменіння та зберігати його до появи самиці, яка готова до запліднення [70]. Крім того, з'являється можливість керувати і точно визначати час запліднення та окоту [71], щоб оптимально розподіляти навантаження на працівників господарств, та, відповідно, керувати періодом молочної або м'ясної продуктивності підприємства. Також з'являється можливість точно обирати за визначати самця з метою покращення селекції на фермі [72].

Проте, кріоконсервування спричиняє часткове незворотне пошкодження сперматозоїдів через холодний шок, оксидативний стрес, модифікацію мембрани сперматозоїдів, токсичність кріопротекторів, утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду та перепади осмотичного

тиску. Такі пошкодження сперматозоїдів зрештою призводять до зниження рухливості сперматозоїдів і погіршення здатності до запліднення [73]. Тому оптимізація протоколів кріоконсервування з метою зменшення кріопошкоджень клітин є актуальним питанням.

Кріоконсервування більшості біооб'єктів, у тому числі гамет різних видів тварин, складається з декількох технологічних етапів: отримання біоматеріалу; експозиція біоматеріалу з кріозахисними середовищами; вибір та заповнення контейнера для кріоконсервування біоматеріалу; охолодження біооб'єктів до температури рідкого азоту та подальше їх зберігання в кріобанку; нагрів біооб'єктів та видалення кріопротектора; оцінка життєздатності біоматеріалу [74].

Початковим етапом процедури кріоконсервування є безпосередньо отримання сперми. Для цапів це найчастіше роблять за допомогою штучної вагіни. Для ініціації еякуляції можна використовувати самицю в еструсі, апарат для електроеякуляції, або ін'єкції гормонів [75].

Наступним важливим кроком процесу кріоконсервування є розбавлення і експозиція сперми з кріозахисними середовищами. Важливо, щоб зразок сперми був правильно розбавленим кріопротекторним середовищем, щоб мати необхідну кількість сперматозоїдів у соломинці для осіменіння. Щоб таким чином, досягти високого рівня запліднюваності за найменшої кількості осіменінь і з найменшою кількістю сперматозоїдів на одне осіменіння. Відомо, що сперму цапів успішно заморожували та отримували прийнятне запліднення при концентрації сперматозоїдів від  $80$  до  $500 \times 10^6/\text{мл}$  [14].

Кріозахисне середовище, серед іншого, має забезпечувати сперматозоїди джерелом енергії та захищати клітини від пошкоджень, пов'язаних зі зміною температури, і підтримувати відповідне середовище для тимчасового виживання сперматозоїдів. Крім того, воно повинно мати адекватний рівень рН (як правило, від 6.75 до 7) та відповідну осмолярність. Середовища кріоконсервування сперматозоїдів цапів найчастіше готують на

основі Tris буферу, проте як буферну систему використовують також цвітер-іони, наприклад, TES, HEPES, PIPES, які показують кращу буферну здатність і, відповідно, дозволяють зберегти кращу рухливість та цілісність акросоми сперматозоїдів після кріоконсервування [76].

Найпоширенішим проникаючим кріопротектором у середовищах для кріоконсервування сперматозоїдів цапів є гліцерин (Гл) [77]. У 1937 р. Гл використовували як середовище для заморожування сперми биків, баранів, жеребців, кнурів і кролів для охолодження ( $-21^{\circ}\text{C}$ ). Високі кріозахисні ефекти були отримані при концентрації Гл від 0,5 до 2 М. Потім, приблизно через 10 років, Polge та ін. [78] ще раз підтвердили позитивний вплив Гл для заморожування сперми домашньої птиці. Однак Гл викликає токсичні ефекти в сперматозоїдах через денатурацію білка, порушення взаємодії з актином та спричиняє пошкодження плазматичної мембрани під час кріоконсервування. Ще один значний прорив був досягнутий у 1950-х роках, коли сухий лід був замінений на рідкий азот як середовище для заморожування, оскільки сперматозоїди можуть зберігати життєздатність за  $-196^{\circ}\text{C}$  необмежено довго [79]. Інші проникаючі кріопротектори, такі як диметилсульфоксид (ДМСО) [80], етиленгліколь (ЕГ) та пропіленгліколь, диметилформаїд [81] також використовують у кріозахисних середовищах для сперматозоїдів цапів, проте набагато рідше за Гл.

Кріопротекторні середовища для сперми ссавців, як правило, містять яєчний жовток або сухе знежирене молоко. Однак розведення сперми зазначеними розчинниками може бути шкідливим для сперматозоїдів. Згубна взаємодія між сім'яною плазмою та яєчним жовтком була вперше задокументована A. Roy та ін. [82]. Такі ж проблеми виникають і при застосуванні молока, що було показано у роботі J. Nunes та ін. [83]. Було встановлено, що сперматозоїди зберігають свою рухливість у середовищах з яєчним жовтком, якщо видалити сім'яну плазму, але якщо до середовища з яєчним жовтком додати чисту сперму, жовток згортається, і сперматозоїди гинуть. Було також встановлено, що жовток згортається під дією ферменту

бульбоуретрального походження, названого таким чином ферментом, що коагулює яєчний жовток (EYCE – egg yolk–coagulating enzyme). Аналогічно, було ідентифіковано білок (SBUIII), що синтезується бульбоуретральною залозою цапів, який знижував життєздатність охолодженої або замороженої сперми цапа, розбавленої в середовищі на основі молока. Він викликав акросомну реакцію і подальшу клітинну загибель сперматозоїдів.

Подальші дослідження показали, що EYCE – це фосфоліпаза А [84], а SBUIII – це глікопротеїнова ліпаза 60 кДа з бульбоуретральної залози цапів (BUSgp60) [85]. EYCE та BUSgp60 спричиняють гідроліз тригліцеридів яєчного жовтка або молока, що призводить до утворення жирних кислот (лізолецитину у випадку з яєчним жовтком та олеїнової кислоти – з молочними тригліцеридами), які є токсичними для сперматозоїдів.

Задля усунення взаємодії між ензимами сім'яної плазми та яєчним жовтком або молоком кріопротекторного середовища, використовують стандартну процедуру видалення сім'яної рідини шляхом центрифугування. Як правило, сперматозоїди цапів відмиваються шляхом центрифугування при 550–950 g протягом 10–15 хв. Видалення сім'яної плазми покращує результати кріоконсервування сперматозоїдів цапів, але деякі компоненти, які природно наявні в сім'яній плазмі, втрачаються. Показано, що сім'яна плазма підтримує нормальний метаболізм та функціонування сперматозоїдів, відповідає за рух сперматозоїдів крізь статеві органи самки, а білки плазми – задіяні у процесах стабілізації мембрани сперматозоїдів, капацитації та взаємодії сперматозоїдів з яйцеклітинами [86].

Також були запропоновані альтернативні середовища для кріоконсервування, які мінімізують взаємодію сперматозоїдів з ліпазою, включаючи додавання інгібіторів ліпази BUSgp60, використання безліпідного коров'ячого молока, безтригліцеридного середовища, що містить молочний білок казеїн, або використання молока інших видів, крім молочних корів, у яких структура жирних кислот і триацилгліцерину відрізняється, щоб не допустити згаданих вище ферментативних реакцій [14].

Фосфоліпіди в яєчному жовтку, такі як фосфатидилхолін, важливі для захисту плазматичної мембрани сперматозоїдів від кріопшкодження [87]. Тому деякі подібні компоненти, такі як соєвий лецитин, можуть замінити яєчний жовток для кріоконсервування сперматозоїдів ців [88, 89]. Хоча соєвий лецитин вирішує проблеми, які може викликати яєчний жовток, такі як потенційна бактеріальна або вірусна контамінація, стандартизація концентрації компонентів середовища, є дослідження, що вказують на негативні ефекти, спричинені соєвим лецитином, зокрема порушення роботи мітохондрій у сперматозоїдах після розморожування [90].

Експозиція з кріопротекторами – період, коли сперматозоїди знаходяться у безпосередньому контакті з розчинами кріопротекторів. Важливо, щоб тривалість цього етапу була оптимізована, оскільки кріопротектор має проникнути до клітини, в той час, як вода має максимально покинути клітину, і одночасно кріопротектор, будучи цитотоксичним, не має почати проявляти згубний ефект на функціонування клітини.

Наступним етапом кріоконсервування є підбір та заповнення контейнера для консервування. Коли заморожують менші об'єми, концентрацію сперматозоїдів відповідно збільшують, щоб зберегти загальну кількість сперматозоїдів на одну дозу осіменіння. Наприклад, сперма, заморожена в контейнерах об'ємом 0,1 мл, повинна містити в десять разів більше сперматозоїдів на одиницю об'єму, ніж сперма, заморожена в контейнерах об'ємом 1,0 мл, щоб містити однакову загальну кількість сперматозоїдів [91].

Раніше широко розповсюдженим методом пакування сперми було заморожування у гранулах. Гранульовану сперму одержували шляхом піпетування крапель сперми з кріопротектором в напівсферичні заглиблення, зроблені в блоці сухого льоду. Гранули займали порівняно мало місця в кріосховищі, це був найдешевший спосіб зберігання. Основними недоліками є складність нанесення ідентифікації самця на кожену гранулу та вірогідність

перехресної контамінації, оскільки сперма контактує безпосередньо з рідким азотом [91]. Іншим способом зберігання були боросилікатні скляні віали та капіляри, проте вони були крихкі та досить часто розривалися під дією тиску під час розморожування.

Поліпропіленові кріовіали використовують і зараз для кріоконсервування сперми. Проте, вони мають ряд недоліків, наприклад, через великий розмір теплообмін та охолодження зразка не оптимальне та не однакове у всьому об'ємі, є ризик потрапляння рідкого азоту крізь гвинтову кришку, що може призводити до розривання віали під тиском під час розморожування та перехресної контамінації зразків [92].

На сьогодні найчастіше використовують соломинки об'ємами 0,25 або 0,5 мл (Minitube, IMV Technologies). Заповнення соломинок може виконуватися автоматично за допомогою спеціального обладнання або вручну, використовуючи піпетки. Кріоконсервування в соломинках дозволяє досягти необхідних швидкостей охолодження, зміна температури відбувається рівномірно по всьому об'єму зразка, соломинка герметично запаєна, тому ризик контамінації або потрапляння рідкого азоту всередину соломинки є мінімальним; маркування соломинки здійснюється легко, є можливість друкувати на поверхні соломинки; більшість наявних інструментів для штучного осіменіння сумісні саме з соломинками [93].

Далі іде етап охолодження біоматеріалу до температури рідкого азоту та його зберігання у кріосховищі. Це можна зробити вручну, не використовуючи спеціальне обладнання. Тоді, після розведення кріозахисними середовищами сперму слід повільно охолодити до  $+5^{\circ}\text{C}$  протягом щонайменше 1,5-2 год. Далі, використовуючи охолоджувальний штатив, соломинки зазвичай заморожують протягом 7–10 хв у парах рідкого азоту (від  $-75^{\circ}\text{C}$  до  $-125^{\circ}\text{C}$ ) (на висоті 4–6 см над поверхнею рідкого азоту). Нарешті, попередньо заморожену сперму безпосередньо занурюють у рідкий азот [94].

У морозильних камерах використовується платформа для утримання соломинок, яка охолоджується рідким азотом, що міститься в резервуарі під платформою. Рідкий азот заливається в резервуар, і машина, після програмування, використовує програмне забезпечення для реєстрації даних, щоб отримати охолодження від 20°C до -80°C зі швидкістю 1,5°C/хв, а потім зі швидкістю 6°C/хв; після завершення заморожування соломинки виймаються і зберігаються в рідкому азоті за температури -196°C. Програми прості у використанні і не потребують постійного втручання оператора [95].

Соломинки зазвичай розморожують протягом 30–60 с на водяній бані при температурі +35–40°C, проте існують повідомлення про використання водяної бані при +70°C протягом 7 с, що також дозволяло отримувати високі результати функціональної активності сперматозоїдів після розморожування [14]. При штучному осіменінні тварин зазвичай сперматозоїди не відмивають від кріопротекторних середовищ, а вводять сперму безпосередньо у шийку матки. Проте для використання сперматозоїдів у *in vitro* запліднення ооцитів сперматозоїди відмивають від кріопротекторів шляхом центрифугування у градієнтах концентрації або у відмивочних середовищах.

### **1.3. Фактори, які впливають на кріорезистентність сперматозоїдів**

Головним показником успішного кріоконсервування сперматозоїдів є збереження їх морфологічних та кінетичних характеристик та здатності до запліднення яйцеклітини і подальшого формування ембріона, який зможе імплантуватися та дати здорових нащадків. На жаль, наявні протоколи кріоконсервування сперматозоїдів є субоптимальними та призводять до необоротних пошкоджень значної кількості сперматозоїдів у дозі, що піддається кріоконсервуванню [96, 97].

Пошкодження, що виникають під час кріоконсервування, є наслідком впливу на сперматозоїди температурних коливань (термічного стресу), що призводить до утворення кристалів льоду всередині клітини і в навколишньому середовищі [98]. Крім того, відбуваються зміни осмолярності (осмотичний стрес), наприклад, через утворення гіперосмотичного позаклітинного середовища під час кристалізації позаклітинної води, на яке клітина реагує втратою внутрішньоклітинної води (дегідратацією), що призводить до зменшення об'єму клітини [70]. При всіх цих процесах плазматична мембрана сперматозоїдів є основною структурою, що зазнає незворотних змін, через зміни в ліпідно-білкових комплексах під час заморожування і розморожування [99]. Це призводить до того, що плазмолема сперматозоїдів стає більш жорсткою і крихкою через перехід від рідкого до гелевого стану, в результаті чого збільшується проникність плазмолем. Осмотичні зміни можуть спричинити пошкодження структури ліпідних мембран, що призводить до конформаційних змін білків водних каналів та витоку іонів і, як наслідок, до морфологічних змін сперматозоїдів та дезінтеграції акросом [100]. Осмотичний стрес також сприяє виникненню порушень клітин, пов'язаних з оксидативними процесами [101]. Припускають, що зміни текучості мітохондріальної мембрани, які відбуваються під час кріоконсервування, підвищують мембранний потенціал та індуюють вивільнення активних форм кисню [102].

Кріоконсервування також викликає пошкодження білків цитоскелету, таких як актин та віментин. Трансмісійна електронна мікроскопія сперматозоїдів після розморожування показала, що через порушення або деполімеризацію білків цитоскелету, збільшується утворення складок плазмолем, виникає субакросомальний набряк, втрата акросомного вмісту і поява везикул, збільшення кількості дефектів головок і хвостів сперматозоїдів [103].

Під час кріоконсервування негативного впливу зазнає і ядро сперматозоїдів, зокрема ДНК, нуклеопротейни (протаміни у випадку цапів) та

їх взаємодія між собою. Взаємодія через дисульфідні містки між цистеїновими радикалами протамінів, які складають основу хроматину сперматозоїдів, порушується після заморожування–розморожування [104], це призводить до виникнення розривів ланцюга ДНК та втрати цілісності молекули ДНК [105].

Вважається, що експресія генів і білків, стабільність РНК та епігенетичний стан сперматозоїдів змінюються під час процесу заморожування–розморожування [106]. Кріоконсервування може впливати на експресію ключових генів, пов'язаних з метаболічною активністю клітин, нормальним функціонуванням та репродуктивним потенціалом. Так, наприклад, зміни в експресії білків у сперматозоїдах кнурів після розморожування були підтверджені відмінностями в експресії 41 білка [107].

Не всі еякуляти мають однакову стійкість до кріоконсервування (тобто кріорезистентність), а навпаки, існує значна варіабельність між еякулятами [108–110]. Це може бути обумовлено багатьма факторами, які важливо досліджувати, щоб досягти найвищої ефективності кріоконсервування.

Одним з факторів, що може впливати на кріотолерантність сперматозоїдів є його навколишнє середовище, тобто сім'яна плазма. Склад сім'яної плазми впливає на сперматозоїди, підвищуючи здатність цих гамет витримувати кріоконсервування [111]. Відносний вміст білків сім'яної рідини відрізняється у різних особин і пов'язаний з кріотолерантністю сперматозоїдів. Так, наприклад, виділяють суперродину білків, які зв'язуються з сперматозоїдами [112], це відносно невеликі кислі білки, виявлені у багатьох ссавців, включаючи биків, жеребців, баранів, кнурів, бугаїв, людей, щурів, мишей і кроликів [113]. Вони зв'язуються із зовнішньою оболонкою сперматозоїдів під час еякуляції відіграють важливу роль як медіатори здатності сперматозоїдів до капацитації та взаємодії з яйцеклітинами [114]. В той же час, вони беруть участь у захисті сперматозоїдів під час кріоконсервування шляхом зв'язування з ліпопротеїнами яєчного жовтка або молока кріопротекторних середовищ,

тим самим запобігаючи екстракції холестерину і фосфоліпідів з мембрани сперматозоїдів [115]. Іншим прикладом є кластерин – невеликий глікопротеїн, який міститься в сім'яній плазмі та на поверхні сперматозоїдів кількох видів тварин. Зокрема, у бугаїв рівень кластерину обернено корелює з морфологічно нормальними сперматозоїдами, що свідчить про те, що білок вибірково зв'язується з чоловічими гаметами з морфологічними дефектами [116]. Нещодавно було виявлено його високу експресію в зразках сперми биків з високою здатністю до заморожування, тому припускається, що цей білок може діяти подібно до малих білків теплового шоку під час процесу кріоконсервування, зв'язуючи неправильно згорнені білки і блокуючи їх агрегацію, що може бути особливо важливим для запобігання окислення ДНК [117] і подальшого пошкодження сперматозоїдів.

Подібним чином була описана кріопротекторна дія амінокислот сім'яної рідини [118]. Припускають, що вони можуть зв'язувати фосфоліпідні мембранні бішари і стабілізувати клітинні мембрани [119]. Крім того, повідомляють про осморегуляторні та антиоксидантні властивості амінокислот, що дозволяє забезпечувати стійкість сперматозоїдів до кріопошкодження [120]. У дослідженнях на тваринах показано, що додавання до розчинів кріопротекторних середовищ глутаміну, гліцину та цистеїну покращувало цілісність акросом та мембран сперматозоїдів бугаїв [121]. Крім того, була виявлена позитивна кореляція між цілісністю мембрани та концентрацією валіну, ізолейцину, лейцину та лізину [122].

Рівень експресії генів деяких білків сперматозоїдів може вказувати на їх кріорезистентність. Так, наприклад, були описані два білки теплового шоку, HSP 90AA1 та HSPA8, концентрація яких корелює зі стійкістю сперматозоїдів до заморожування–відігріву [123]. Аналогічно, білки аквапорини (AQP) модулюють проникність плазматичної мембрани для води та проникних кріопротекторів під час кріоконсервування [124]. Досліджено, що білки аквапорини AQP3, AQP7, AQP9 і AQP11 пов'язані з кріотолерантністю сперми свиней і великої рогатої худоби [125–127]. Іншим

можливим маркером кріотолерантності сперматозоїдів, описаним для свиней, є потенціалзалежний аніонний канал 2 (VDAC2), білок, що утворює пори в мітохондріальній мембрані, який сприяє транспортуванню іонів [128].

Усі вищезгадані параметри можуть варіювати залежно від сезону отримання сперми [129–133], генетичних особливостей породи, раціону харчування тварин [97]. Дослідження сезонних змін та міжпородної варіабельності кріотолерантності сперматозоїдів може дозволити виявити розбіжності, корегування яких допоможе модифікувати протоколи кріоконсервування задля досягнення найбільшої ефективності цього процесу.

## **РОЗДІЛ 2**

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

#### **2.1. Загальні положення**

Дисертаційні дослідження виконані у відділі кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України (м. Харків) та на базі ТОВ «Інститут Сучасних Ветеринарних Технологій» (с. Черевки, Київська область). Дисертаційна робота була виконана в рамках науково–дослідних тем №2.2.6.108 «Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів» (Державний реєстраційний номер – 0116U003498), №2.2.6.128 «Обґрунтування диференційованого підходу до кріоконсервування репродуктивних клітин з урахуванням їх вихідного стану та видоспецифічності» (Державний реєстраційний номер – 0120U100546) та №2.2.6.130 «Вплив кріоконсервування на стан фрагментації ДНК сперматогенних клітин різних стадій диференціювання» Державний реєстраційний номер – 0120U100378).

#### **2.2. Біоетичні аспекти дослідження**

Усі маніпуляції з тваринами та їх біологічним матеріалом були дозволені комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (протокол №1 від 28.01.2020) та узгоджені з основними положеннями Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447–IV від 21.02.2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1986).

### 2.3. Загальна схема дослідження

Дослідження було виконане за наступною схемою:

1. Отримання еякулятів цапів зааненської та альпійської породи протягом парувального та непарувального сезонів.
2. Підбір кріопротекторного середовища та протоколу кріоконсервування з урахуванням сезонних особливостей сперми.
3. Аналіз біохімічного складу сім'яної плазми цапів в різні сезони та його вплив на характеристики сперматозоїдів після кріоконсервування.
4. Аналіз рівня транскриптів гену білка теплового шоку 90 в сперматозоїдах цапів в різні сезони.
5. Проведення аналізу еякулятів: визначення кінетичних, та функціональних характеристик свіжоотриманих та кріоконсервованих сперматозоїдів в різні сезони парування.
6. Визначення здатності свіжоотриманих та кріоконсервованих сперматозоїдів цапів до запліднення в умовах *in vitro* в різні сезони парування.

### 2.4. Характеристика тварин, що були використані в дослідженнях

Усі тварини утримувалися у фермерському господарстві «Тетяна 2011» (с. Черевки, Київська область). Температурний режим в сараях складав від +18 до +20°C.

У дослідженнях використовували еякуляти восьми статевозрілих цапів зааненської породи та п'яти статевозрілих цапів альпійської породи віком від 18 місяців та вагою 65–75 кг. Раціон харчування цапів був однаковий протягом всього року з метою усунення впливу годівлі на характеристики сперми. Кормовий план був складений на основі норми годівлі цапів–плідників у парувальний період [134]

Донорами ооцитів були статевозрілі (віком від 36 місяців) кози зааненської та альпійської порід з доведеною фертильністю, які мали потомство після натурального запліднення. Вага кіз була в межах 55–65 кг.

Реципієнтами ембріонів використовувалися статевозрілі кози місцевої української породи віком від 18 місяців та вагою 45–55 кг.

## 2.5. Отримання еякулятів цапів

Еякуляти цапів отримували, використовуючи штучну вагіну (Рис. 2.1) та козу в еструсі для приваблення, один раз на тиждень, протягом парувального (вересень–грудень) та непарувального (квітень–липень) сезонів.



Рис. 2.1. Штучна вагіна для отримання сперми цапів та баранів.

Загальна кількість еякулятів, що були отримані за весь період дослідження, була 512 від цапів зааненської породи та 320 від цапів альпійської породи.

## 2.6. Аналіз еякуляту цапів

### 2.6.1. Визначення об'єму та концентрації сперматозоїдів

Одразу після отримання сперми, визначали об'єм еякуляту за допомогою градуйованої піпетки Пастера. Концентрацію сперматозоїдів підраховували за допомогою камери Маклера («Sefi medical instrument», Ізраїль, Рис. 2.2). Для цього розводили сперму у 100 разів, щоб візуалізувати кожен окремий сперматозоїд: до 990 мкл фізіологічного розчину (0,9% NaCl, «Юрія-Фарм», Україна) додавали 10 мкл свіжоотриманої сперми. Далі вносили 10 мкл розведеної сперми у камеру Маклера та візуалізували під світловим мікроскопом «AmScope B120C» («AmScope», США) зі збільшенням  $\times 400$ .

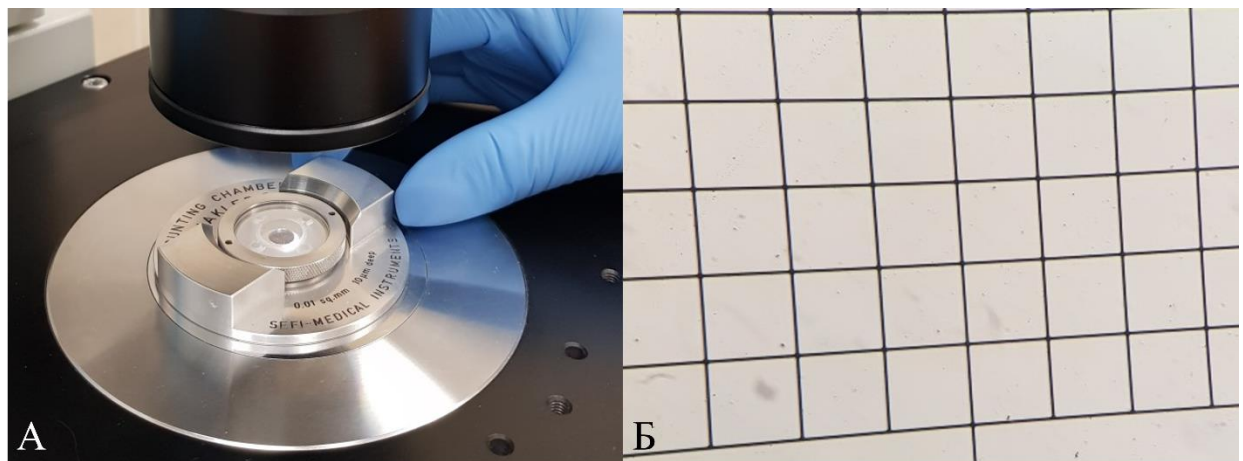


Рис. 2.2. Зовнішній вигляд камери Маклера (А) та вигляд під мікроскоп при збільшенні  $\times 400$  (Б).

### 2.6.2. Визначення рухливості сперматозоїдів

Рухливість сперматозоїдів підраховували за допомогою камери Маклера («Sefi medical instrument», Ізраїль, Рис. 2.2).. Для цього розводили

сперму у 100 разів, щоб візуалізувати кожен окремий сперматозоїд: до 990 мкл фізіологічного розчину (0,9% NaCl, «Юрія–Фарм», Україна) додавали 10 мкл свіжоотриманої сперми. Далі вносили 10 мкл розведеної сперми у камеру, яку розміщували під об'єктивом мікроскопу при збільшенні  $\times 200$ . Підраховували співвідношення кількості рухливих сперматозоїдів до загальної кількості сперматозоїдів. Розраховували дані рухливості сперматозоїдів у відсотках.

### **2.6.3. Аналіз життєздатності сперматозоїдів**

Для визначення життєздатності сперматозоїдів забарвлені еозин-нігрозином «VitalScreen» («FertiPro», Бельгія) мазки сперми аналізували під світловим мікроскопом при збільшенні  $\times 400$ . Для цього розводили сперму у 100 разів, щоб візуалізувати кожен окремий сперматозоїд: до 990 мкл фізіологічного розчину (0,9% NaCl, «Юрія–Фарм», Україна) додавали 10 мкл свіжоотриманої сперми. Далі вносили 50 мкл розведеної сперми у мікробірку і додавали 2 краплини реагенту 1 з набору «VitalScreen» (еозин), обережно перемішували, через 30 с додавали 3 краплини реагенту 2 з набору (нігрозин), обережно перемішували, витримували 30 с. 20 мкл сперми з фарбником наносили на предметне скло, накривали покривним склом та аналізували під мікроскопом при збільшенні  $\times 400$  (Рис. 2.3). Для кожного еякуляту аналізували по 100 сперматозоїдів. Підраховували співвідношення кількості життєздатних сперматозоїдів (незабарвлених) до загальної кількості проаналізованих сперматозоїдів. Виражали життєздатність клітин у відсотках.



Рис. 2.3. Мікрофотографія сперматозоїдів цапів після проведення забарвлення еозин–нігрозином для визначення життєздатності клітин. Живі сперматозоїди мають незабарвлені голівки, а мертва клітина – забарвлена еозином у рожевий колір.

#### 2.6.4. Морфологічний аналіз сперматозоїдів

Для оцінки морфологічних характеристик сперматозоїдів робили мазки еякуляту, які були зафіксовані та забарвлені з використанням набору «Spermac Stain» («FeriPro», Бельгія) за протоколом виробника та візуалізовані під світловим мікроскопом зі збільшенням  $\times 1000$ . Для цього розводили сперму у 100 разів, щоб візуалізувати кожен окремий сперматозоїд: до 990 мкл фізіологічного розчину (0,9% NaCl, «Юрія–Фарм», Україна) додавали 10 мкл свіжоотриманої сперми. Робили мазок сперми на предметному склі, висушували його протягом 5 хв на повітрі. Фіксували мазок, зануривши предметне скло на 5 хв у банку з фіксатором з набору «Spermac Stain». Висушували скло на повітрі, промивали у воді і знову висушували. Поміщали скло у банку з барвником А з набору «Spermac Stain» на 2 хв, промивали водою, далі поміщали у барвник В з набору на 1 хв, промивали водою, переносили скло у барвник С на 1 хв, промивали водою, висушували на повітрі та мікроскопіювали при збільшення  $\times 1000$ , використовуючи

імерсійну олію (Рис. 2.4.). Для кожного еякуляту аналізували по 100 сперматозоїдів, з яких вираховували кількість нормальних сперматозоїдів та клітин з патологічною будовою голівки, шийки і хвостика.

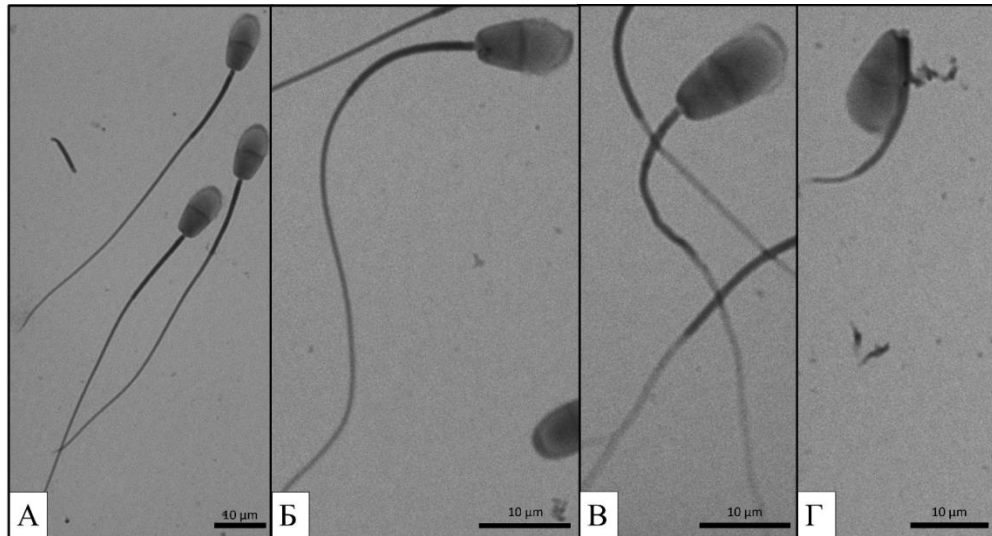
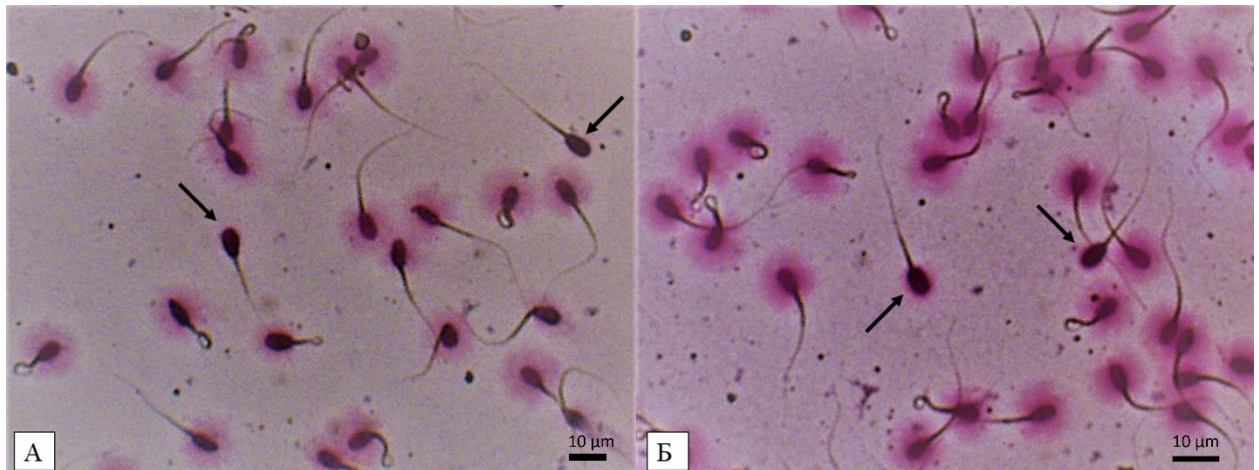


Рис. 2.4. Мікрофотографії сперматозоїдів цапів: А – з нормальними морфологічними характеристиками, Б – з деформацією голівки, В – з дефектом шийки та відшаруванням акросомальної мембрани, Г – з вкороченням хвоста та аномалією шийки.

#### 2.6.5. Визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів

Визначення рівня фрагментації ДНК проводили з використанням набору «Halosperm» («Halotech», Іспанія) за протоколом, зазначеним виробником. Принцип визначення зазначеного показника базується на методі SCD (sperm chromatin dispersion) – визначенні дисперсії хроматину сперматозоїдів. Сперматозоїди іммобілізували в агарозному гелі на предметному скельці, після чого обробляли розчином кислоти для денатурації ДНК, а потім – буфером для лізису мембран та білків. Далі, після фіксації у розчині етанолу, зразки забарвлювали розчином еозину та тіазину для візуалізації

диспергованих петель ДНК. Сперматозоїди з фрагментованою ДНК мали дуже малі або зовсім відсутні ореоли дисперсії, тоді, як сперматозоїди з низьким рівнем фрагментації вивільняють петлі ДНК, які утворюють великі ореоли – «хало». Препарати візуалізували під світловим мікроскопом «AmScope B120C» (AmScope, США) при збільшенні  $\times 400$  (Рис.2.5).



2.5. Мікрофотографії сперматозоїдів цапів після проведення дослідження для визначення рівня фрагментації ДНК методом SCD у парувальний (А) та непарувальний (Б) сезони. Стрілками позначені сперматозоїди з фрагментованою ДНК.

Для кожного еякуляту аналізували по 100 сперматозоїдів. Підраховували відношення кількості сперматозоїдів з пошкодженою ДНК до загальної кількості сперматозоїдів. Рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів виражали у відсотках.

## 2.7. Визначення здатності сперматозоїдів до запліднення

### 2.7.1. Отримання ооцитів кіз

Ооцити кіз–донорів отримували шляхом аспірації фолікулів яєчників, після забою тварин з причин, які не стосуються захворювань репродуктивної

системи. Забій тварин у фермерському господарстві «Тетяна 2011» проводився один раз на місяць. Загалом було отримано 128 яєчників від кіз зааненської породи (з них 64 – у парувальний сезон та 64 – у непарувальний сезон) та 64 яєчники від кіз альпійської породи (з них 32 у парувальний сезон та 32 – у непарувальний сезон). Аспірацію фолікулярної рідини проводили за допомогою шприца об'ємом 20 мл та голки 18G. Отриману фолікулярну рідину переносили у чашки Петрі та аналізували під стереомікроскопом (AmScore, Сполучені Штати Америки). Вилучені з фолікулярної рідини незрілі ооцит–кумулюсні комплекси промивали 3 рази у промивочному середовищі «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство). Усі ооцит–кумулюсні комплекси збирали разом, а потім розподіляли випадковим чином на групи по 10–12 комплексів з метою усунення можливих індивідуальних особливостей тварин.

### 2.7.2. Дозрівання *in vitro* ооцитів кіз

За 2–4 год до аспірації фолікулів яєчників готували середовище для дозрівання ооцитів. Для цього використовували чотирилункові чашки («Thermo Scientific Nunc», Сполучені Штати Америки), кожен лунку заповнювали 500 мкл середовища для дозрівання ооцитів «BO–IVM» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) та поміщали в CO<sub>2</sub> інкубатор за температури 38,5 °C, 6% CO<sub>2</sub> та атмосферному кисні для врівноваження середовища. Одна лунка використовувалася для групи 10–12 ооцит–кумулюсних комплексів.

Незрілі ооцит–кумулюсні комплекси поміщали у середовище для дозрівання ооцитів «BO–IVM» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство), яке покривали мінеральною олією («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство). Дозрівання проводили в CO<sub>2</sub> інкубаторі за температури 38,8°C, 6,0% CO<sub>2</sub> та атмосферному кисні протягом 22–24 год.

### 2.7.3. Запліднення *in vitro* ооцитів кіз

За 2–4 год до проведення запліднення готували чашки з середовищем для запліднення. Для цього використовували чотирилункові чашки («Thermo Scientific Nunc», Сполучені Штати Америки), кожен лунку заповнювали 500 мкл середовища для запліднення «BO–IVF» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство), яке покривали мінеральною олією («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство). Чашки поміщали в CO<sub>2</sub> інкубатор за температури 38,5 °C, 6% CO<sub>2</sub> та атмосферному кисні для врівноваження середовища. Нагрівали середовище для промивання «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) до 38,5 °C та заповнювали ним лунки чотирилуночних чашок по 500 мкл у кожен лунку.

Зрілі ооцит–кумулюсні комплекси спочатку відмивали від середовища для дозрівання, поміщаючи їх на 20 с у нагріте промивочне середовища, а далі переносили у лунки з середовищем для запліднення. Чашки поміщали в CO<sub>2</sub> інкубатор за температури 38,5 °C, 6% CO<sub>2</sub> та атмосферному кисні.

250 мкл свіжої або кріоконсервованої сперми вносили у пробірку, додавали 1 мл середовища для підготовки сперматозоїдів BO–SemenPrep («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) та центрифугували при 264 g протягом 5 хвилин. Відбирали супернатант, щоб в пробірці залишилося 200 мкл. Рахували концентрацію сперматозоїдів в отриманій суспензії за допомогою камери Маклера («Sefi medical instrument», Ізраїль).

Суспензію сперматозоїдів додавали до ооцит–кумулюсних комплексів, які знаходилися у середовищі для дозрівання, у кількості, щоб кінцева концентрація сперматозоїдів склала 1 млн/мл. Інкубували ооцит–кумулюсні комплекси зі сперматозоїдами протягом 16–18 год за температури 38,5 °C, 6% CO<sub>2</sub> та атмосферному кисні.

#### **2.7.4. Культивування *in vitro* зигот та ембріонів кіз**

В день запліднення готували чашки з середовищем для культивування ембріонів. Для цього у лунках чотирилуночних чашок робили краплини об'ємом 100 мкл середовища для культивування ембріонів BO–IVC («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство), покривали краплини мінеральною олією («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) об'ємом 900 мкл. Чашки поміщали в CO<sub>2</sub> інкубатор за температури 38,5 °C, 6% CO<sub>2</sub> та 6% O<sub>2</sub> на ніч для врівноваження середовища. Нагрівали середовище для промивання «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) до 38,5 °C та заповнювали ним лунки чотирилуночних чашок по 500 мкл у кожен лунку.

Запліднені яйцеклітини переносили з середовища для запліднення у середовище для промивання та піпетували, щоб повністю очистити від кумулюсних клітин. Для цього використовували мікропіпетку «Stripper» («Cooper Surgical», Королівство Данія) та наконечники («Vitromed», Федеративна Республіка Німеччина) з діаметром 300 мкл та 135 мкл. Повністю очищені від кумулюсних клітин зиготи переносили у краплини середовища для культивування ембріонів, та поміщали чашки у CO<sub>2</sub> інкубатор при температурі 38,5 °C, 6% CO<sub>2</sub> та 6% O<sub>2</sub> та інкубували протягом 7 днів.

#### **2.7.5. Визначення частоти розвитку бластоцист кіз**

На 7 добу культивування оцінювали розвиток ембріонів згідно з посібником Міжнародної асоціації ембріотехнологій (IETS) [135] та рахували кількість отриманих бластоцист для кожної групи окремо. Визначали частоту розвитку ембріонів шляхом розрахунку співвідношення кількості отриманих бластоцист до кількості запліднених ооцит–кумулясних комплексів.

### **2.7.6. Трансплантація бластоцист кіз-донорів козам реципієнтам**

Синхронізацію еструсу кіз–реципієнтів проводили за допомогою введення внутрішньовагінальних губок з 45 мг флюгестону «SYNCRO–PART» («Seva», Французька Республіка) на 13 діб. За день до вилучення внутрішньовагінальних губок реципієнти отримували внутрішньо м'язово ін'єкцію гонадотропіну 300 IU «Сергон 500» («Bioveta», Чеська Республіка). Загалом було використано 208 кіз–реципієнтів. Трансплантацію отриманих ембріонів проводили лапаротомічним способом у ріг матки синхронізованих реципієнтів після використання седації 2% ксилазином по 1 мл на тварину. Для уникнення багатоплідної вагітності переносили по 1 ембріону. Ембріон у 30 мкл середовища «BO–IVC» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) набирали до катетера «Tomcat» («Minitube», Федеративна Республіка Німеччина), який був приєднаний до шприца «Transin» («Vitromed», Федеративна Республіка Німеччина) об'ємом 1 мл (Рис. 2.6). Голкою 18G робили отвір у розі матки та вносили кінець катетера у порожнину рога. Обережно випускали ембріон, натискаючи на поршень шприца.



Рис. 2.6. Лапаротомічна трансплантація ембріона кози-донора у ріг матки кози-реципієнта. Ветеринарний лікар виводить ріг матки з брюшної порожнини, робить отвір голкою 18G та вносить кінець катетера з ембріоном; ембріолог натискає поршень шприца, щоб випустити ембріон в порожнину рога.

#### **2.7.7. Діагностика вагітності кіз–реципієнтів та отримання окоту**

Через 50 діб після трансплантації ембріонів проводили абдомінальне ультразвукове дослідження для виявлення вагітності за допомогою ультразвукового апарату KX5200 («Kaixin», Китайська Народна Республіка). Через 5 місяців після трансплантації ембріонів фіксували окіт.

## **2.8. Кріоконсервування сперматозоїдів цапів**

### **2.8.1. Приготування розчинів кріопротекторних середовищ**

Усі розчини кріопротекторних середовищ готували на основі середовища «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство), що має у складі буфер HEPES. Готували 8 варіантів кріопротекторних середовищ, що мали концентрацію кріопротекторів вдвічі більшу за заплановану для експозиції, оскільки в подальшому змішували сперму з кріопротекторним середовищем у співвідношенні 1:1:

1. 10% ГЛ (1,37 моль/л)
2. 20% ГЛ (2,74 моль/л)
3. 10% ГЛ + 40% ЯЖ (400 мл/л)
4. 20% ГЛ + 40% ЯЖ
5. 10% ЕГ (1,79 моль/л)
6. 20% ЕГ (3,58 моль/л)
7. 10% ЕГ + 40% ЯЖ
8. 20% ЕГ + 40% ЯЖ

### **2.8.2. Визначення впливу розчинів кріопротекторних середовищ на рухливість та життєздатність сперматозоїдів**

Свіжий нативний еякулят та фракцію виділених з еякуляту сперматозоїдів об'ємом 50 мкл розріджували промивочним середовищем «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство), щоб отримати концентрацію сперматозоїдів 200 млн/мл. До 100 мкл отриманої суспензії додавали 100 мкл кожного з розчинів кріопротекторних середовищ, описаних

в пункті 2.8.1. В якості контролю слугував зразок, до якого додавали 100 мкл промивочного середовища «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство). Визначали рухливість та життєздатність, як описано в пунктах 2.6.2 та 2.6.3, відповідно, одразу після додавання кріопротекторного середовища та через 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв експозиції при кімнатній температурі (20–22 °C). Цитотоксичність розчинів кріопротекторів визначали за зменшенням рухливості та життєздатності сперматозоїдів.

### **2.8.3. Заморожування зразків**

Під час експозиції сперматозоїдів з обраним кріопротекторним середовищем переносили суспензію у кріосоломинки об'ємом 0,25 мл («Minitube», Федеративна Республіка Німеччина), після чого охолоджували в холодильній камері протягом 2 год при +5 °C, протягом 15 хв у парах азоту на відстані 4 см від його дзеркала, після чого занурювали кріосоломинки у рідкий азот та переносили їх у кріосховище.

### **2.8.4. Відігрів зразків та видалення кріопротекторного середовища**

Відігрівали зразки на водяній бані при температурі +37 °C протягом 30 с. Видаляли кріопротектор шляхом центрифугування. Для цього вміст кріосоломинки вносили у пробірку з 1 мл промивочного середовища «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) та центрифугували 10 хв при 264g. Видаляли супернатант та додавали до преципітату свіже середовище «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) об'ємом 1 мл та

центрифугували 5 хв при 264g. Видаляли супернатант та додавали до преципітату свіже середовище «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство), щоб отримати об'єм 250 мкл.

## **2.9. Біохімічний аналіз сім'яної плазми цапів**

### **2.9.1. Виділення сім'яної плазми з цільного еякуляту**

Свіжоотриманий цільний еякулят центрифугували 10 хв при 264g. Відбирали супернатант (сім'яну плазму) так, щоб не торкатися преципітату (сперматозоїдів). Переносили супернатант в нову пробірку для подальшого аналізу.

### **2.9.2. Проведення біохімічного аналізу на полуавтоматичному та автоматичному аналізаторах**

Визначали вміст загального білку, фруктози та холестерину у сім'яній рідині за допомогою аналізатора «Humalyzer Primus» («Human», Федеративна Республіка Німеччина) на наборів реагентів Cormay (Республіка Польща), за протоколом виробника. Для цього кювети попередньо відкаліброваного приладу заповнювали 400 мкл сім'яної плазми та послідовно визначали зазначені біохімічні параметри.

Вміст альбуміну, глобуліну, іонізованого кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) та глюкози у сім'яній рідині визначали, використовуючи аналізатор «Exigo C200» («Boule», Королівство Швеція) та готові до використання диски з реагентами, які внесені виробником («Boule», Королівство Швеція). Для цього 100 мкл

сім'яної плазми поміщали у лунку диску (Рис. 2.7), поміщали диск в аналізатор та отримували друкований результат через 12 хв.

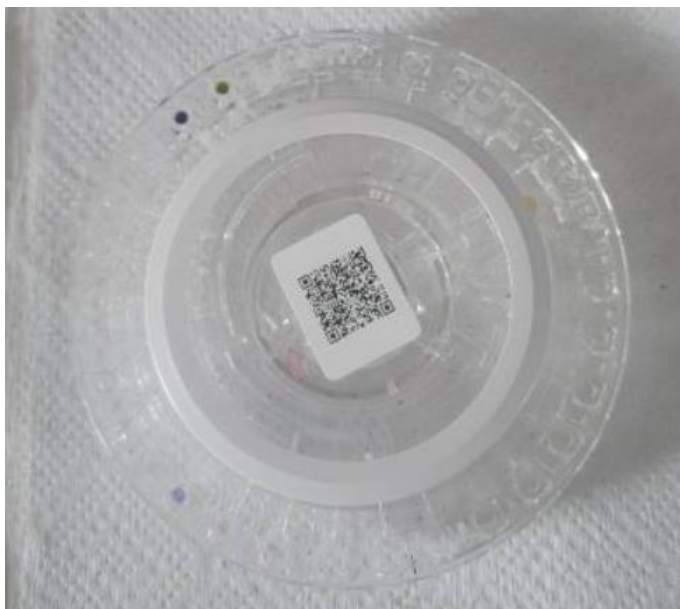


Рис. 2.7. Диск для аналізатора «Exigo C200» («Boule», Королівство Швеція), який попередньо заповнений реагентами для біохімічного аналізу.

## **2.10. Визначення рівня транскриптів гену білка теплового шоку у сперматозоїдах цапів**

### **2.10.1. Підбір праймерів для генів**

Для дослідження був обраний ген білка теплового шоку 90 (HSP 90), референтним геном слугував ген бета-актину. Підбір праймерів (табл. 2.1) та перевірку їхньої специфічності проводили за допомогою програми Primer-BLAST сервісу NCBI National Center for Biotechnology Information [136]. Синтез праймерів був проведений у ТОВ «Експлоджен» (Україна).

Таблиця 2.1.

Перелік досліджуваних генів, їх ідентифікаційний номер в GenBank, пряма та зворотна послідовність праймерів та розмір продукту

| Ген        | Ідентифікаційний номер в GenBank | Послідовність праймеру (5' – 3')                    | Розмір продукту (bp) |
|------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------|
| beta-actin | XM_018039831.1                   | П: CACCGCAAATGCTTCTAGGC<br>З: CGTTTTCTGCGCAAGTTAGGT | 78                   |
| HSP 90     | XM_018066239.1                   | П: AAACTCGTCAGACGCCCTG<br>З: GGTTCGATCTTGCTTGTTCGG  | 115                  |

Примітка: П – прямий праймер, З – зворотній праймер.

### 2.10.2. Виділення з еякуляту фракції сперматозоїдів

Фракцію сперматозоїдів виділяли з цільного еякуляту шляхом центрифугування у градієнті щільності «Sill-select stock» («FertiPro», Королівство Бельгія). Для цього на 1 мл градієнту концентрації нашаровували до 500 мкл еякуляту та центрифугували 10 хв при 264g. Відбирали супернатант, додавали 1 мл відмивального середовища «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство) та центрифугували 5 хв при 264g. Відбирали супернатант та доводили об'єм до 500 мкл промивочним середовищем «Wash» («IVF Bioscience», Об'єднане Королівство).

### 2.10.3. Екстракція РНК зі сперматозоїдів

Екстракцію РНК проводили за допомогою набору NucleoSpin RNA mini kit (Macherey–Nagel, Федеративна Республіка Німеччина) за інструкцією

виробника. Перевіряли концентрацію виділеної РНК шляхом вимірювання на спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

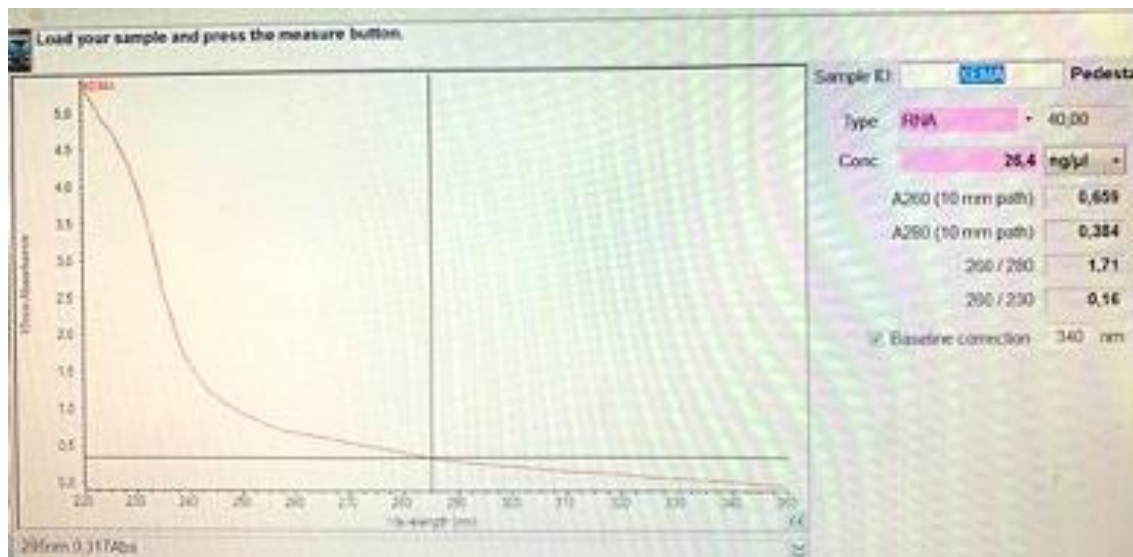


Рис. 2.8. Інтерфейс програмного забезпечення спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США) під час вимірювання концентрації виділеної зі сперматозоїдів РНК.

#### 2.10.4. Синтез комплементарної ДНК

Проводили синтез комплементарної ДНК, використовуючи набір High Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США) за інструкцією виробника.

#### 2.10.5. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (rtPCR)

Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили на апараті «QuantStudio 5 Real-Time PCR System» («Thermo Fisher Scientific», США). Для проведення реакції використовували набір «Absolute QPCR

SYBRGreen Mix» («Thermo Fisher Scientific», США) та пари праймерів, специфічних для кожного гена.

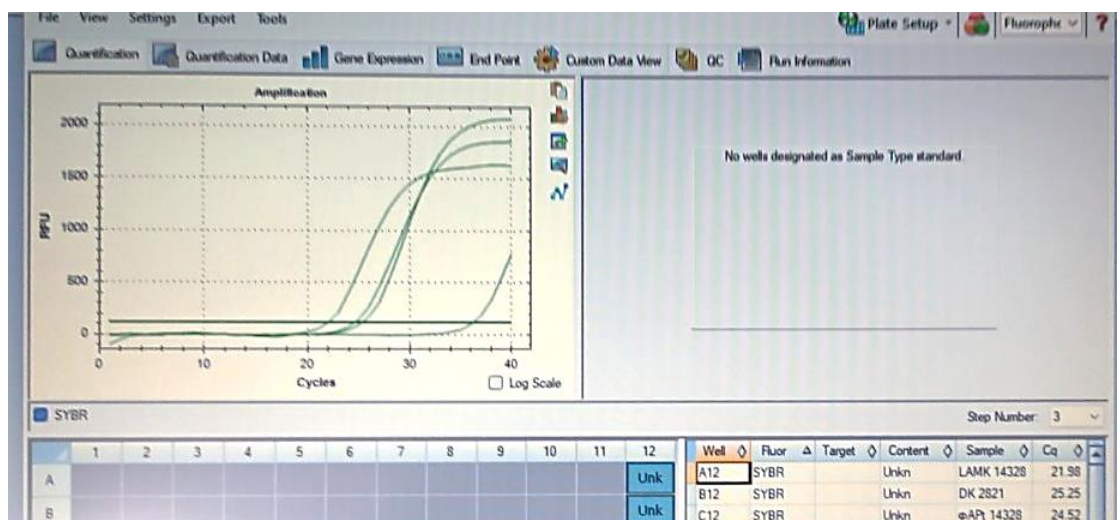


Рис. 2.9. Інтерфейс програмного забезпечення апарату для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі «QuantStudio 5 Real-Time PCR System» («Thermo Fisher Scientific», США).

## 2.11. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми Graph Pad Prism (GraphPad Software, США). Нормальність розподілу даних оцінювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Значущість відмінностей показників визначали за допомогою t-критерію Стюдента з поправкою Бонфероні при множинному порівнянні або точного критерію Фішера (для частоти настання вагітності та окоту). Різницю вважали значущою при  $p < 0,05$ . Для визначення кореляційного зв'язку розраховували коефіцієнт кореляції Пірсона.

### РОЗДІЛ 3

## КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЦАПІВ ЗААНЕНСЬКОЇ ТА АЛЬПІЙСЬКОЇ ПОРІД В РІЗНІ СЕЗОНИ ПАРУВАННЯ

Для визначення сезонної варіабельності кріорезистентності репродуктивних клітин самців зааненської та альпійської порід кіз необхідно було розробити кріопротекторне середовище, оскільки на сьогодні не описано кріопротекторного середовища для сперматозоїдів цапів, а здебільшого використовують середовища, які були розроблені для кріоконсервування статевих клітин бугаїв. Для цього ми підбирали кріопротектори та їх оптимальну концентрацію, а також час експозиції з ними з урахуванням впливу сезону парування.

Для цього треба було визначити маркер кріорезистентності сперматозоїдів, який був би сезоннозалежним та одночасно характеризував запліднювальну здатність сперматозоїдів.

Були обрані наступні сперміологічні характеристики еякуляту: об'єм сперми та концентрація сперматозоїдів у мл еякуляту (рис.3.1), як стандартні критерії оцінки еякуляту [137], на які не може впливати кріоконсервування, проте які є важливими при визначенні кількості доз, які можна кріоконсервувати; рухливість та життєздатність – характеристики, що відіграють головну роль під час руху сперматозоїдів через статеві органи самки на шляху до яйцеклітини; рівень морфологічно нормальних сперматозоїдів та рівень фрагментації ДНК – критерії, які мають важливе значення безпосередньо для запліднення, оскільки можуть опосередковано вказувати на стан геному сперматозоїдів, що є визначальним для запліднення [138] та подальшого нормального розвитку ембріонів [139, 140].

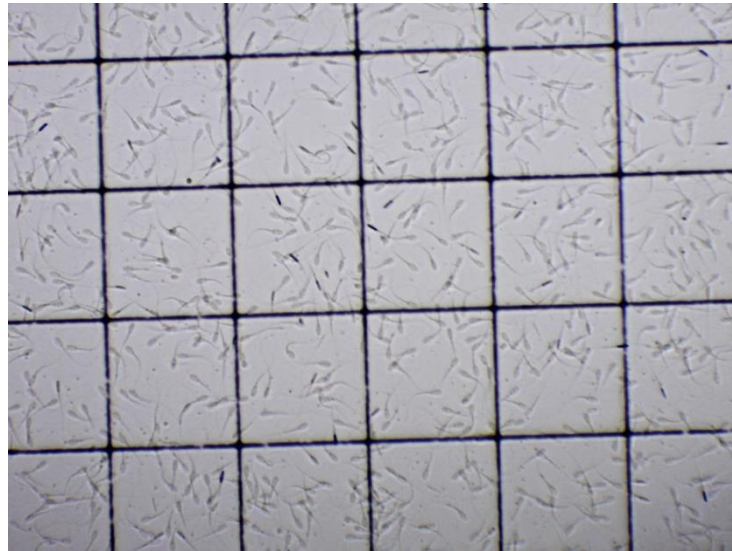


Рис. 3.1. Мікрофотографія сперматозоїдів цапів у камері Маклера для підрахунку їх концентрації у мл еякуляту.

Після проведення аналізу еякулятів зааненської та альпійської порід цапів у парувальний сезон (табл. 3.1) виявлено, що цапи альпійської породи мають значуще ( $p < 0,05$ ) вищий об'єм еякуляту, концентрацію сперматозоїдів у мл сперми, їх рухливість та життєздатність.

Таблиця 3.1

Характеристики еякулятів цапів зааненської та альпійської породи у парувальний сезон

| Характеристики                                        | Порода цапів          |                       |
|-------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                                       | Зааненська<br>(n=313) | Альпійська<br>(n=198) |
| Об'єм сперми (мкл)                                    | 850±375               | 1575±275*             |
| Концентрація сперматозоїдів<br>(*10 <sup>9</sup> /мл) | 1,9±0,5               | 3,2±0,2*              |
| Рухливість сперматозоїдів (%)                         | 80,4±4,1              | 91,1±3,1*             |
| Життєздатність сперматозоїдів (%)                     | 88,3±2,9              | 95,9±3,9*             |

Примітка: \* – різниця значуща порівняно з відповідними характеристиками еякуляту цапів зааненської породи,  $p < 0,05$

Дослідивши параметри еякулятів цапів обох порід в непарувальний сезон (табл. 3.2), виявили, що у цапів альпійської породи були значуще ( $p<0,05$ ) більші об'єм еякуляту, концентрація сперматозоїдів у мл сперми, їх рухливість та життєздатність.

Таблиця 3.2

Характеристики еякулятів цапів зааненської та альпійської породи у непарувальний сезон

| Характеристики                                     | Порода цапів          |                       |
|----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                                    | Зааненська<br>(n=199) | Альпійська<br>(n=122) |
| Об'єм сперми (мкл)                                 | 560±195               | 1065±235*             |
| Концентрація сперматозоїдів (*10 <sup>9</sup> /мл) | 1,6±0,4               | 2,8±0,3*              |
| Рухливість сперматозоїдів (%)                      | 55,2±3,7              | 67,8±3,3*             |
| Життєздатність сперматозоїдів (%)                  | 67,8±4,1              | 80,2±4,8*             |

Примітка: \* – різниця значуща порівняно з відповідними характеристиками еякуляту цапів зааненської породи,  $p<0,05$

Морфологічні характеристики та цілісність ДНК сперматозоїдів є прогностичним критерієм їх запліднюючої здатності та розвитку ембріонів. Тому метою наступної серії експериментів було визначення впливу сезонності та специфічності породи на кількість сперматозоїдів з нормальною морфологією та рівень фрагментації їх ДНК.

Аналіз препаратів дозволив встановити відсутність різниці ( $p\geq 0,05$ ) у кількості сперматозоїдів з нормальною морфологічною структурою цапів різних порід (рис. 3.2). Виявлено значуще ( $p<0,05$ ) зниження кількості сперматозоїдів з нормальними морфологічними характеристиками у непарувальний сезон, порівняно з парувальним, для обох порід.

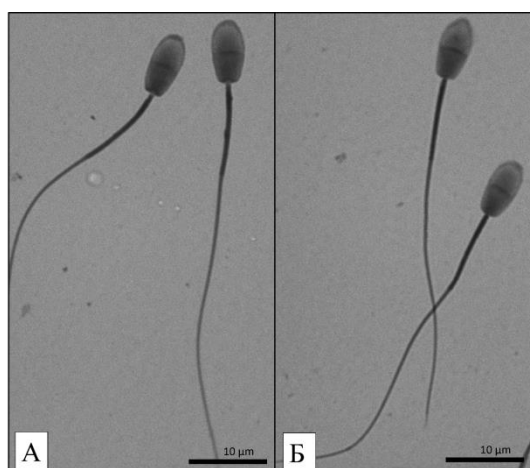


Рис. 3.2. Мікрофотографія сперматозоїдів з нормальною морфологічною структурою цапів зааненської (А) та альпійської (Б) породи.

Ми не виявили значущої ( $p \geq 0,05$ ) різниці у рівні фрагментації ДНК сперматозоїдів цапів порід, що вивчали (рис. 3.3., табл. 3.3).



Рис. 3.3. Мікрофотографія сперматозоїдів цапів після проведення SCD тесту для визначення фрагментації ДНК сперматозоїдів. Стрілками позначені сперматозоїди з фрагментованою ДНК, про що свідчить відсутність «хало».

Також не виявлено значущої ( $p \geq 0,05$ ) різниці у рівні фрагментації ДНК сперматозоїдів цапів у різні сезони розмноження.

Таблиця 3.3

Порівняння кількості морфологічно нормальних сперматозоїдів та рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів цівів зааненської та альпійської породи у парувальний та непарувальний сезони

| Характеристика                                       | Парувальний сезон |            | Непарувальний сезон |            |
|------------------------------------------------------|-------------------|------------|---------------------|------------|
|                                                      | Зааненська        | Альпійська | Зааненська          | Альпійська |
| Кількість морфологічно нормальних сперматозоїдів (%) | 93,4±1,1          | 95,1±0,9   | 87,1±1,9*           | 88,3±2,1#  |
| Рівень фрагментації ДНК (%)                          | 2,8±0,16          | 3,1±0,20   | 3,1±0,23            | 3,5±0,18   |

Примітка: \* – різниця значуща порівняно з відповідним показником сперматозоїдів цівів зааненської породи в парувальний сезон,  $p<0,05$ ; # – різниця значуща порівняно з відповідним показником сперматозоїдів цівів альпійської породи в парувальний сезон,  $p<0,05$

Аналіз вищезазначених сперміологічних характеристик еякулятів цівів дозволив зробити висновок про те, що рухливість та життєздатність сперматозоїдів є тими характеристиками, які мають чітку сезонну залежність та породоспецифічність.

Тому, у подальших дослідженнях для оцінки кріотолерантності, з метою розробки кріопротекторного середовища та протоколу кріоконсервування, використовували характеристики рухливості та життєздатності сперматозоїдів.

Під час приготування кріопротекторних середовищ за основу використовували середовище з HEPES буфером, оскільки раніше було показано, що цвітер-іонні буферні системи дозволяють зберегти кращу рухливість та цілісність акросоми сперматозоїдів ссавців, ніж широко

розповсюджений Tris буфер [76]. В якості проникаючого кріопротектора для сперматозоїдів ссавців найчастіше використовують Гл, ЕГ та диметилсульфоксид (ДМСО) [14], проте суперечки щодо їх цитотоксичності ведуться до сих пір. Локальні накази відомств, які займаються питаннями тваринництва, в деяких країнах забороняють використовувати ДМСО, а нещодавні публікації наголошують, про необхідність його видалення після відігріву зразків, що є неможливим у випадку використання кріоконсервованої сперми для осіменіння тварин на фермах), зменшування концентрації ДМСО (з використанням додаткового кріопротектора), або замінювання його на інший кріопротектор (для повного уникнення ДМСО у кріозахисному розчині) [141]. Тому в нашому дослідженні ми використовували 2 кріопротектори: Гл та ЕГ. Обрані кріопротектори у концентраціях 5% та 10% в кінцевому розчині показують найкращі результати [142–144], тому готували розчини подвійної концентрації, щоб при розбавленні зі спермою у співвідношенні 1:1 отримати розчини з вірними фінальними концентраціями.

Досліджували вплив розчинів кріопротекторів шляхом аналізу рухливості та життєздатності інкубованих при кімнатній температурі (20–22°C) сперматозоїдів протягом 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв.

При аналізі рухливості (рис. 3.4.) клітин у парувальний сезон після експозиції з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом зазначеного часу було виявлено, що досліджувані показники починають значуще зменшуватися порівняно з контролем, починаючи з 40 хв при використанні 5% розчинів обох кріопротекторів та з 30 хв при використанні 10% розчинів обох кріопротекторів.

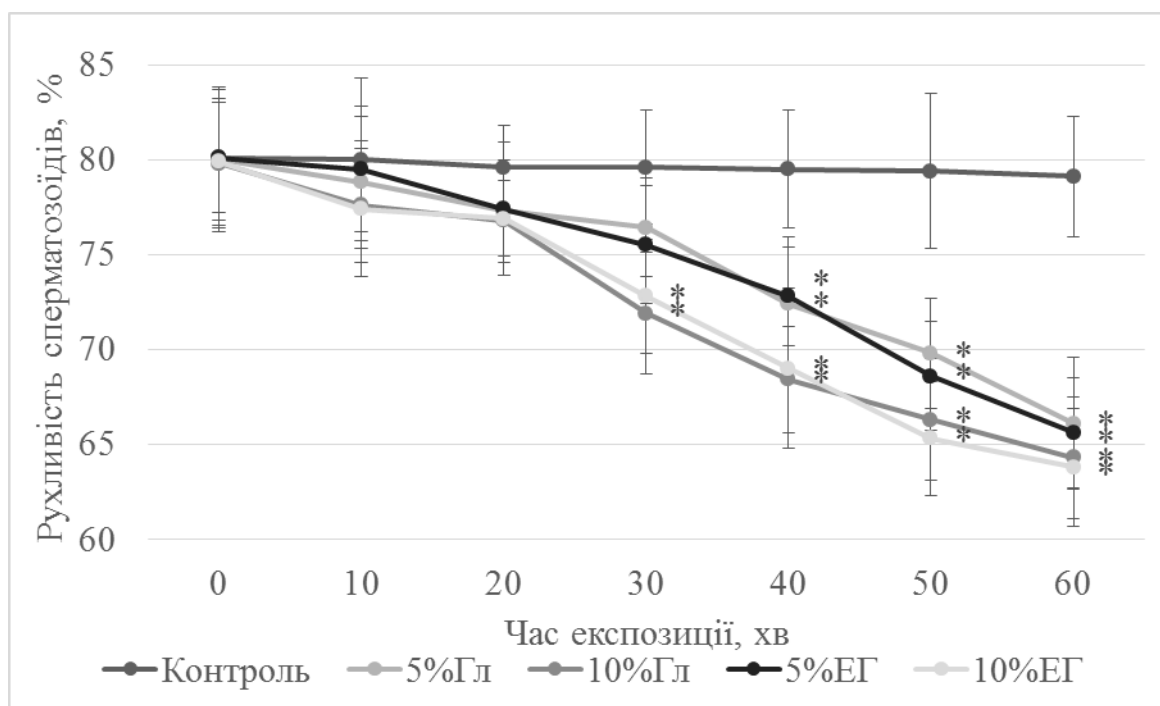


Рис. 3.4. Рухливість сперматозоїдів цапів зааненської породи у парувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв. \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками контролю,  $p < 0,05$ .

Визначення частки життєздатних клітин дозволило встановити, що ця характеристика також починає змінюватися після 40 хв експозиції у 5% розчинах обох кріопротекторів та починаючи з 30 хв при використанні 10% розчинів (рис. 3.5).

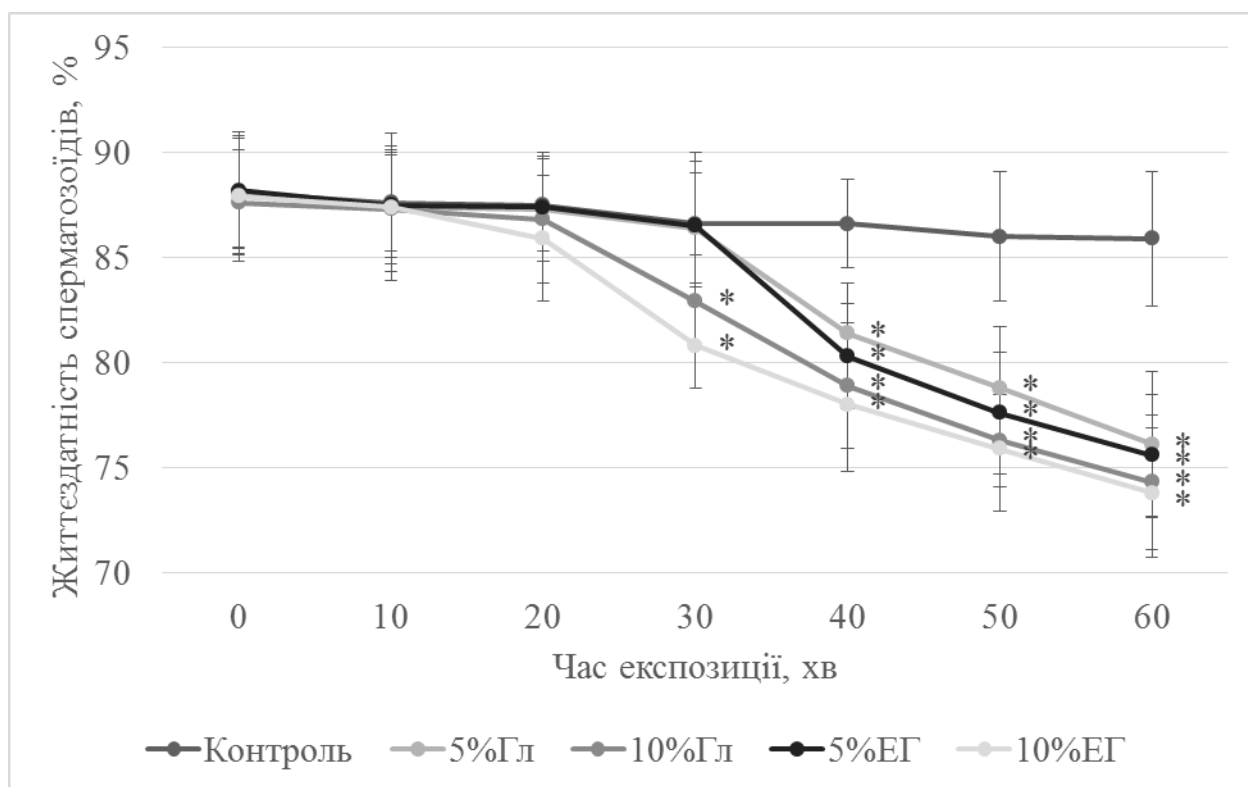


Рис. 3.5. Життєздатність сперматозоїдів цапів зааненської породи у парувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв. \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками контролю,  $p < 0,05$ .

Аналогічні результати щодо рухливості клітин були отримані і цапів альпійської породи в парувальний сезон (рис. 3.6)

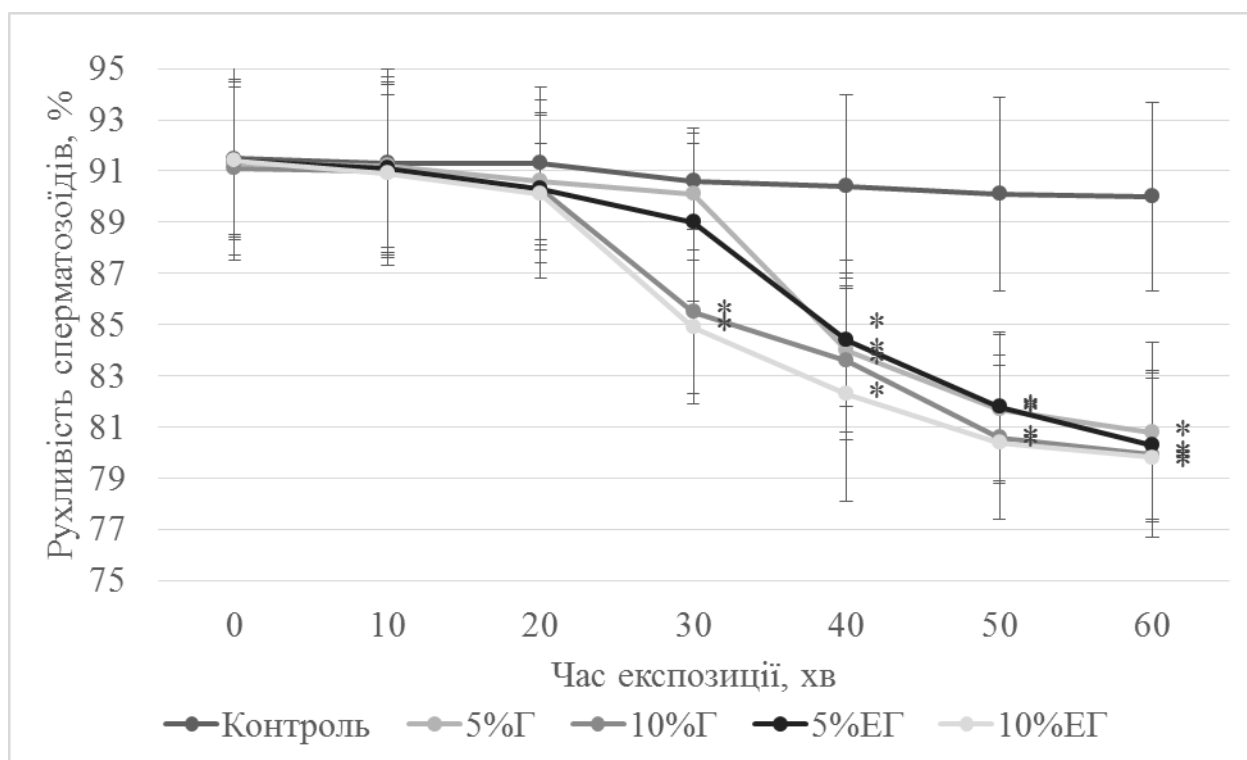


Рис. 3.6 Рухливість сперматозоїдів цапів альпійської породи у парувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв. \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками контролю,  $p < 0,05$

Життєздатність сперматозоїдів цапів цієї породи зазначеного сезону знижувалася через 10 та 20 хв експозиції з кріозахисними розчинами (рис. 3.7)

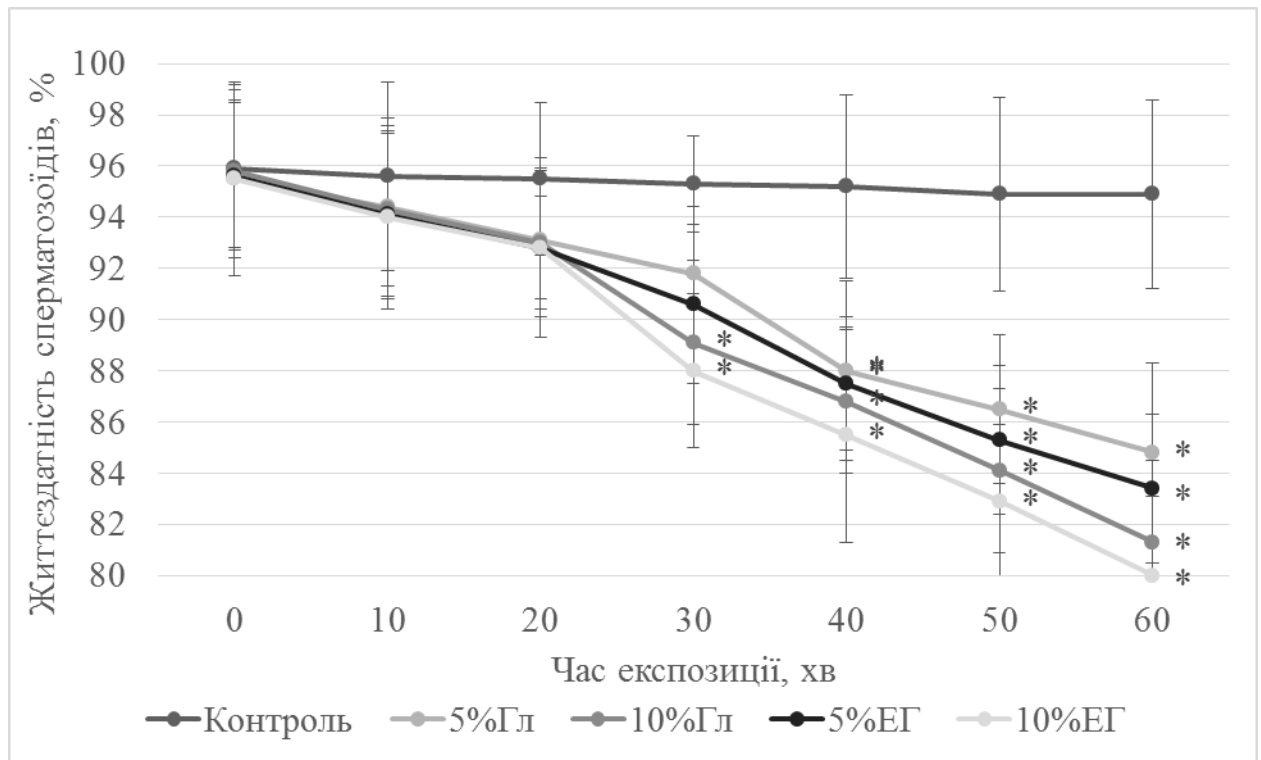


Рис. 3.7. Життєздатність сперматозоїдів цапів альпійської породи у парувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв. \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками контролю,  $p < 0,05$

Визначення впливу розчинів кріопротекторів для сперматозоїдів цапів обох порід у непарувальний сезон дозволило виявити значне падіння показників рухливості сперматозоїдів, порівняно з досліджуваними характеристиками парувального сезону. Так, загальна рухливість сперматозоїдів без додавання розчинів кріопротекторів становила трохи більше 50%, що значущо менше, порівняно з цими характеристиками статевого сезону.

При цьому падіння рухливості гамет у непарувальний сезон (рис. 3.8.) спостерігалось після 30-хв експозиції з 5% розчином Гл, та вже через 20 хв з 10% розчином Гл. Аналогічна картина спостерігалася при використанні ЕГ.

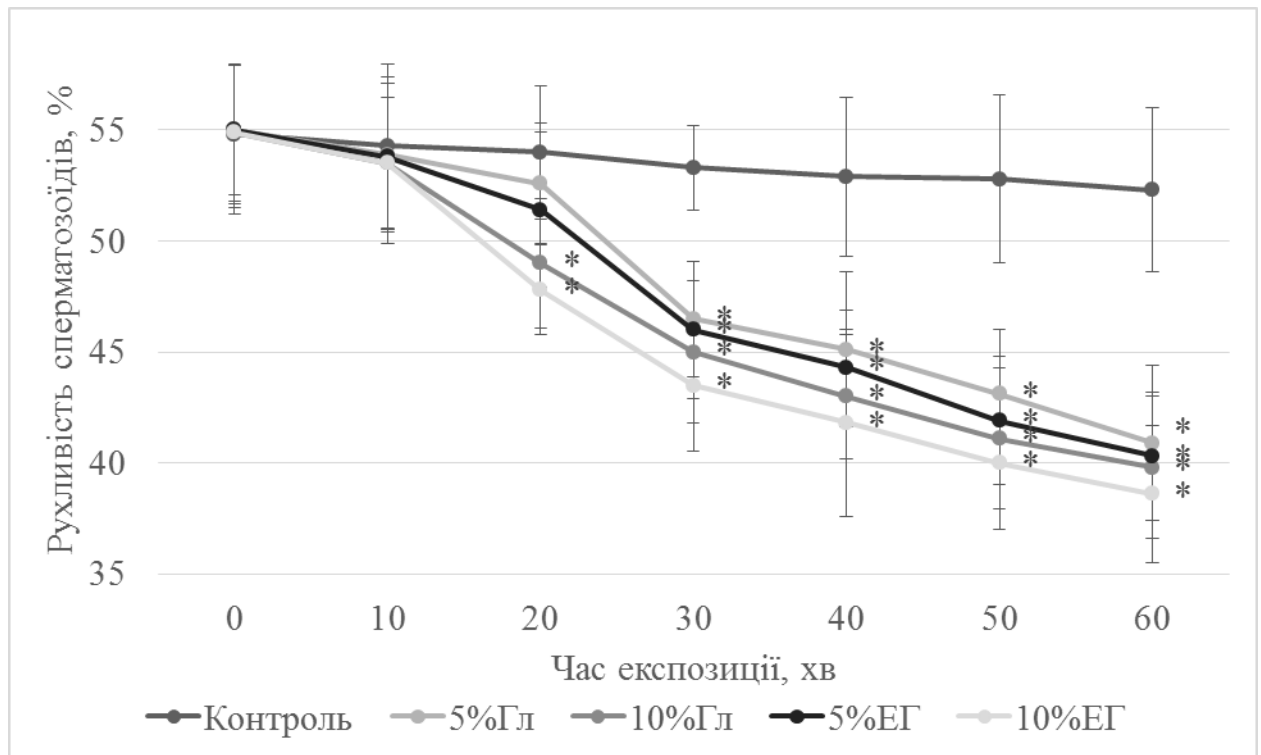


Рис. 3.8. Рухливість сперматозоїдів цапів зааненської породи у непарувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв. \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками контролю,  $p < 0,05$

Життєздатність сперматозоїдів цапів у непарувальний сезон (рис. 3.9.) не перевищувала 70% та знижувалась при спостереженні за цією характеристикою протягом години. Додавання в середовище експозиції розчинів кріопротекторів знижувало їх життєздатність після 30 хв експозиції з 5% розчином Гл та через 20 хв після експозиції з 10% розчином Гл. Аналогічні результати були отримані при використанні ЕГ в якості кріопротектору.

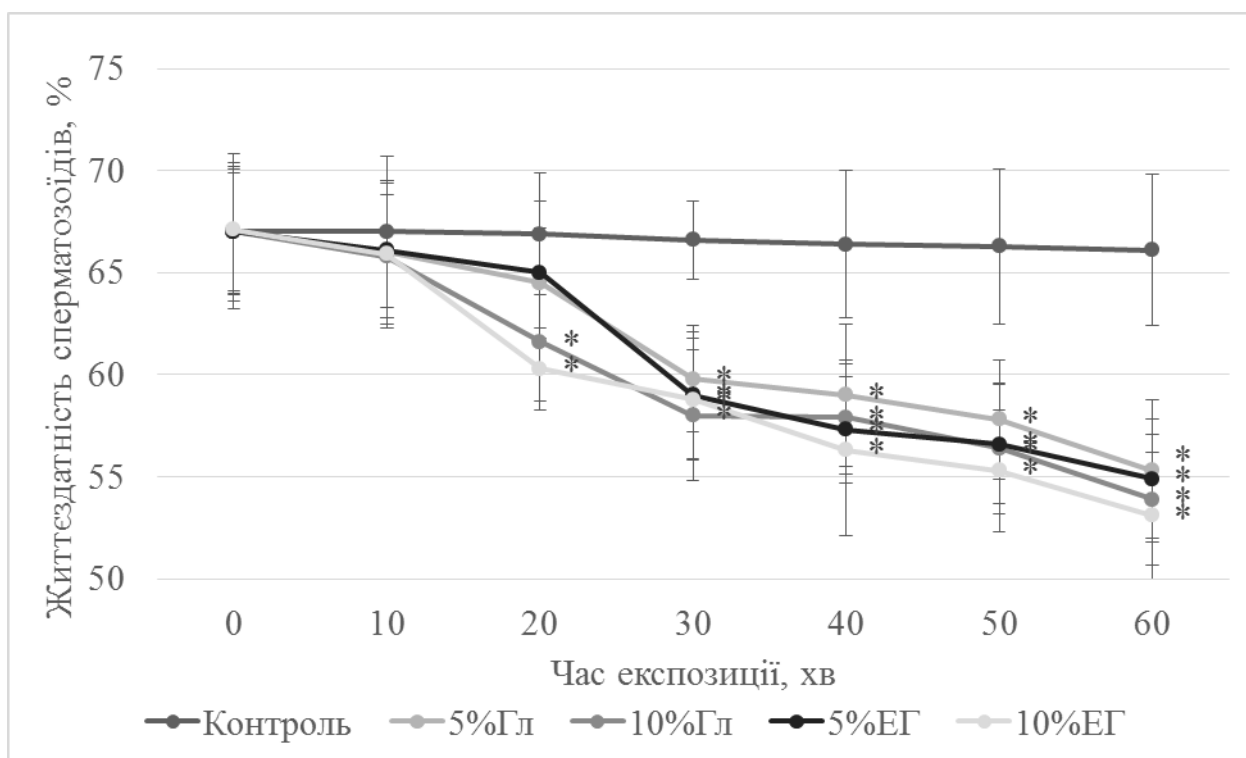


Рис. 3.9. Життєздатність сперматозоїдів цапів зааненської породи у непарувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв. \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками контролю,  $p < 0,05$

Обрані кріопротектори у зазначених концентраціях проявляли негативний вплив щодо сперматозоїдів цапів альпійської породи: контрольні значення рухливості клітин у непарувальний сезон становили не вище 70%. Значуще зниження цього показника спостерігалися на 30 хв експозиції з 5% розчином Гл та ЕГ та на 20 хв з 10% розчином Гл та ЕГ (рис. 3.10).

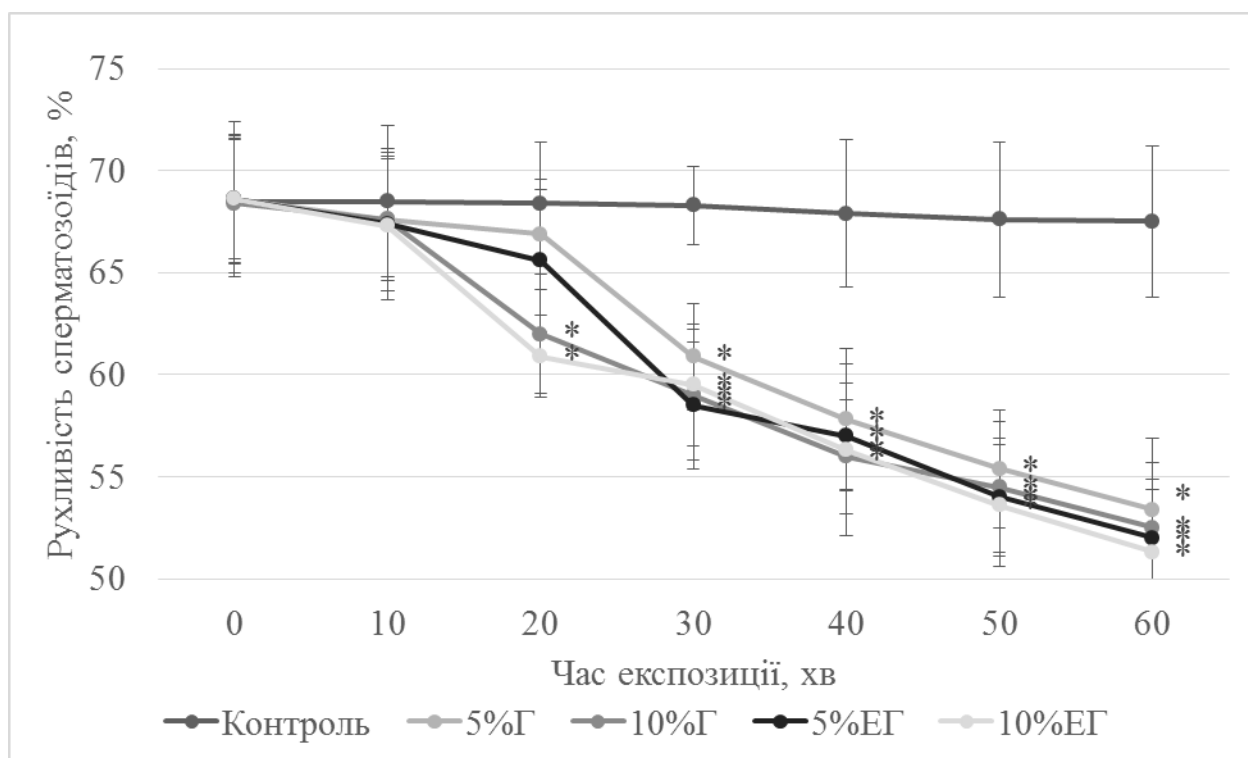


Рис. 3.10. Рухливість сперматозоїдів цапів альпійської породи у непарувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв. \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками контролю,  $p < 0,05$ .

Життєздатність клітин цапів альпійської породи у непарувальний сезон після експозиції з розчинами кріопротекторів (рис. 3.11) починала значуще знижуватися після 30 хв експозиції з 5% Гл та ЕГ та після 20 хв експозиції з цими кріопротекторами концентрацією 10%.

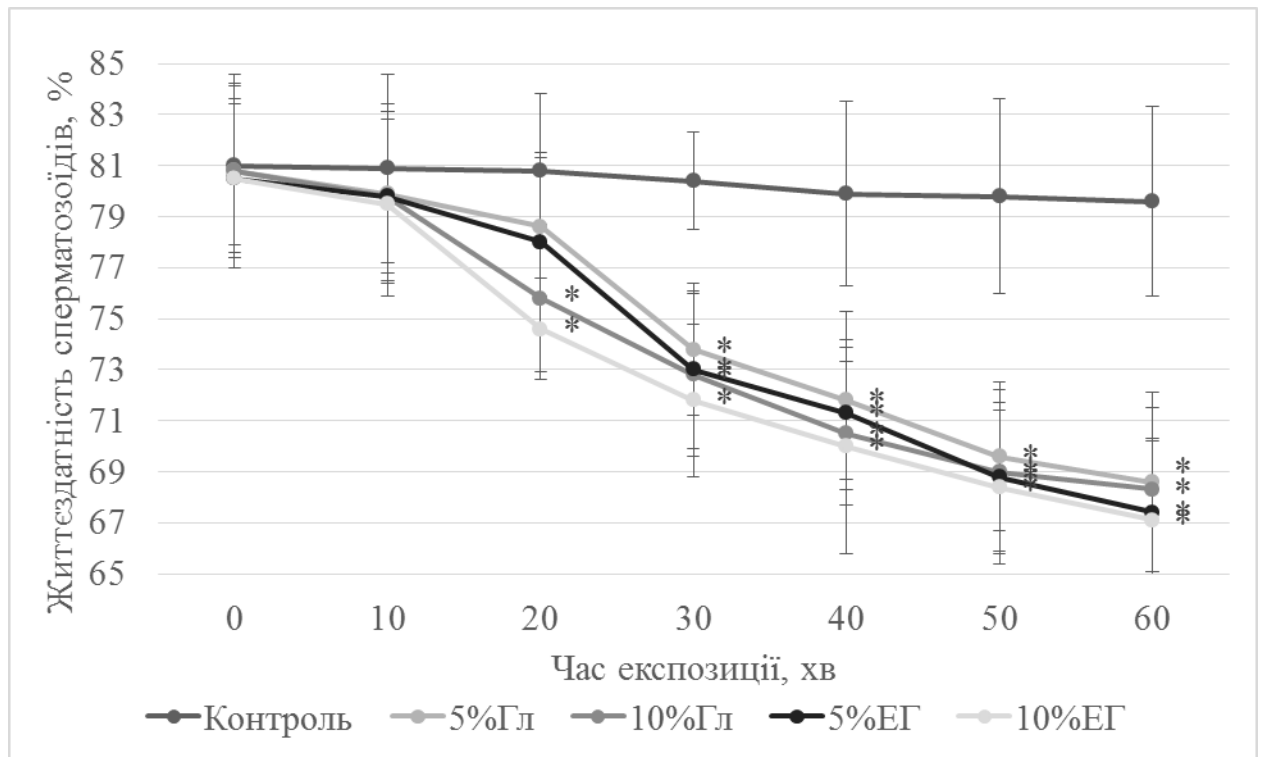


Рис. 3.11. Життєздатність сперматозоїдів цапів альпійської породи у непарувальний сезон після експозиції з кріопротекторними середовищами з 5% і 10% Гл та 5% і 10% ЕГ протягом 0, 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв. \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками Контролю,  $p < 0,05$ .

Опираючись на отримані дані щодо токсичності кріопротекторів, час експозиції сперматозоїдів з ними змінювали залежно від їх концентрації та сезону отримання сперми.

Так, було вирішено проводити експозицію сперматозоїдів в парувальний сезон з 5% Гл та ЕГ протягом 30 хв, а з 10% Гл та ЕГ – 20 хв при кімнатній температурі, а в непарувальний сезон – з 5% Гл та ЕГ протягом 20 хв, а з 10% Гл та ЕГ – 10 хв.

Під час експозиції розбавлену кріопротектором сперму вносили у соломинки та охолоджували протягом 2 год при  $+5^{\circ}\text{C}$ , після чого витримували соломинки на відстані 4 см від дзеркала азоту протягом 15 хв та занурювали у рідкий азот. Протокол охолодження не модифікували, оскільки

більшість дослідників описують однаковий протокол охолодження, який оптимально зберігає функціональну активність сперматозоїдів ссавців [145–147].

Відігрів соломинок зі зразками проводили на водяній при температурі 37 протягом 30 сек, що також є найбільш вживаним методом відігріву для сперматозоїдів тварин [14, 148, 149]. Рухливість та життєздатність сперматозоїдів після відігріву визначали після видалення кріопротекторів, щоб в'язкість середовищ та цитотоксичність кріопротекторів не впливали на кінетичні та функціональні характеристики клітин.

Після кріоконсервування сперматозоїдів цапів зааненської породи у парувальний сезон значуще ( $p < 0,05$ ) знижувалися рухливість та життєздатність клітин (рис. 3.12). Найкраще ці параметри зберігалися при використанні розчину 10% Гл, які, в той же час, незначуще відрізнялися від таких при використанні розчину 5% Гл. Кріоконсервування сперматозоїдів з ЕГ в обох концентраціях не дозволило зберегти рухливість та життєздатність клітин на високому рівні, так, лише близько половини сперматозоїдів, зберігали зазначені характеристики після відігріву. При цьому, після кріоконсервування у 10% розчині Гл 2/3 клітин залишилися рухливими та життєздатними.

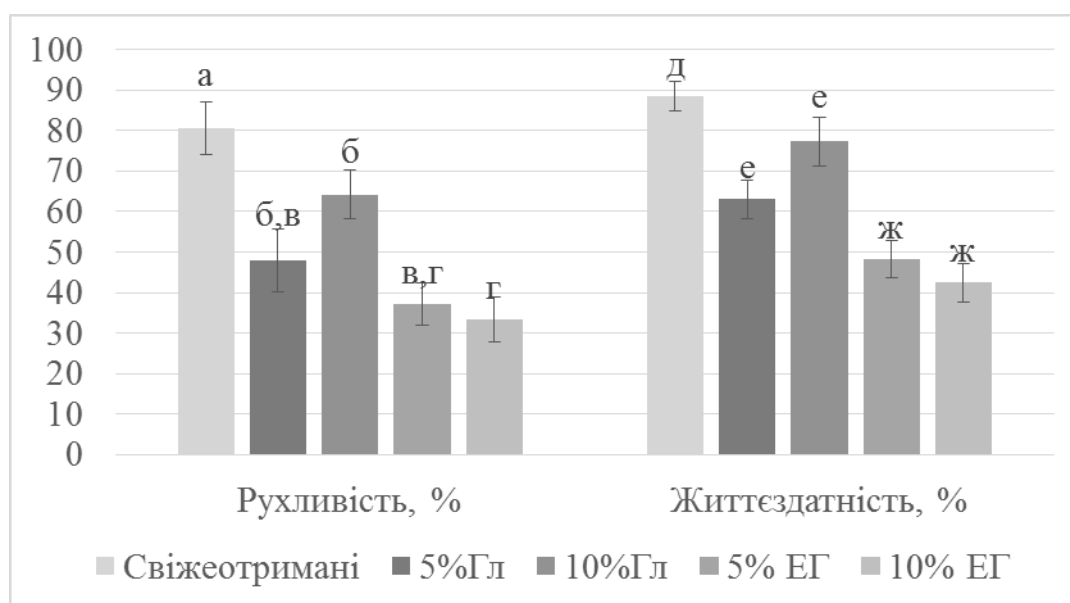


Рис. 3.12. Рухливість та життєздатність сперматозоїдів цапів зааненської породи після кріоконсервування у парувальний сезон. Значення показників, позначених різними літерами (а–ж), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Аналогічну картину спостерігали після кріоконсервування сперматозоїдів цапів альпійської породи парувального сезону (рис. 3.13), за виключенням того, що при використанні розчину 5% ЕГ та 5% Гл рухливість та життєздатність клітин не мали значущої різниці.

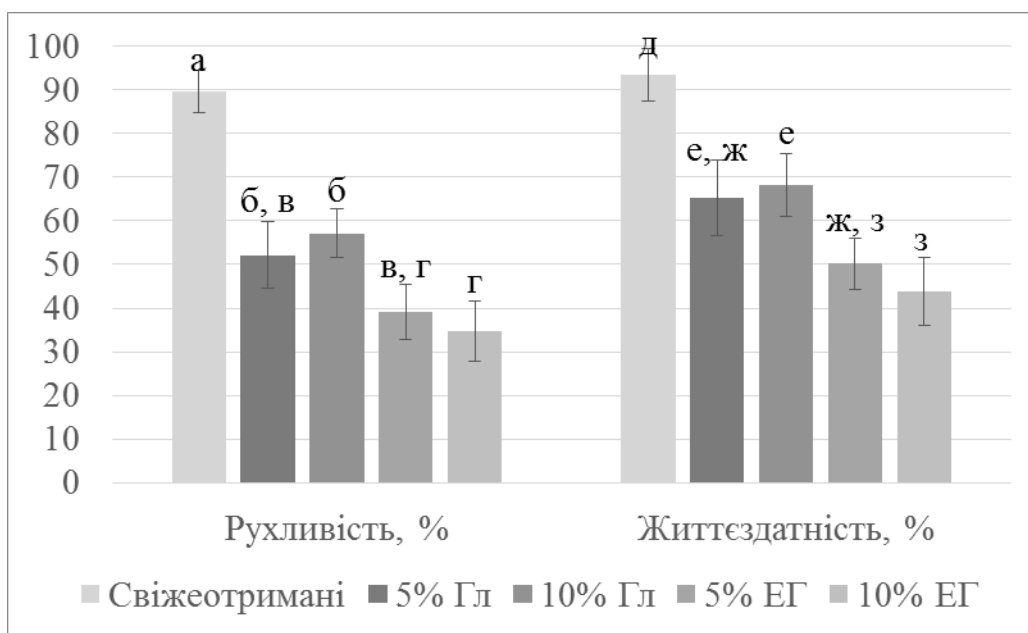


Рис. 3.13. Рухливість та життєздатність сперматозоїдів цапів альпійської породи після кріоконсервування у парувальний сезон. Значення показників, позначених різними літерами (а–з), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

У непарувальний сезон менше половини сперматозоїдів цапів зааненської породи зберігали рухливість після кріоконсервування (рис. 3.14), що свідчить про значні пошкодження клітин під час охолодження–відігріву. Подібно до результатів, отриманих в парувальний сезон, розчини з Гл у якості кріопротектору мали значуще ( $p < 0,05$ ) кращі результати, порівняно із середовищами з ЕГ.

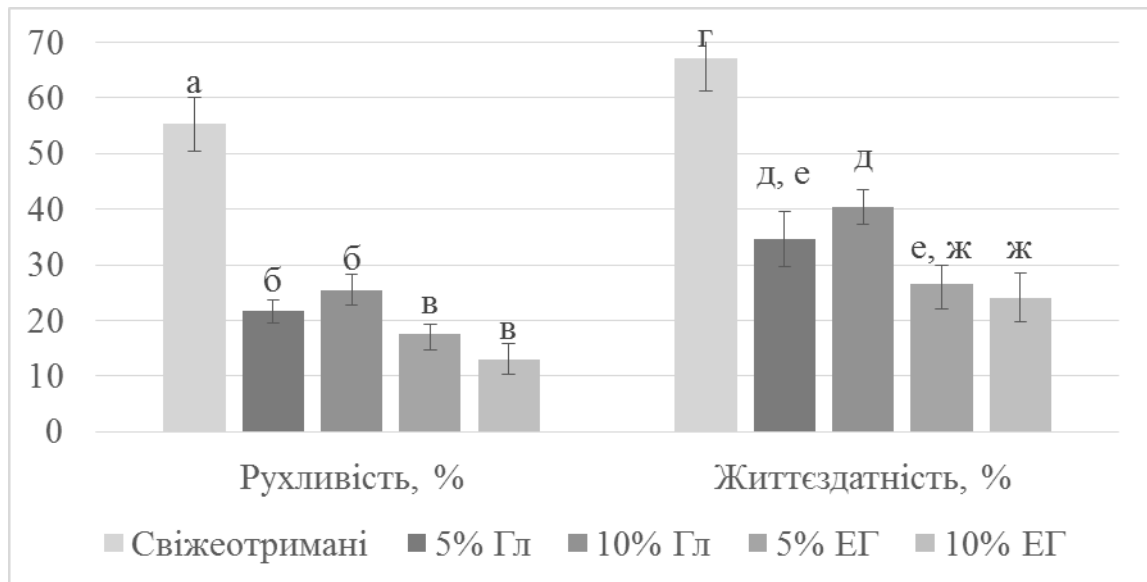


Рис. 3.14. Рухливість та життєздатність сперматозоїдів цапів зааненської породи після кріоконсервування у непарувальний сезон. Значення показників, позначених різними літерами (а–ж), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Аналізуючи рухливість та життєздатність сперматозоїдів цапів альпійської породи в непарувальний сезон (рис.3.15), виявили, що після кріоконсервування менше 30% клітин зберігали рухливість, при чому, кріопротекторні властивості розчину 10% Гл були більш виражені. В той же час, розчини Гл, у концентраціях, що вивчалися, дозволяли зберігати живими приблизно половину кріоконсервованих клітин. Проте для штучного осіменіння та запліднення в умовах *in vitro* саме рухливість відіграє важливу роль, тому найбільшу увагу було приділено вивченню саме цього параметру.

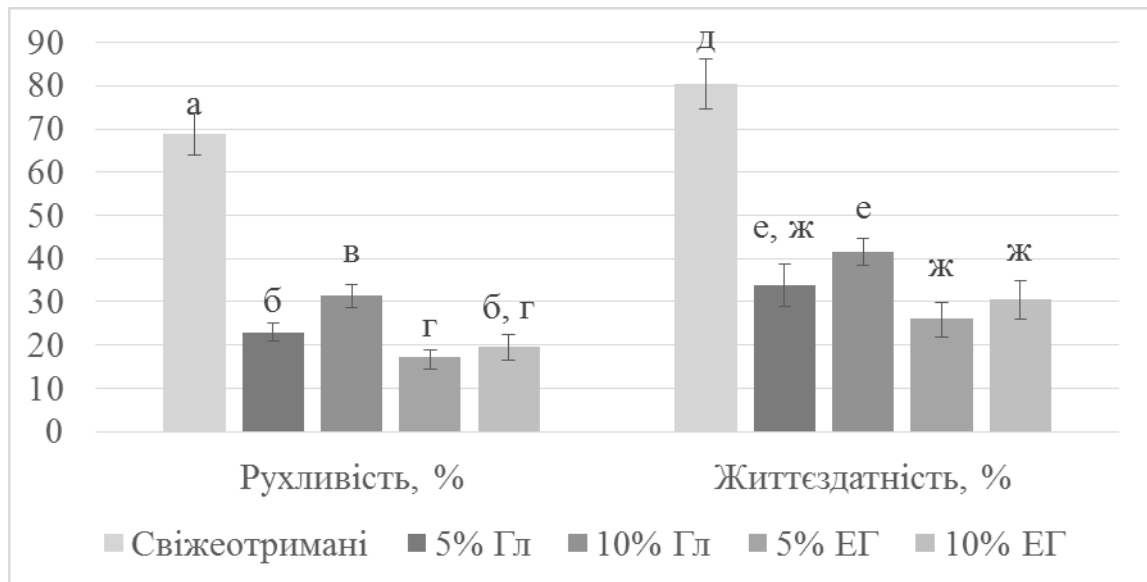


Рис. 3.15. Рухливість та життєздатність сперматозоїдів цапів альпійської породи після кріоконсервування у непарувальний сезон. Значення показників, позначених різними літерами (а–ж), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Таким чином, було показано, що у непарувальний сезон більшість клітин втрачала після кріоконсервування рухливість та життєздатність, що може свідчити про меншу кріорезистентність сперматозоїдів цапів у цей сезон.

Кріопротекторні середовища з 10% Гл найкраще зберігали кінетичні характеристики сперматозоїдів та їх життєздатність, тому в подальших дослідженнях ми використовували саме цю концентрацію кріопротектора.

Висновки за розділом:

1. Цапи зааненської породи мають значуще нижчі сперміологічні показники еякуляту порівняно з альпійської породою: об'єм, концентрація сперматозоїдів, їх рухливість та життєздатність ( $p < 0,05$ ).
2. У непарувальний сезон сперміологічні характеристики сперми цапів обох порід значуще нижчі, порівняно з парувальним ( $p < 0,05$ ).

3. Кількісний показник сперматозоїдів з нормальними морфологічними характеристиками не є породозалежним та значуще знижується у непарувальний сезон у представників різних порід ( $p < 0,05$ ).
4. Рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів не є породо- та сезоннозалежним.
5. Виявлено зниження показників рухливості та життєздатності сперматозоїдів у парувальний сезон обох видів тварин після 40 хв експозиції з розчинами 5% Гл та ЕГ і після 30 хв – з розчинами 10% Гл та ЕГ.
6. У непарувальний сезон для сперматозоїдів цапів обох порід показників рухливості та життєздатності сперматозоїдів знижувалися після 30 хв експозиції з розчинами 5% Гл та ЕГ і з 20 хв – з розчинами 10% Гл та ЕГ.
7. Частота виживання кріоконсервованих сперматозоїдів цапів обох порід цапів була найвищою з використанням 10% Гл та залежала від сезону отримання еякуляту.

Публікації за розділом [18–24, 26, 28, 30, 31, 34, 35].

## РОЗДІЛ 4

### СЕЗОННА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ БІОХІМІЧНОГО СКЛАДУ СІМ'ЯНОЇ ПЛАЗМИ ЦАПІВ ТА РІВНЯ ТРАНСКРИПТІВ ГЕНУ HSP 90

Попередні дослідження показали, що кінетичні характеристики та життєздатність сперматозоїдів цапів зберігаються не однаково в різні сезони парування, хоча кріоконсервування відбувається з використанням ідентичних кріопротекторних середовищ та протоколу кріоконсервування. Це може вказувати на те, що певні зовнішні та внутрішні чинники можуть впливати на характеристики сперматозоїдів, зокрема, на їх кріорезистентність. Більш того, ці чинники імовірно мають сезонну залежність, тому неоднаково впливають на кінетичні та функціональні характеристики клітин у парувальний та непарувальний сезони.

Нами було припущено, що біохімічний склад сім'яної плазми цапів може впливати на кінетичні, морфологічні і функціональні характеристики сперматозоїдів та, як наслідок, і на їх кріорезистентність.

Сім'яна плазма містить різні білки, ферменти та інші сполуки, які відіграють важливу роль у функціонуванні сперматозоїдів. Щоб оптимізувати процес кріоконсервування сперматозоїдів, важливо враховувати білковий склад сім'яної плазми та його потенційний вплив на зазначені характеристики сперматозоїдів.

Наявність у сім'яній плазмі моносахаридів та холестерину може зумовлювати більшу кріорезистентність статевих клітин.

Іон кальцію є ключовим регулятором біохімічних реакцій та функціонування сперматозоїдів [150].

Тому метою наступної серії роботи було дослідження вмісту альбуміну, глобуліну, загального білку, іонів кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ), глюкози, фруктози та холестерину у сім'яній плазмі цапів досліджуваних порід в різні сезони парування (табл. 4.1, табл. 4.2).

Таблиця 4.1

Біохімічний склад сім'яної плазми цапів зааненської породи у парувальний та непарувальний сезони

| Показники                | Парувальний сезон | Непарувальний сезон |
|--------------------------|-------------------|---------------------|
| Альбумін, г/дл           | 1,92±0,31         | 0,37±0,08*          |
| Глобулін, г/дл           | 2,10±0,39         | 0,41±0,11*          |
| Загальний білок, г/дл    | 4,022±0,69        | 0,776±0,16*         |
| Ca <sup>2+</sup> , мг/дл | 10,24±0,83        | 9,71±0,64           |
| Глюкоза, мг/дл           | 8,28±1,15         | 3,6±0,51*           |
| Фруктоза, мг/дл          | 446,07±26,26      | 165,21±9,54*        |
| Холестерин, мг/дл        | 40,22±0,27        | 3,48±0,29#          |

Примітка: \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками у парувальний сезон,  $p < 0,05$ ; # – різниця значуща порівняно з відповідними показниками у парувальний сезон,  $p < 0,01$

Цікавим виявився факт, що у парувальний сезон кількість альбуміну та глобуліну у сім'яній плазмі більш, ніж у дев'ять та п'ять разів, відповідно, перевищувала їх кількість непарувального сезону.

Концентрація глюкози та фруктози була значущо вищою у парувальний сезон та падала майже втричі у непарувальний.

Холестерин відіграє важливу роль у плинності мембран, чутливості до холодового шоку та резистентності до кріоушкоджень, а обробка суспензії сперматозоїдів, чутливих до холодового шоку видів тварин, циклодекстринами, наповненими холестерином, різко підіймає частоту

виживання сперматозоїдів після кріоконсервування [151]. Тому нам важливо було дослідити, чи впливає рівень холестерину в сім'яній плазмі на кріорезистентність клітин. На першому етапі досліджень ми виявили, що особливо значущі зміни спостерігалися при аналізі кількості холестерину в плазмі ців різних періодів розмноження. Так, у парувальний сезон його рівень сягав максимальних значень і становив  $40,22 \pm 0,27$  мг/дл та падав до  $3,48 \pm 0,29$  – у непарувальний.

Таблиця 4.2

Біохімічний склад сім'яної плазми ців альпійської породи у парувальний та непарувальний сезони

| Показники                | Парувальний сезон  | Непарувальний сезон  |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| Альбумін, г/дл           | $2,03 \pm 0,42$    | $0,49 \pm 0,11^*$    |
| Глобулін, г/дл           | $2,93 \pm 0,51$    | $0,78 \pm 0,13^*$    |
| Загальний білок, г/дл    | $4,960 \pm 0,81$   | $1,267 \pm 0,35^*$   |
| Ca <sup>2+</sup> , мг/дл | $10,55 \pm 0,76$   | $9,93 \pm 0,69$      |
| Глюкоза, мг/дл           | $7,86 \pm 1,21$    | $3,1 \pm 0,49^*$     |
| Фруктоза, мг/дл          | $416,75 \pm 31,25$ | $125,15 \pm 10,47^*$ |
| Холестерин, мг/дл        | $37,96 \pm 2,85$   | $3,12 \pm 0,34^\#$   |

Примітка: \* – різниця значуща порівняно з відповідними показниками у парувальний сезон,  $p < 0,05$ ; # – різниця значуща порівняно з відповідними показниками у парувальний сезон,  $p < 0,01$

У ців альпійської породи спостерігалась та сама тенденція зміни біохімічних характеристик сім'яної плазми, яку ми визначили щодо зааненської породи. Значуще зменшувалися кількісні показники альбуміну,

глобуліну та загального білку; падав рівень моносахаридів: глюкози та фруктози; більше, ніж у 10 разів зменшувався рівень холестерину.

Кореляційний аналіз виявив, що вміст загального білку у сім'яній плазмі має значущий прямий середній зв'язок з життєздатністю гамет зааненської породи після кріоконсервування у парувальний ( $r=0,536$ ) та непарувальний ( $r=0,513$ ) сезони та сперматозоїдів цапів альпійської породи у парувальний ( $r=0,551$ ) та непарувальний ( $r=0,509$ ) сезони,  $p<0,05$  (рис. 4.1.). Це можна пояснити тим, що деякі білки сім'яної плазми можуть зв'язуватися з мембранами сперматозоїдів, тим самим захищаючи їх від агресивного середовища деяких частин статевого тракту самиць, модулюючи їх рух крізь статеві шляхи самиць та, імовірно, проявляючи захисні властивості під час кріоконсервування [152].

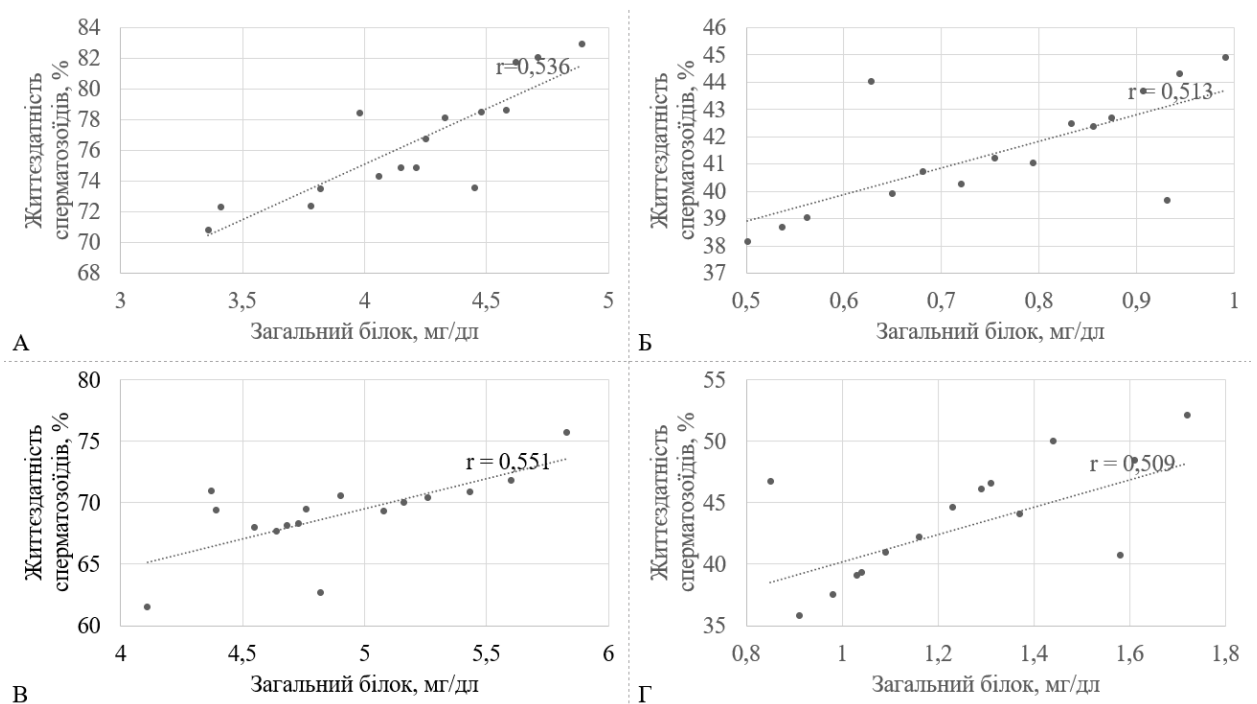


Рис. 4.1. Кореляція показників вмісту загального білку у сім'яній плазмі цапів з життєздатністю сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід у парувальний (А, В) та непарувальний (Б, Г) сезони.

Рівень глюкози у сім'яній плазмі корелював з середньою силою зв'язку з життєздатністю після кріоконсервування сперматозоїдів цапів зааненської

породи цапів у парувальний ( $r=0,649$ ) та непарувальний ( $r=0,594$ ) сезони. Аналогічну кореляцію встановили щодо зазначених показників альпійської породи у парувальний ( $r=0,541$ ) та непарувальний ( $r=0,520$ ) сезони,  $p<0,05$  (рис. 4.2).

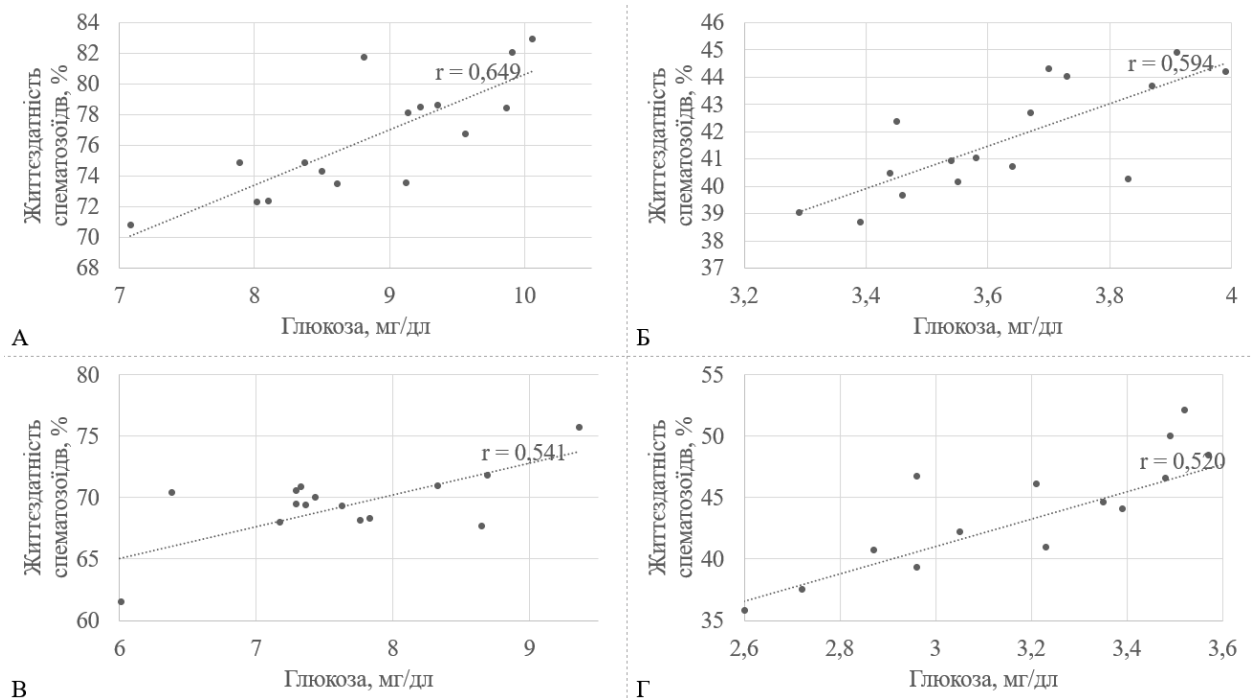


Рис. 4.2. Кореляції рівня глюкози у сім'яній плазмі цапів з життєздатністю сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід у парувальний (А, В) та непарувальний (Б, Г) сезони.

Була виявлена кореляція і для іншого моносахариду сім'яної рідини – фруктози, який подібно до глюкози забезпечує осмолярність середовища та може виступати джерелом енергії для сперматозоїдів. Так, був визначений значущий прямий середній зв'язок вмісту фруктози та життєздатності кріоконсервованих сперматозоїдів цапів зааненської породи цапів у парувальний ( $r=0,565$ ) та непарувальний ( $r=0,479$ ) сезони. Аналогічна кореляція була виявлена щодо альпійської породи у парувальний ( $r=0,526$ ) та непарувальний ( $r=0,533$ ) сезони,  $p<0,05$  (рис. 4.3).

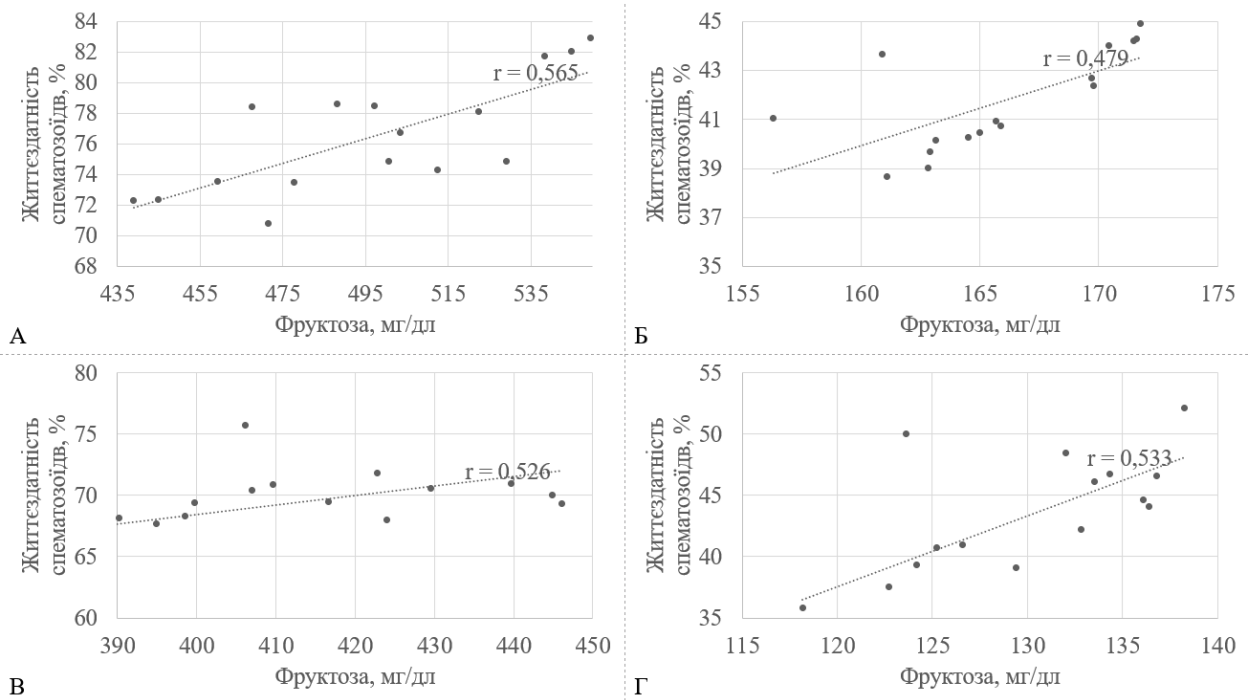


Рис. 4.3. Кореляції рівня фруктози сім'яної плазми цапів з життєздатністю сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід у парувальний (А, В) та непарувальний (Б, Г) сезони.

Рівень холестерину у сім'яній плазмі значуще прямо з середньою силою корелював з кількістю життєздатних після кріоконсервування гамет цапів зааненської породи у парувальний ( $r=0,502$ ) та непарувальний ( $r=0,657$ ) сезони і альпійської породи у парувальний ( $r=0,552$ ) та непарувальний ( $r=0,596$ ) сезони,  $p<0,05$  (рис. 4.4). Більший ступень кореляції рівню холестерину з життєздатністю сперматозоїдів цапів обох порід цапів після кріоконсервування спостерігався у непарувальний сезон. Це може вказувати на те, що наявність холестерину у навколишньому середовищі відіграє важливу роль у захисті клітин від пошкоджень, які відбуваються під час кріоконсервування, оскільки іншими групами вчених показано, що, наприклад, обробка сперматозоїдів циклодекстринами, навантаженими холестерином, покращує їх функціональні характеристики. Після кріоконсервування, можливо шляхом часткового зменшення пошкодження мембрани, спричиненого фазовим переходом мембрани в кристалічно—

гелевий стан при зниженні температури, оскільки доданий холестерин може знизити температуру, при якій відбувається фазовий перехід [153].

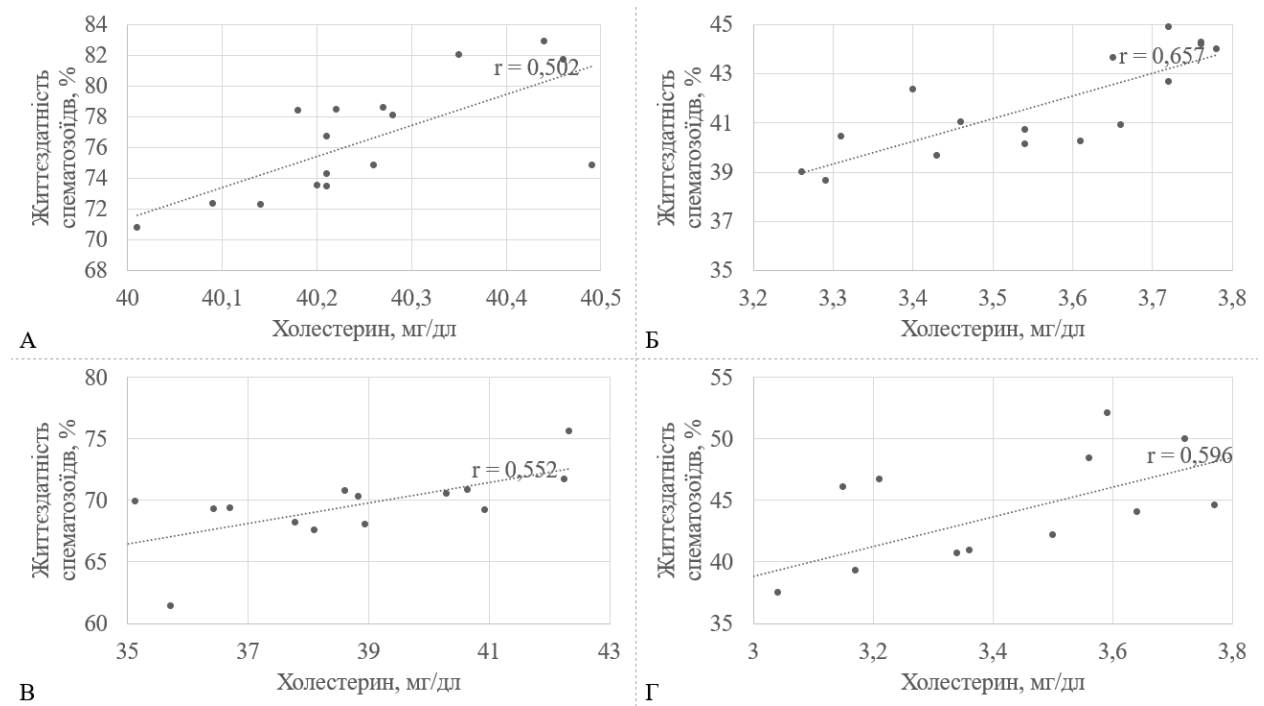


Рис. 4.4. Кореляції вмісту холестерину сім'яної плазми цапів з життєздатністю сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід у парувальний (А, В) та непарувальний (Б, Г) сезони.

В той же час, важливу роль у функціонуванні клітин та відповіді на стрес відіграють білки шаперони, а саме – білки теплового шоку, зокрема HSP 90. Він бере участь у формуванні білкових комплексів, деградації і стабілізації білків при термічному стресі, тому його рівень в клітині є важливим при стресових впливах, чим є зокрема кріоконсервування. Тому ми дослідили відносний вміст транскриптів гену HSP 90 у сперматозоїдах цапів у різні сезони парування (рис 4.5.). Нами було виявлено, що, незалежно від породи, вміст мРНК гену HSP 90 в непарувальний сезон був значуще нижчий, порівняно з парувальним ( $p < 0,05$ ). При чому сперматозоїди цапів альпійської породи мають значуще нижчий рівень транскриптів в непарувальний сезон, порівняно з зааненською ( $p < 0,05$ ). Це може впливати

на здатність клітин в цей сезон реагувати на стрес, спричинений кріоконсервуванням, та призводити до зниженої життєздатності.

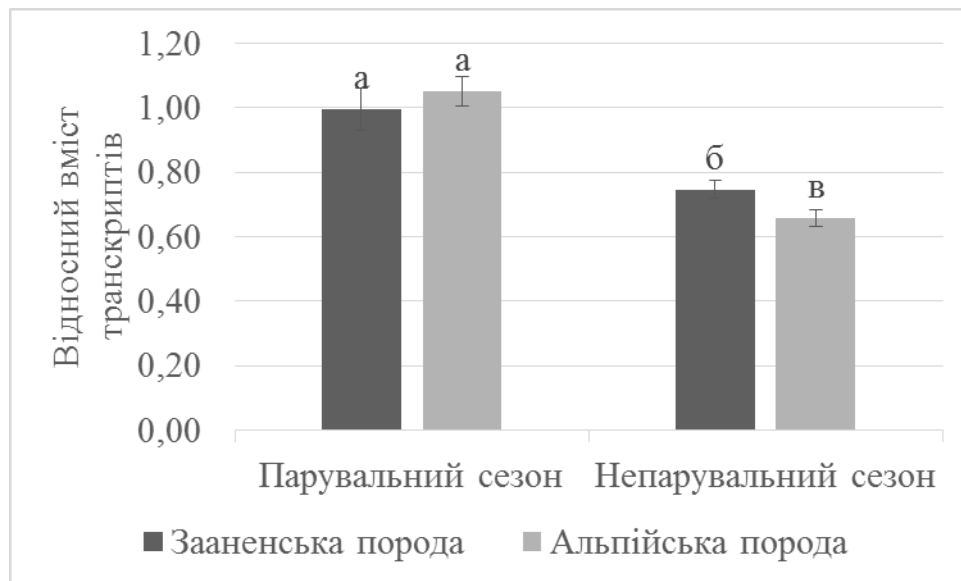


Рис. 4.5. Відносний вміст транскриптів гену HSP 90 у сперматозоїдах цапів зааненської та альпійської породи в різні сезони парування. Значення показників, позначених різними літерами (а–в), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Нами було зроблене припущення, що через більш низькі концентрації зазначених складових сім'яної плазми цапів у непарувальний сезон сперматозоїди можуть бути більш чутливими до кріопошкоджень, адже деякі компоненти сім'яної рідини здатні проявляти захисні властивості від негативного впливу температурного та осмотичного шоку під час кріоконсервування. Більш того, в непарувальний сезон зниження рівня транскриптів гену білку теплового шоку 90 (HSP 90), що опосередковано вказує і на зниження концентрації цього білка у сперматозоїдах, можуть впливати на здатність сперматозоїдів реагувати на температурний стрес. Для вирішення проблеми низької виживаності сперматозоїдів в непарувальний сезон після кріоконсервування, було вирішено дослідити вплив додавання яєчного жовтка (ЯЖ) у склад кріопротекторного середовища в концентрації

20%. Оскільки активність фосфоліпази А у сім'яній плазмі цапів, яка коагулює ЯЖ, є нижчою у непарувальний сезон [154]. Ми припустили, що в непарувальний сезон взаємодія між ферментом та ЯЖ не буде проявляти токсичного ефекту на сперматозоїди і не вплине на кріопротекторні властивості ЯЖ.

Додавання ЯЖ до кріопротекторного середовища дозволило після відігрівання отримати 10% підвищення кількості рухливих (рис. 4.6).

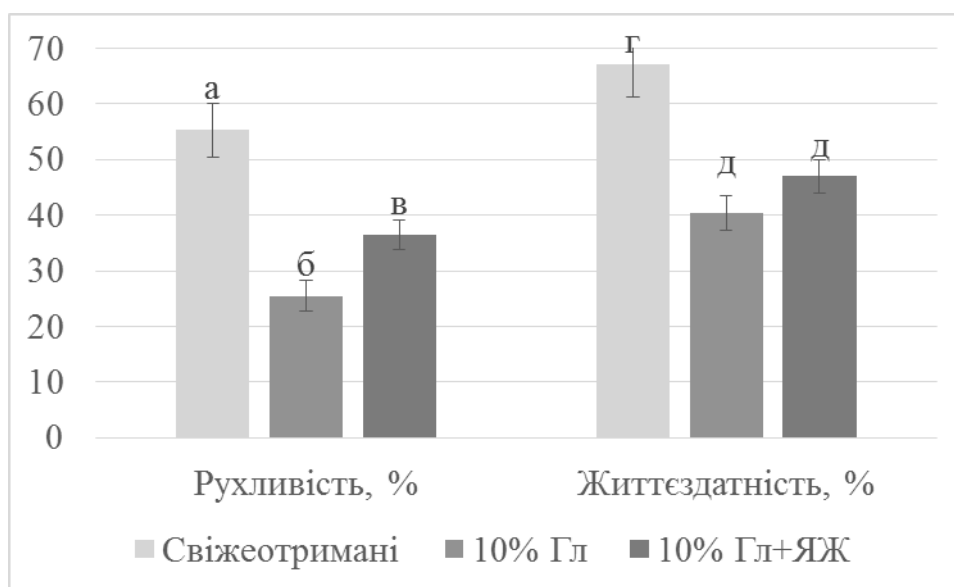


Рис. 4.6. Рухливість та життєздатність сперматозоїдів цапів зааненської породи після кріоконсервування у непарувальний сезон з різними кріопротекторними середовищами. Значення показників, позначених різними літерами (а–д), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Подібна тенденція спостерігалася у показниках, отриманих для сперматозоїдів цапів альпійської породи. Так, рухливість та життєздатність клітин були значуще вищими після кріоконсервування при використанні ЯЖ у кріозахисному середовищі, порівняно з групою без додавання ЯЖ ( $p < 0,05$ , рис. 4.7).

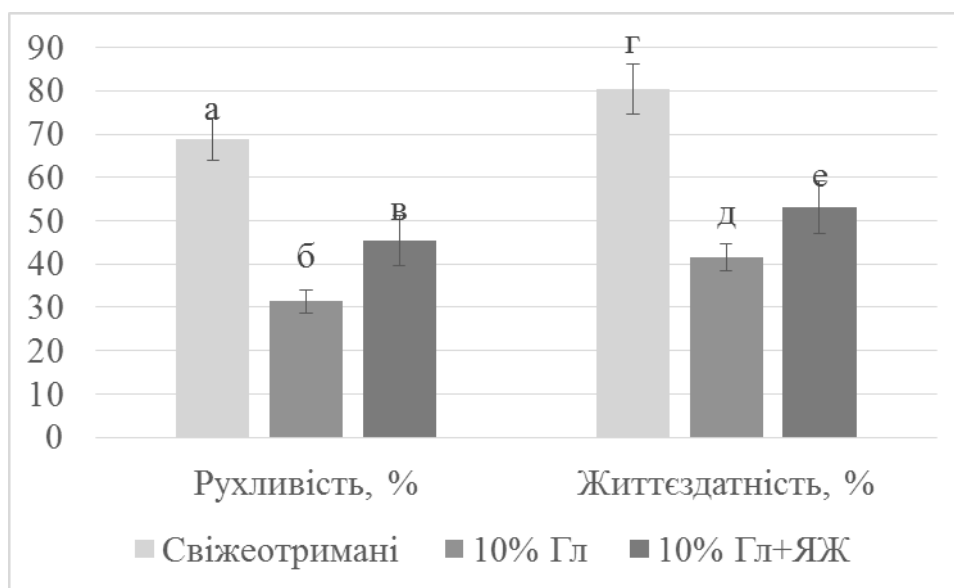


Рис. 4.7. Рухливість та життєздатність сперматозоїдів цапів альпійської породи після кріоконсервування у непарувальний сезон з різними кріопротекторними середовищами. Значення показників, позначених різними літерами (а–е), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Таким чином, задля забезпечення вищих показників збереження рухливості та життєздатності кріоконсервованих сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської породи у непарувальний сезон до кріозахисного середовища доцільно додавати 10% Гл та 20% ЯЖ.

Оскільки для високого рівня запліднення важливою є цілісність ДНК сперматозоїдів, ми дослідили рівень її фрагментації після кріоконсервування з обраними розчинами кріопротекторів, які показали найкращі результати у наших попередніх дослідженнях: 10% Гл та 10% Гл + 20% ЯЖ.

Після кріоконсервування сперматозоїдів цапів зааненської породи у парувальний сезон рівень фрагментації їх ДНК значуще збільшувався на 2,5%, порівняно з цим параметром для свіжеотриманих сперматозоїдів (рис 4.8). В непарувальний сезон рівень фрагментації ДНК після кріоконсервування з розчином 10% Гл збільшувався на 4%, порівняно зі

свіжоотриманими сперматозоїдами. В той же час, при додаванні до кріопротекторного середовища 20% ЯЖ, рівень фрагментації ДНК був значуще нижчим, ніж при використанні кріопротекторного середовища без ЯЖ, і був на рівні з таким при кріоконсервуванні сперматозоїдів у парувальний сезон.

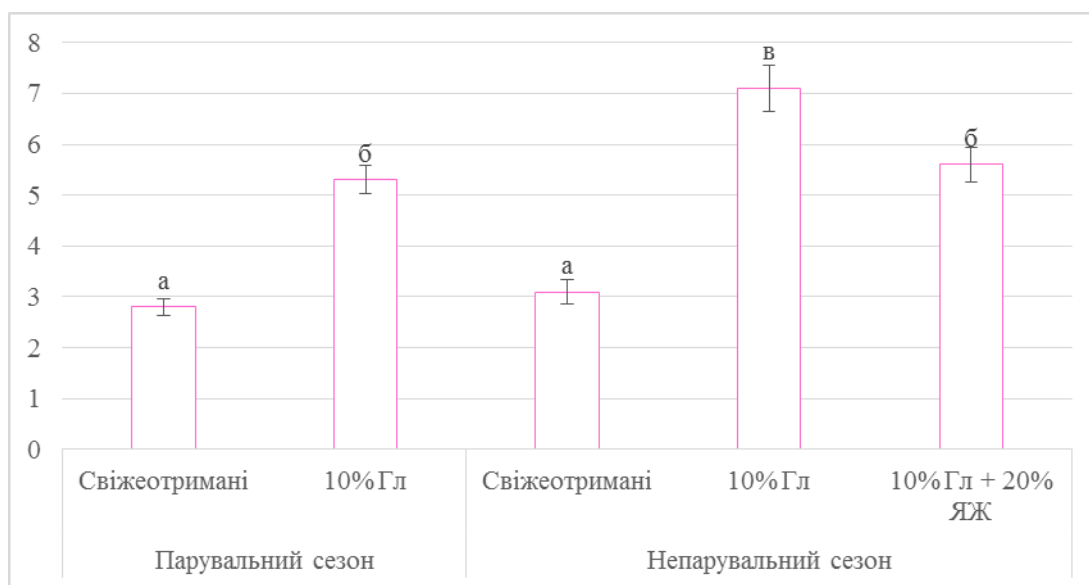


Рис. 4.8. Рівень фрагментації ДНК свіжоотриманих та кріоконсервованих сперматозоїдів цапів зааненської породи. Значення показників, позначених різними літерами (а–в), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Кріоконсервування сперматозоїдів цапів альпійської породи викликало значуще підвищення рівня фрагментації ДНК клітин. Так, у парувальний сезон після кріоконсервування спостерігалось підвищення фрагментації ДНК сперматозоїдів на 2,8%, а в непарувальний сезон при заморожуванні з 10% Гл – на 7,3%. Додавання ЯЖ у кріопротекторне середовище дозволило зменшити фрагментацію ДНК клітин на 3,2%, порівняно з цим показником у кріоконсервованих без ЯЖ клітинах.

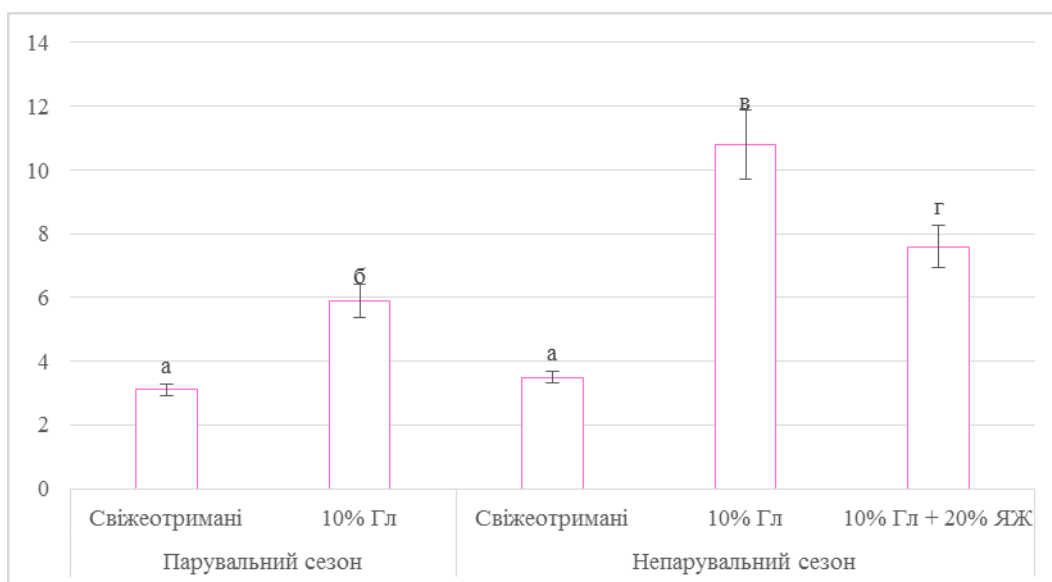


Рис. 4.9. Рівень фрагментації ДНК свіжоотриманих та кріоконсервованих сперматозоїдів цапів альпійської породи. Значення показників, позначених різними літерами (а–г), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Таким чином, кріоконсервування викликає підвищення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів. Додавання 20% ЯЖ до кріопротекторного середовища з 10% Гл зменшує негативний вплив кріоконсервування на цілісність ДНК.

Висновки за розділом:

1. Біохімічні характеристики сім'яної плазми (рівень альбуміну, глобуліну, загального білка, глюкози, фруктози та холестерину) еякулятів цапів обох порід відрізняються, залежно від сезону отримання еякуляту.
2. Рівень загального білка, глюкози, фруктози та холестерину корелюють з життєздатністю сперматозоїдів після кріоконсервування.
3. Відносний рівень транскриптів гену HSP 90 сперматозоїдів цапів порід, що вивчали знижується у непарувальний сезон.

4. Додавання 20% яєчного жовтку у кріопротекторне середовище з 10% Гл дозволили збільшити рухливість сперматозоїдів з  $25,49 \pm 2,7$  до  $(36,50 \pm 2,7)\%$  у цівів зааненської породи та з  $31,43 \pm 5,75$  до  $(45,34 \pm 5,75)\%$  у цівів альпійської породи.
  5. Після кріоконсервування рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів значуще збільшувався ( $p < 0,05$ ). Додавання ЯЖ у кріозахисне середовище в непарувальний сезон дозволило зберегти цей показник на рівні кріоконсервованих у парувальний сезон клітин.
- Публікації за розділом [19, 29, 32, 40].

## РОЗДІЛ 5

### РЕПРОДУКТИВНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦАПІВ В РІЗНІ СЕЗОНИ ПАРУВАННЯ

Головною функцією сперматозоїдів є запліднення яйцеклітин з подальшим розвитком ембріонів, їх імплантацією та отримання здорового потомства. Тому важливим етапом дослідження ефективності кріоконсервування є вивчення здатності сперматозоїдів після відігріву запліднювати яйцеклітини.

Для цього ми отримували яйцеклітини, які аспірували з фолікулів яєчників після забою тварин. Через кращу резистентність кіз альпійської породи до захворювань, забій тварин цієї породи проводився рідко, і не було отримано достатньої кількості яйцеклітин для проведення статистичної обробки, тому ми використовували тільки ооцити зааненської породи. Відповідно, запліднення проводили сперматозоїдами цапів виключно зааненської породи.

У парувальний сезон було отримано 356 незрілих ооцит–кумулюсних комплексів (рис. 5.1.А), які поміщали в середовище для дозрівання *in vitro* і через добу візуалізували їх зрілість за експандованим шаром кумулюсних клітин (рис.5.1.Б). У непарувальний сезон було отримано 182 ооцит–кумулюсних комплекси.

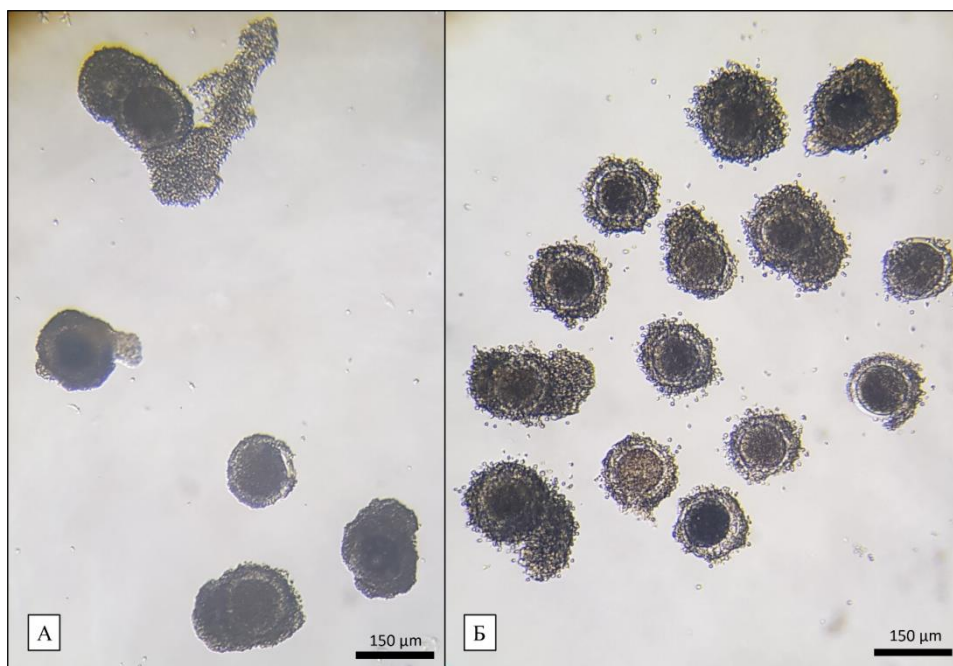


Рис.5.1. Мікрофотографії ооцит–кумулюсних комплексів кіз, отриманих у парувальний сезон: незрілі (А) та зрілі (Б).

У кожен сезон ооцит–кумулюсні комплекси рандомно ділили на 3 групи, з метою запліднення *in vitro* свіжоотриманими та кріоконсервованими сперматозоїдами. Так, у парувальний сезон 120 ооцитів були запліднені свіжоотриманими сперматозоїдами, 120 – кріоконсервованими у парувальний сезон, 116 – кріоконсервованими у непарувальний сезон. Аналогічно групували ооцити, аспіровані у непарувальний сезон: 61 ооцит був запліднений свіжоотриманими сперматозоїдами, 61 – кріоконсервованими у парувальний сезон та 60 – кріоконсервованими у непарувальний сезон.

Через 16–18 год інкубування ооцитів зі сперматозоїдами, яйцеклітини позбавляли кумулюсу та спостерігали результат запліднення ооцитів *in vitro*, яке виявляли за наявністю у перивітеліновому просторі двох полярних тіл (рис. 5.2).

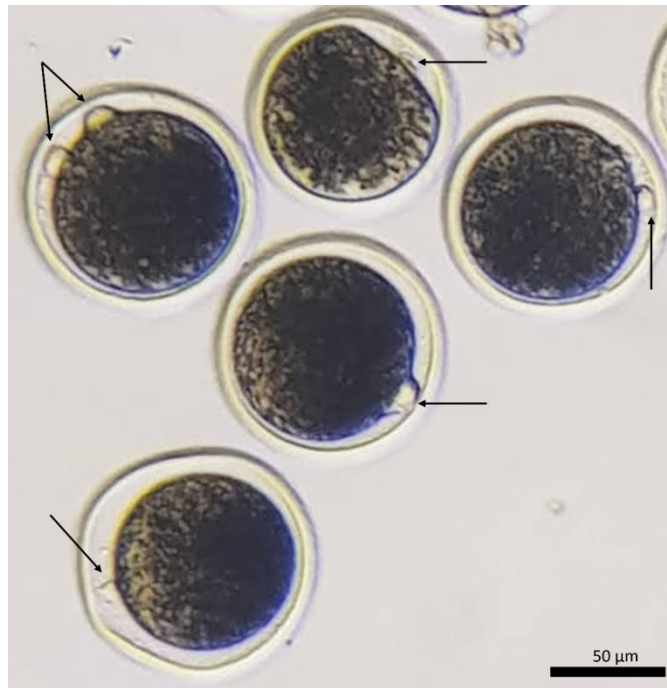


Рис. 5.2. Мікрофотографія яйцеклітин кіз парувального сезону, позбавлених кумулюсних клітин, після запліднення *in vitro* кріоконсервованими у парувальний сезон сперматозоїдами. Стрілками позначені полярні тільця.

Здійснювали безперервне культивування ембріонів *in vitro* протягом тижня, аналізували та класифікували ембріони 7-ої доби розвитку та розраховували частоту бластуляції (табл. 5.1).

Таблиця 5.1.

Частота бластуляції після запліднення *in vitro* ооцитів кіз в різні сезони парування свіжоотриманими та кріоконсервованими сперматозоїдами

| Сезон, в який отримано ооцити | Частота бластуляції, % |                                      |                                        |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
|                               | Сперматозоїди          |                                      |                                        |
|                               | Свіжоотримані          | Кріоконсервовані у парувальний сезон | Кріоконсервовані у непарувальний сезон |
| Парувальний                   | 82,6±3,7 а             | 71,9±9,2 а,б                         | 57,9±9,7 б,в                           |
| Непарувальний                 | 69,6±9,6 б,в           | 68,2±11,2 б,в                        | 53,5±6,5 в                             |

Примітка: Значення показників, позначених різними літерами (а–в), мають значущу різницю,  $p < 0,05$ .

Отримані результати показали, що найкраща частота розвитку бластоцист спостерігається для ооцитів, отриманих у парувальний сезон, при заплідненні свіжоотриманими сперматозоїдами того ж сезону (рис. 5.3.А). Цей показник незначуще відрізняється від частоти бластуляції, коли для запліднення використовували кріоконсервовані у парувальний сезон сперматозоїди. Запліднення ооцитів парувального сезону сперматозоїдами, кріоконсервованими у непарувальний сезон, дозволяє отримати достатньо високі результати розвитку ембріонів (рис. 5.3.Б).

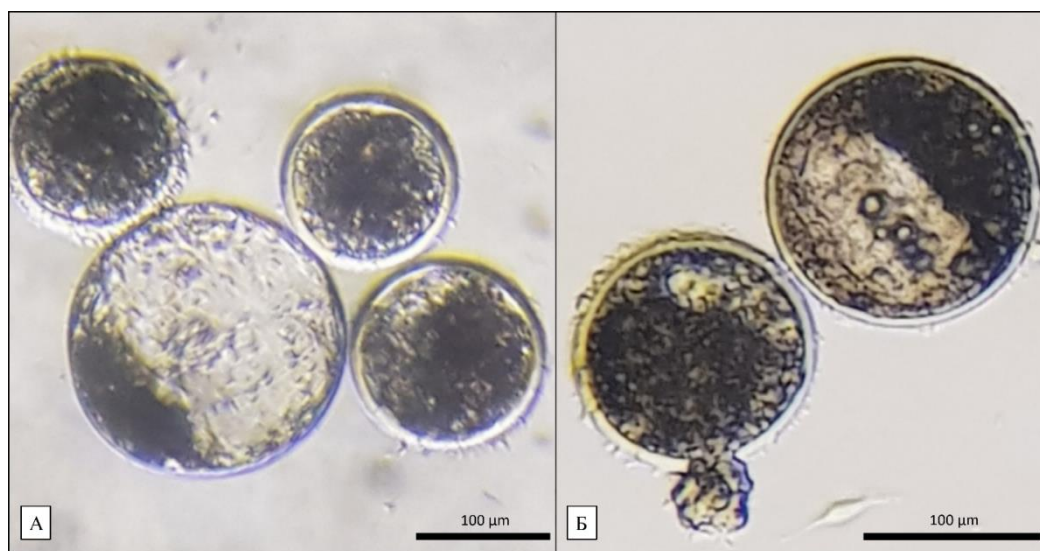


Рис. 5.3. Мікрофотографії бластоцист, отриманих після запліднення *in vitro* ооцитів кіз, отриманих у парувальний сезон, свіжоотриманими (А) та кріоконсервованими у непарувальний сезон сперматозоїдами (Б).

Аналізуючи рівень бластуляції після запліднення ооцитів, отриманих у непарувальний сезон, виявили, що групи, запліднені свіжоотриманими та кріоконсервованими у парувальний сезон сперматозоїдами, мали однаковий рівень розвитку бластоцист. Ці значення не відрізнялися від значень парувального сезону, для яких використовували кріоконсервовані сперматозоїди. Найнижчий рівень розвитку ембріонів на 7-му добу

культивування *in vitro* спостерігали при запліднення ооцитів, отриманих у непарувальний сезон, кріоконсервованими у непарувальний сезон сперматозоїдами. Це може вказувати на те, що репаративних властивостей яйцеклітин непарувального сезону недостатньо для усунення всіх пошкоджень кріоконсервованих у непарувальний сезон сперматозоїдів, зокрема молекули ДНК. Ультразвукова діагностика вагітностей на 50-у добу після трансплантації ембріонів козам–реципієнтам української місцевої породи виявила, що не було значущої різниці рівня імплантації ембріонів досліджуваних груп (табл.5.2). Близько 30% кіз кожної групи було діагностовано вагітними, що вказує на те, що сезон отримання ооцитів та сперматозоїдів не впливає на здатність ембріонів до імплантації, більш того, отримані ембріони після запліднення ооцитів кріоконсервованими сперматозоїдами здатні імплантуватися з такою ж частотою, що і після використання свіжоотриманих клітин.

Таблиця 5.2.

Частота вагітностей, діагностованих на 50-у добу після трансферу козам–реципієнтам української місцевої породи, ембріонів зааненської породи, отриманих у різні сезони парування

| Сезон, в який отримано ооцити | Частота вагітностей, % |                                      |                                        |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
|                               | Сперматозоїди          |                                      |                                        |
|                               | Свіжоотримані          | Кріоконсервовані у парувальний сезон | Кріоконсервовані у непарувальний сезон |
| Парувальний                   | 33,3                   | 29,0                                 | 23,8                                   |
| Непарувальний                 | 30,0                   | 24,4                                 | 28,1                                   |

Приблизно через 100 днів після діагностики вагітності починався період окоту. Псевдовагітними виявили 6 самиць. Не було виявлено значущої різниці частоти окоту між досліджуваними групами (табл. 5.3).

Таблиця 5.3.

Частота окоту після трансплантації козам–реципієнтам української місцевої породи ембріонів зааненської породи, отриманих у різні сезони парування

| Сезон, в який отримано ооцити | Частота окоту, % |                                      |                                        |
|-------------------------------|------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
|                               | Сперматозоїди    |                                      |                                        |
|                               | Свіжоотримані    | Кріоконсервовані у парувальний сезон | Кріоконсервовані у непарувальний сезон |
| Парувальний                   | 33,3             | 26,7                                 | 23,1                                   |
| Непарувальний                 | 30,9             | 22,2                                 | 21,8                                   |

Більше 20% кіз–реципієнтів народили козенят (рис. 5.4). Відсутність значущої різниці у частоті окоту між досліджуваними групами говорить про те, що використання кріоконсервованих сперматозоїдів у будь–який парувальний сезон дозволяє отримати народження козенят на тому ж рівні, що і при використанні свіжоотриманих сперматозоїдів.

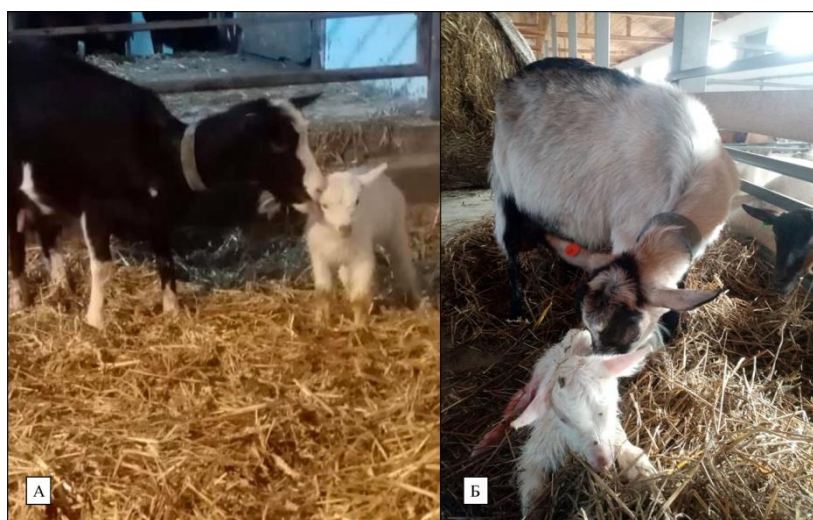


Рис. 5.4. Кози–реципієнти разом з народженими козенятами, що були отримані після трансплантації ембріонів, створених шляхом запліднення *in*

*vitro* ооцитів парувального сезону свіжовиділеними (А) та кріоконсервованими у непарувальний сезон (Б) сперматозоїдами.

Таким чином, запліднення *in vitro* ооцитів, отриманих у різні сезони, свіжоотриманими та кріоконсервованими у різні сезони сперматозоїдами дозволило виявити, що парувальний сезон та кріоконсервування сперматозоїдів впливають на частоту розвитку ембріонів, проте не впливають на частоту вагітності та окоту.

Висновки за розділом:

1. Частота розвитку ембріонів є значущо вищою при заплідненні ооцитів парувального сезону свіжоотриманими  $82,6 \pm 3,7$  та кріоконсервованими  $(71,9 \pm 9,2)\%$  сперматозоїдами того ж сезону.
2. Запліднення ооцитів парувального сезону кріоконсервованими у непарувальний сезон сперматозоїдами дозволяє отримати частоту бластуляції на рівні  $(57,9 \pm 9,7)\%$ , що значуще нижче, ніж після запліднення свіжоотриманими сперматозоїдами, проте на рівні цього параметру при використанні клітин, кріоконсервованих у парувальний сезон.
3. Найнижчий рівень розвитку ембріонів на 7-му добу культивування *in vitro* спостерігали при заплідненні ооцитів, отриманих у непарувальний сезон, кріоконсервованими у той самий сезон сперматозоїдами –  $(53,5 \pm 6,5)\%$ .
4. Після трансплантації ембріонів в порожнину рогу матки частота настання вагітності та окоту не залежала від сезону свіжоотриманої чи кріоконсервованої сперми.

Публікації за розділом [18, 25, 27, 36, 37–39].

## УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Забезпечення продовольчої безпеки розглядаються Продовольчою та сільськогосподарською організацією ООН (FAO) у контексті сталого розвитку високих технологій у сфері козівництва. Кози часто є більш стійкими до екстремальних кліматичних умов та нестачі корму, порівняно з іншими видами худоби. Їх розведення може сприяти сільськогосподарській стійкості в регіонах, які потерпають від впливу різних шкідливих факторів, в тому числі наслідків збройної агресії російської федерації.

Представлене дисертаційне дослідження в цілому було спрямоване на вивчення сезонної варіабельності кріорезистентності сперматозоїдів самців зааненської та альпійської порід кіз (*Capra ahircus*) шляхом аналізу сперміологічних характеристик їх еякулятів: об'єму, загальної кількості сперматозоїдів, їх рухливості, морфологічних особливостей та рівня фрагментації їх ДНК; підбору оптимальних кріозахисних розчинів з урахуванням їх цитотоксичності; визначенню оптимальних режимів експозиції з кріопротектором; аналізу біохімічних параметрів сім'яної плазми, які можуть впливати на характеристики сперматозоїдів та визначенню рівня транскриптів гену білка теплового шоку; аналізу частоти розвитку ембріонів *in vitro* та настання вагітності і окоту.

На першому етапі роботи було вирішено завдання щодо пошуку сезоннозалежного маркера кріорезистентності сперматозоїдів цапів, який, в той же час, характеризував їх запліднювальну здатність.

Було виявлено, що цапи альпійської породи, у парувальний сезон, мають значуще вищі сперміологічні характеристики, порівняно з зааненською ( $p < 0,05$ ). В непарувальний сезон еякуляти цапів альпійської породи також характеризувалися значуще вищими сперміологічними показниками, ніж зааненська порода. Індивідуальні відмінності в кількості та якості сперматозоїдів між представниками виду в межах породи роблять

індивідуальну оцінку сперми необхідною для вибору найбільш плідних самців для розведення [155].

Аналіз морфологічних варіантів статевих клітин дозволив нам виявити їх значущу різницю між парувальним та непарувальним сезонами. Морфологічні, кінетичні, біохімічні, генетичні варіанти статевих клітин значущо відрізняються у різні сезони у багатьох видів ссавців [156]. Так, це явище описано у баранів [156], жеребців [157], верблюдів [158], хряків [159]. Наші результати узгоджуються з роботами, які зафіксували, що репродуктивна сезонність є явищем, на яке впливають головним чином річні коливання фотоперіоду [160].

На наступному етапі ми визначали оптимальний склад кріозахисного середовища та час експозиції з урахуванням сезону парування. Оптимальне середовище кріоконсервування має бути ретельно розроблено для захисту та збереження сперматозоїдів, мінімізуючи пошкодження під час процесу заморожування та розморожування [161]. Гл, ЕГ та ДМСО є широко використовуваними кріопротекторами щодо сперми ссавців. Проте вибір кріопротектора та його концентрацію слід оптимізувати, виходячи з конкретних особливостей породи, або навіть індивідуальних репродуктологічних характеристик конкретної особини [162]. Гл є найпоширенішим кріопротектором для кріоконсервування сперматозоїдів ссавців, який дегідратує клітини, запобігаючи утворенню льоду, а також підтримує структуру та мембрану сперматозоїдів, зберігаючи їхню життєздатність [163]. Однак Гл може бути цитотоксичним, оскільки внаслідок високої молекулярної маси та низької проникності крізь мембрану викликає осмотичний стрес [164].

На відміну від Гл, ЕГ є низькомолекулярним кріопротектором і є менш цитотоксичним, порівняно з Гл [165, 166].

Проте, саме Гл схвалений для використання в клінічних умовах регуляторними органами, що робить саме цей кріопротектор вибором щодо кріоконсервування сперми тварин та людини [167].

Тому початкові експерименти були пов'язані з вивченням впливу загальноприйнятих кріопротекторів на рухливість та життєздатність сперматозоїдів. З урахуванням даних літератури та розроблених підходів щодо кріоконсервування сперми дрібних жуйних в якості кріопротекторів ми обрали Гл та ЕГ у концентраціях 5 та 10%. Сперматозоїди витримували у розчинах кріопротекторів із зазначеною концентрацією протягом 60 хв, при цьому кожні 10 хв вилучали 10 мкл сперми для аналізу їх рухливості та життєздатності.

В нашій роботі було показано, що цитотоксичність розчинів обраних кріопротекторів проявляється у зниженні рухливості та життєздатності клітин. При чому, це відбувається у різні проміжки часу: починаючи з 40 хв при використанні 5% розчинів обох кріопротекторів та з 30 хв при використанні 10% розчинів обох кріопротекторів у парувальний сезон, порівняно з контролем, та з 30 хв експозиції з розчинами 5% Гл та ЕГ і з 20 хв – з розчинами 10% Гл та ЕГ – у непарувальний, що свідчить про більш чутливість сперматозоїдів до факторів зовнішнього середовища у цей період.

Після кріоконсервування сперматозоїдів цапів зааненської породи у парувальний сезон значуще знижувалися рухливість та життєздатність клітин, порівняно зі свіжоотриманими сперматозоїдами, проте найкраще ці параметри зберігалися при використанні розчину 10% Гл ( $64,23 \pm 6,1$  та  $(77,23 \pm 5,9)\%$ , відповідно). Для альпійської породи у парувальний сезон найкращі показники рухливості та життєздатності гамет ( $57,15 \pm 5,6$  та  $(68,15 \pm 7,1)\%$ ) були відмічені при використанні 10% Гл.

У непарувальний сезон менше половини сперматозоїдів цапів зааненської породи зберігали рухливість та життєздатність після кріоконсервування, порівняно зі свіжовиділеними клітинами, що свідчить про значні пошкодження клітин під час охолодження–відігріву. Після кріоконсервування сперматозоїдів цапів альпійської породи в непарувальний сезон було виявлено зниження показників їх рухливості та життєздатності, порівняно зі свіжоотриманими. Таким чином, було показано, що у

непарувальний сезон більшість клітин після кріоконсервування втрачала рухливість та життєздатність, що може свідчити про меншу кріорезистентність сперматозоїдів цапів у цей сезон.

Наші дослідження показали, що кінетичні характеристики та життєздатність свіжоотриманих та кріоконсервованих сперматозоїдів цапів залежать від сезону, в який збирається еякулят. Це може вказувати на те, що певні зовнішні та внутрішні чинники, спричинені сезонними змінами, можуть впливати на характеристики сперматозоїдів, зокрема, на їх кріорезистентність.

Вважається, що сперматозоїди дрібних жуйних, порівняно з іншими видами, є, більш чутливими щодо факторів кріоконсервування [168]. Крім того, технологія кріоконсервування сперми цапів є дуже складною, оскільки в ній міститься ліпаза у високій концентрації, яка може взаємодіяти з компонентами розчинників для кріоконсервації, такими як яєчний жовток чи молоко [169]. Ліпаза – фермент, який гідролізує ліпіди на жирні кислоти та Г [170] Розщеплення ліпідів плазматичної мембрани може призвести до зміни цілісності та текучості мембрани, що, в свою чергу, може вплинути на рухливість та життєздатність сперматозоїдів. Ліпаза також потенційно може вплинути на властивість кріопротекторів.

Сперматозоїди є метаболічно неактивними, що компенсується підтримкою багатьох клітинних функцій саме сім'яною плазмою [171].

Значну частину сім'яної плазми складає вода, яка забезпечує рух та живлення сперматозоїдів. Вона містить білки, ліпіди, фруктозу, сечовину, креатинін та інші біохімічні молекули. Саме сукупність компонентів створює створює оптимальне середовище підтримки руху сперматозоїдів [172].

Склад сім'яної плазми може впливати на кріорезистентність сперматозоїдів, оскільки вона містить цукри, ліпіди, ферменти та амінокислоти, які можуть запобігти порушенню цілісності мембрани, зменшити ризик утворення кристалів льоду та уникнути розвитку перекисного окислення ліпідів [173].

Сперматозоїди цапів є чутливими до кріоконсервування, порівняно з сперматозоїдами інших тварин, імовірно, через зміни ліпідів у їх плазматичній мембрані під час кріоконсервування [174]. Проте показано, що сперматозоїди здатні поглинати ліпіди та жирні кислоти з навколишнього середовища, яким і є сім'яна плазма [175].

В роботі RK. Tuli та співавт. було показано, що видалення сім'яної плазми перед кріоконсервуванням погіршує показники виживання сперматозоїдів [176].

Зміна показників сім'яної плазми у непарувальний сезон, яка була виявлена під час проведених нами досліджень та знижені показники виживання сперматозоїдів після заморожування-відігріву узгоджуються з висновком авторів про роль сім'яної плазми в кріорезистентності сперматозоїдів [177, 178].

Додавання сім'яної плазми від еякулятів з високою кріорезистентністю сперматозоїдів приводило до значущо вищих показників виживання сперматозоїдів після кріоконсервування та покращувало їх запліднювальну здатність [179].

Хоча, деякі автори стверджують, що компоненти сім'яної плазми можуть негативно впливати на показники виживання сперматозоїдів після кріоконсервування. Наприклад, ендотоксин бактерій – ліпополісахарид, який, в свою чергу, зв'язується з рецептором TLR-4, який експресується на поверхні сперматозоїдів та призводить до індукції апоптозу [180]. Проте це поодинокі публікації, які описують окремі випадки.

У індукції змін плазматичної мембрани сперматозоїдів, окрім холестерину, беруть участь іони кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [181]. Важливість дослідження іонів кальцію пов'язана з тим, що вони запускають акросомну реакцію та сприяють проникненню сперматозоїдів у яйцеклітину [182].

Фруктоза може підтримувати виживання та рухливість сперматозоїдів після розморожування [183]. Фруктоза є важливим інгредієнтом гліколізу [184]. Глюкоза є важливим субстратом метаболізму сперматозоїдів [14].

Фруктоза та глюкоза можуть проникати через плазматичну мембрану сперматозоїдів через їх низьку молекулярну масу. Показано, що додавання глюкози до кріопротекторного середовища покращувало їх рухливість після кріоконсервування [185].

Було показано, що моносахариди та дисахариди виявляють кріопротекторні властивості. Так, кріоушкодження сперматозоїдів було зменшено через додавання тригалози, яка взаємодіяла з фосфоліпідами плазматичної мембрани. Це підвищувало текучість мембрани та призводило до вищої частоти виживання сперматозоїдів [186].

Тепловий або інший стрес викликає підвищений синтез білків теплового шоку (HSP) – групи унікальних білків, які діють як молекулярні шаперони і пов'язані зі згортанням білків у клітині [187]. Показано, що експресія мРНК HSP70 і HSP 90 знижувалася після кріоконсервування у биків [188], а в сперматозоїдах буйволів HSP70 перерозподілялися [189]. Вважають, що HSP70 та HSP 90 є білками, пов'язаними з рухом сперматозоїдів [190]. Встановлено, що HSP70 підвищує активність  $\text{Ca}^{2+}$ –АТФази, тоді як HSP 90 відповідає за збалансування внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  і модифікацію білка сперматозоїдів шляхом фосфорилування тирозину.  $\text{Ca}^{2+}$  є важливою сигнальною молекулою, яка грає роль у регуляції рухливості сперматозоїдів. HSP 90 взаємодіє з серин–треоніною та тирозиною кіназами, що впливає на кінетичні характеристики сперматозоїдів. Було проведено обмежену кількість досліджень щодо взаємозв'язку між HSP та якістю сперми у бугаїв після процесу заморожування–розморожування [191]. Проте таких досліджень, щодо вивчення рівня транскриптів HSP у сперматозоїдах цапів в доступній нам літературі не було знайдено.

Яєчний жовток традиційно використовується як компонент кріозахисних середовищ різних видів ссавців. Захисні властивості яєчного жовтка пояснюються його біохімічним складом, який включає ліпопротеїни та інші молекули, які можуть допомогти захистити сперматозоїди під час

процесу заморожування та відігріву. Було показано, що після додавання до кріозахисного середовища яєчного жовтку воно збагачується новими білковими фракціями. Показано, що втрата білків–шаперонів, що відбувається при кріоконсервуванні, може заважати нормальному функціонуванню клітин, проте функції клітин можуть бути частково відновлені саме завдяки додавання в кріозахисне середовище яєчного жовтку [192]

Яєчний жовток містить фосфоліпіди та інші ліпіди, які можуть допомогти стабілізувати клітинну мембрану сперматозоїдів під час заморожування та розморожування [193]. Припускають, що ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ) взаємодіють з мембраною сперматозоїдів і забезпечують їх захист шляхом стабілізації мембрани. Друга гіпотеза припускає, що фосфоліпіди, присутні в ЛПНЩ, захищають сперматозоїди, утворюючи захисну плівку на поверхні сперматозоїдів або замінюючи фосфоліпіди мембрани сперматозоїдів, які втрачаються або пошкоджуються в процесі кріоконсервування. Вважається, що фосфоліпіди з яєчного жовтка можуть зливатися з мембраною сперматозоїда, замінюючи частину фосфоліпідів сперматозоїдів і, таким чином, знижуючи їхню температуру фазового переходу. Третій механізм захисту припускає, що ЛПНЩ захоплює шкідливі білки, присутні в насіннєвій плазмі, покращуючи таким чином здатність сперматозоїдів до заморожування [194]. Точний механізм, за допомогою якого ЯЖ зберігає сперматозоїди під час заморожування–відігріву, невідомий [195]. Повідомлялося, що включення холестерину в середовище кріоконсервування є альтернативою для підвищення стабільності плазматичної мембрани сперматозоїдів у різних видів [196].

Визначення фрагментації ДНК сперматозоїдів стало важливим біомаркером стану їх генетичного апарату [197]. Фрагментація – це розрив або пошкодження ланцюга ДНК. Із збільшенням кількості пошкоджень, ступінь цілісності генетичного матеріалу зменшується, оскільки геном сперматозоїдів є дуже чутливим до пошкоджень в структурі ДНК з причини

відсутності репаративної системи. Для зменшення ймовірності пошкодження ДНК хроматин статевих клітин понадконденсується та упаковується за допомогою протамінів [198]. Проте при виникненні розривів ДНК може відбуватися змінена експресія генів у ембріонах, отриманих після запліднення ооцитів сперматозоїдами з порушеною ДНК. Невелика кількість пошкоджень (~ 8%) в ДНК сперматозоїдів може бути виправлена після запліднення за рахунок репаративних систем яйцеклітини. Збільшення частоти хромосомних анеуплоїдій може виникнути при підвищеній кількості фрагментованої ДНК сперматозоїда та похибок геному ооциту [199]. В такому випадку, нерепарована ДНК сперматозоїда призведе до зниження життєздатності ембріона або летального результату [200]. Тому важливим було дослідження рівня фрагментації ДНК в сперматозоїдах цівів зааненської та альпійської породи, з урахуванням сезонності парування. Виявилося, що у парувальний сезон частота фрагментації ДНК сперматозоїдів є значущо меншою, порівняно з результатами непарувального сезону. Було виявлено, що навесні відмічається нижча фрагментація ДНК та вищі показники настання вагітності [138]. Крім того, еякуляти з найбільшою кількістю клітин з фрагментованою ДНК мали найнижчі рівні фертильності протягом сезону розмноження. Сезонність стану ДНК сперматозоїдів нещодавно була підтверджена і для інших ссавців [201].

В нашому дослідженні частота розвитку бластоцист на 7 добу культивування *in vitro* в обидва сезони, після використання свіжовиділених та кріоконсервованих сперматозоїдів для запліднення, була вищою на 50%, що відповідає даним, отриманим іншими дослідниками [202]. Частота настання вагітності у кіз–реципієнтів в нашому дослідженні співпадає з даними літератури. Так, М. Morais зі співавт. відзвітувалася про частоту вагітності 32,1% після нехірургічного трансферу ембріонів кіз породи Тоггенбург у Бразилії [203]. Усі вагітні кози у зазначеному дослідженні народили козенят. Вчені не вказували сезон, у який було проведене дослідження, проте виявили, що якість ембріонів вплинула на частоту

настання вагітності. R. Rahman зі співавт. виявили, що у 26,67% кіз–реципієнтів змішаної породи (бурська локальна порода) вагітність настає за умови, що кози–реципієнти не мали попередніх оперативних втручань, таких як лапараскопічне отримання яйцеклітин та хірургічні трансфери ембріонів [204]. Проте, J. P. Greyling зі співавт. повідомили про майже вдвічі вищу частоту настання вагітності, ніж в нашому дослідженні, для двох порід кіз Південної Африки – 60–67% [205]. В експериментах китайських вчених, які досліджували вплив транспортування донорів, реципієнтів та ембріонів між фермами Китаю, на частоту вагітності бурських кіз, вони показали, результат вагітності 42–80% [206]. Важливо зазначити, що в даних дослідженнях використовували ембріони отримані *in vivo*, тобто шляхом вимивання ембріонів після індукції суперовуляції та осіменіння донорів. Показано, що такі ембріони мають вищий потенціал до імплантації, ніж ембріони, створені *in vitro* [207]. Також треба звернути увагу, що в згаданих вище дослідженнях, ембріони однієї породи переносили козам–реципієнтам тієї ж породи. І хоча всі породи, які використовують у сільському господарстві, відносяться до одного виду – *Capra hircus*, існує внутрішньовидова різниця метаболічної активності клітин [208, 209], яка, імовірно, опосередковано впливає на експресію білків–рецепторів на поверхні ендометрію [210, 211] та ембріонів, що може призводити до зниження імплантації.

Уперше у світі, після застосування отриманого в дисертаційному дослідженні підходу щодо урахування сезонності під час кріоконсервування сперматозоїдів та запліднення ооцитів *in vitro*, було отримано вагітність у кіз місцевої української породи, які народили здорових козенят зааненської породи.

Біотехнологія відтворення тварин, одним із важливих етапів якої є кріоконсервування, є предметом постійних досліджень і може вимагати постійного удосконалення та оптимізації, як кріозахисних середовищ, температури охолодження та відігріву, способу зберігання, кріоносія та інших технологічних етапів з метою досягнення найкращих результатів.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети і задач наведено нові дані щодо сезонної варіабельності кріорезистентності сперматозоїдів цапів зааненської та альпійської порід:

1. Цапи (*Capra hircus*) альпійської породи, порівняно з зааненською, характеризувалися значущо вищими показниками об'єму еякуляту, загальної кількості сперматозоїдів, їх рухливості, життєздатності та цілісності їх ДНК. Самці обох порід мали значущо вищі сперміологічні характеристики у парувальний сезон, порівняно з непарувальним.
2. У парувальний сезон рухливість та життєздатність сперматозоїдів цапів обох порід значущо знижувалися після 40 хв експозиції з розчинами 5% гліцерину та етиленгліколю та 30 хв – з розчинами 10% гліцерину та етиленгліколю, а в непарувальний сезон – після 30 та 20 хв експозиції з зазначеними кріозахисними розчинами, відповідно.
3. Після кріоконсервування найвища частота виживання сперматозоїдів була виявлена при використанні кріозахисного розчину 10% гліцерину, при цьому рухливість сперматозоїдів зааненської породи, кріоконсервованих у парувальний та непарувальний сезони, становила  $64,23 \pm 6,1$  та  $(24,49 \pm 2,7)\%$ , життєздатність  $77,23 \pm 6,1$  та  $(40,49 \pm 3,1)\%$ , рівень фрагментації ДНК  $5,3 \pm 0,28$  та  $(7,1 \pm 0,46)\%$ , відповідно ( $p < 0,05$ ), а для альпійської породи:  $57,15 \pm 5,6$  та  $(31,43 \pm 5,75)\%$ ,  $68,15 \pm 7,1$  та  $(41,43 \pm 6,1)\%$  і  $5,9 \pm 0,51$  та  $(10,8 \pm 1,1)\%$ , відповідно.
4. Біохімічні характеристики сім'яної плазми еякулятів цапів відрізнялися залежно від сезону отримання сперми та корелювали з життєздатністю сперматозоїдів після кріоконсервування. У цапів зааненської породи значуще знижувалися кількісні біохімічні показники сім'яної плазми у непарувальний сезон, порівняно з парувальним: вміст альбуміну у 5,2 разів, глобуліну та загального білку – у 5,1, глюкози – у 2,3, фруктози – у 2,7, ( $p < 0,05$ ), холестерину – у 11,5, ( $p < 0,01$ ). У цапів альпійської

породи у непарувальний сезон значуще зменшувалися кількісні показники альбуміну – у 4,1, глобуліну – у 3,8, загального білку – у 3,9, глюкози – у 2,5, фруктози – у 3,3, ( $p < 0,05$ ), холестерину – у 12,1 разів, ( $p < 0,01$ ), порівняно з парувальним.

5. Відносний рівень транскриптів гену HSP 90 знижувався у непарувальний сезон на 25% у сперматозоїдах ців зааненської породи та на 40% – у альпійської.
6. Додавання 20% яєчного жовтка до складу кріопротекторного середовища у непарувальний сезон дозволяла зберегти рухливість, життєздатність та рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів після кріоконсервування на рівні  $36,5 \pm 2,7$  і  $(53,1 \pm 6,1)\%$ ;  $46,9 \pm 3,1$  і  $(53,1 \pm 6,1)\%$ ;  $5,6 \pm 0,34$  і  $(7,6 \pm 0,65)\%$  для ців зааненської та альпійської порід, відповідно, що були значуще вищими показниками, порівняно з такими після кріоконсервування у середовищі без додавання яєчного жовтка.
7. Частота розвитку ембріонів була значуще вищою при заплідненні ооцитів парувального сезону свіжоотриманими  $(82,6 \pm 3,7)\%$  та кріоконсервованими  $(71,9 \pm 9,2)\%$  сперматозоїдами того ж сезону, порівняно з цим параметром при використанні кріоконсервованих сперматозоїдів непарувального сезону  $(57,9 \pm 9,7)\%$  ( $p < 0,05$ ). Найнижчий рівень розвитку ембріонів спостерігали при заплідненні ооцитів, отриманих у непарувальний сезон, кріоконсервованими у той самий сезон сперматозоїдами –  $(53,5 \pm 6,5)\%$ . Після трансплантації ембріонів в порожнину рогу матки частота настання вагітності та окоту не були сезоннозалежними при використанні свіжоотриманої чи кріоконсервованої сперми.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Слинько ВГ. Харчова цінність козиного молока. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: збірник наукових праць Харківської державної зооветеринарної академії*. 2016;32(1):125–131.
2. Roy D, Ye A, Moughan PJ, Singh H. Composition, structure, and digestive dynamics of milk from different species—A review. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7: 577759. DOI: [10.3389/fnut.2020.577759](https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577759)
3. Lad SS, Aparnathi KD, Mehta B, Velpula S. Goat milk in human nutrition and health—a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2017;6(6):1781–92. DOI: [10.20546/ijcmas.2017.605.194](https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.194)
4. Гузеєв ЮВ, Вінничук ДТ. Козівництво—перспективна галузь тваринництва України. Тваринництво, кормовиробництво, збереження та переробка продукції тваринництва. *Таврійський науковий вісник: Науковий журнал*. 2013;83:161–165. Доступно на: [https://www.tnv-agro.ksauniv.ks.ua/archives/83\\_2013/32](https://www.tnv-agro.ksauniv.ks.ua/archives/83_2013/32)
5. Федорович Є, Салига Ю, Федорович В, Мазур Н, Боднар П. Розвиток козівництва в Україні. *Вісник аграрної науки*. 2022;100(2):42–49. DOI: [10.31073/agrovisnyk202202-06](https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202202-06)
6. Paramio MT, Izquierdo D. Assisted reproduction technologies in goats. *Small Ruminant Research*. 2014;121(1):21–26. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2014.01.002](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.01.002)
7. Baldassarre H, Karatzas CN. Advanced assisted reproductive technologies (ART) in goats. *Anim. Rep. Sci.* 2004;82:255–266. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2004.04.027](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.027)
8. Gangwar C, Ranjan R, Kharche SD, Pourouchottamane R, Rai B. Success of artificial insemination in Goats: An overview. *Indian Journal of Small Ruminants (The)*. 2023;29(1):1–10. DOI: [10.5958/0973-9718.2023.00017.X](https://doi.org/10.5958/0973-9718.2023.00017.X)
9. Bathgate R, Mace N, Heasman K, Evans G, Maxwell WMC, De Graaf SP. Birth of Kids After Artificial Insemination with Sex-Sorted, Frozen-Thawed

- Goat Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013;48(6):893–898. DOI: [10.1111/rda.12182](https://doi.org/10.1111/rda.12182)
- 10.Кошевой ВП, Скляр ПМ, Науменко СВ. Особливості функції розмноження овець і кіз. Проблеми відтворення та шляхи їх вирішення: Ч. 2. *Харківська державна зооветеринарна академія*. Харків: Гамалія; 2011:136–461. Доступно на: <https://dspace.dsau.dp.ua/handle/123456789/778>
- 11.Hashemi M, Safdarian M, Kafi M. Estrous response to synchronization of estrus using different progesterone treatments outside the natural breeding season in ewes. *Small Rumin. Res.* 2006;65(3):279–283. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2005.07.051](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.051)
- 12.Iritani A, Nishikawa Y, Nagasawa S. Studies on the egg–yolk coagulating enzyme in goat semen. VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non–breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jap. J. Anim. Reprod.* 1964;10:52–56.
- 13.Kopeika, E. F., Petrushko, M. P., Piniayev, V. I. et al. Cryopreservation of reproductive cells and embryos of laboratory, agricultural and wild animals. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2019; 29(1):3–18. DOI: [10.15407/cryo29.01.003](https://doi.org/10.15407/cryo29.01.003)
- 14.Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Rum. Res.* 2006;63(3):215–225. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2005.02.015](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015)
- 15.Ntemka A, Tsakmakidis IA, Kiossis E, Milovanović A, Boscos CM. Current status and advances in ram semen cryopreservation. *Journ. Hel. Vet. Med. Soc.* 2018;69(2):911–924. DOI: [10.12681/jhvms.18014](https://doi.org/10.12681/jhvms.18014)
- 16.Aguiar GV, van Tilburg MF, Catunda AGV, Celes CKS, Lima ICS, Campos ACN, Moura AAA, Araujo AA. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2013;65(1):6–12. DOI: [10.1590/S0102-09352013000100002](https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000100002)

17. Tuli RK, Holtz W. Effect of season on the freezability of Boar goat semen in the Northern temperature zone. *Theriogenology*. 1995;43(8):1359–1363. DOI: [10.1016/0093-691X\(95\)00120-W](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00120-W)
18. Bogdaniuk A, Garkavii V, Petrushko M. Seasonal Variability in Cryoresistance of Saanen Goats Spermatozoa and Reproductive Characteristics. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2022;32(1):34–43. DOI: [10.15407/cryo32.01.034](https://doi.org/10.15407/cryo32.01.034)
19. Bogdaniuk AO, Yurchuk TO, Petrushko MP. Seasonal Differences in Sperm Characteristics and the Level of DNA Fragmentation in Fresh and Cryopreserved Sperm of Saanen Goats. *Cytology and Genetics*. 2022;56(5):410–416. DOI: [10.3103/S009545272205003](https://doi.org/10.3103/S009545272205003)
20. Bogdaniuk A, Petrushko M. Morphological and morphometric characteristics of fresh and cryopreserved spermatozoa of saanen bucks. *Agricultural Science and Practice*. 2022;9(3):29–35. DOI: [10.15407/agrisp9.03.029](https://doi.org/10.15407/agrisp9.03.029)
21. Bogdaniuk A, Garkavii V, Petrushko M. Reproductive characteristics of Saanen and Alpine bucks. *Biologiya Tvarin*. 2023;25(3):8–13. DOI: [10.15407/animbiol25.03.008](https://doi.org/10.15407/animbiol25.03.008)
22. Bogdaniuk AO, Berestovyy OO, Tsvik VV. Kinetic Characteristics of Spermatozoa of Saanen Goats After Cryopreservation. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019;29(2):169. DOI: [10.15407/cryo29.02.169](https://doi.org/10.15407/cryo29.02.169)
23. Bogdaniuk A, Garkavii V, Tsvyk V. Effect of Sucrose and Glycerol Based Cryoprotective Media on Kinetic Characteristics of Saanen Goat Spermatozoa. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020;30(3):283. DOI: [10.15407/cryo30.03a.283](https://doi.org/10.15407/cryo30.03a.283)
24. Bogdaniuk A, Garkavii V. The kinetic characteristics of semen from Saanen and Alpine goats after cryopreservation in different freezing media. *Cryobiology*. 2020;97:298. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.10.189](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.189)

25. Bogdaniuk A, Garkavii V. Embryo development rate after fertilization with fresh vs. Frozen sperm in goats. *Cryoletters*. 2021;42(6):376. Available online: <http://www.cryoletters.org/sltb-2020-42-6-366-379-abstracts.pdf>
26. Богданюк АО, Гарькавий ВВ. Цитотоксичний вплив гліцерину на рухливість сперматозоїдів самців кіз. *Матеріали XVII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини»*. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2020:40–41.
27. Bogdaniuk A, Garkavii V, Petrushko M. Pregnancy Rate After Transfer of In Vitro Produced Goat Embryos Using Fresh Vs Frozen Sperm In Different Seasons. *Cryobiology*. 2021;103:182. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2021.11.087](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.11.087)
28. Богданюк АО, Гарькавий ВВ. Кріорезистентність сперматозоїдів цапів зааненської породи у нестатевий сезон. *Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини»*. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2021:25.
29. Bogdaniuk AO, Yurchuk TO, Petrushko MP. DNA fragmentation rate of goat spermatozoa after cryopreservation with egg yolk contained and egg yolk-free cryoprotective media. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation. *Biopolymers and Cell*. 2021;37(3):185. DOI: [10.7124/bc.000A56](https://doi.org/10.7124/bc.000A56)
30. Bogdaniuk A, Petrushko M. Morphological characteristics of freshly isolated and cryopreserved spermatozoa of Saanen bucks in different seasons. *Cryobiology*. 2022;109:69. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2022.11.221](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.221)
31. Bogdaniuk A, Petrushko M. Seasonal variation of morphometrical characteristics of fresh and cryopreserved Saanen goat sperm. *Anim Reprod*. 2022;19(2):e22217. Available online: <https://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/62fe8726a953957f0c02b102.pdf>
32. Богданюк АО, Петрушко МП. Сезонні зміни біохімічних показників сім'яної плазми цапів та їх вплив на характеристики сперматозоїдів.

- Матеріали XIX Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини». Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2022:94–96.*
33. Богданюк АО, Юрчук ТО, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів кіз, як метод природоохоронної біотехнології. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали II міжнародної наук.–практ. інтернет–конф. (20 травня 2022 р., м. Харків).* 2022:66.
  34. Богданюк АО, Гаркавий ВВ, Петрушко МП. Репродуктивні характеристики сперматозоїдів цапів залежать від породи. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XX Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців. (25–26 травня 2023 р., м. Харків, Україна). Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2023:25.*
  35. Bogdaniuk AO, Petrushko MP, Garkavii VV. Cryotolerance of spermatozoa varies according to the breed of goat. *Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи: збірник тез доповідей всеукр. наук.–практ. конф. науковців, викладачів та аспірантів, 23 травня 2023 р. Харків: ДБТУ. 2023:26–27. Доступно на: <https://repo.btu.kharkov.ua//handle/123456789/36580>*
  36. Bogdaniuk A, Garkavii V, Berestovoyy O, Tsvyk V, Yusifli N, Sigunov O, Kramareva O, Petrushko M. Kidding after Transfer of in Vitro Produced Saanen Goat Embryos into Local Ukrainian Breed Recipients in Different Seasons. *Open Journal of Ecology.* 2023;13(8):549–559. DOI: [10.4236/oje.2023.138034](https://doi.org/10.4236/oje.2023.138034)
  37. Bogdaniuk A, Berestovoyy O, Tsvyk V, Garkavii V, Yusifli N, Sigunov O, Kramareva O, Boiko D. Birth of kids after laparoscopic transfer of in vitro produced Saanen embryos into surrogate goats of Ukrainian local breed. *Reproduction In Domestic Animals.* 2021;57(S1):46. DOI: [10.1111/rda.14052](https://doi.org/10.1111/rda.14052)
  38. Bogdaniuk A, Garkavii V, Petrushko M. In vitro fertilization of Saanen goat oocytes in non–breeding season with epididymal spermatozoa. Abstracts of

- The 1st Ukrainian–Polish Scientific Forum AGROBIOPERSPECTIVES. *The Animal Biology*. 2021;23(3):15. DOI: [10.15407/animbiol23.03](https://doi.org/10.15407/animbiol23.03)
39. Bogdaniuk A, Garkavii V. Seasonality in kidding after transfer of in vitro produced Saanen goat embryos into recipients of local Ukrainian breed. *Reproduction In Domestic Animals*. 2022;57(S4):59–60. DOI: [10.1111/rda.14243](https://doi.org/10.1111/rda.14243)
  40. Bogdaniuk AO, Petrushko MP, Garkavii VV. Correlation between biochemical parameters of seminal plasma and cryoresistance of spermatozoa of Saanen bucks. *47th Annual International Conference of Young Scientists «Cold in Biology and Medicine: Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology»* 2023:5.
  41. Dubeuf J-P, Boyazoglu J. An international panorama of goat selection and breeds. *Livestock Science*. 2009;120(3):225–231. DOI: [10.1016/j.livsci.2008.07.005](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.07.005)
  42. Boyazoglu J, Hatziminaoglou Y. The goat in ancient civilisation from the Fertile Crescent to the Aegean Sea. *Small Rumin. Res.* 2004;51(2):123–129. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2003.08.006](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.006)
  43. Aziz MA. Present status of the world goat populations and their productivity. *World*. 2010;45(2):42–52. Available online: [https://lohmanna-information.de/content/l\\_i\\_45\\_artikel17.pdf](https://lohmanna-information.de/content/l_i_45_artikel17.pdf)
  44. Dubeuf J-P, Morand-Fehr P, Rubino R. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Rumin. Res.* 2004;51(2):165–173. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2003.08.007](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.007)
  45. FAOSTAT [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: [www.fao.org/faostat/](http://www.fao.org/faostat/)
  46. Gall C. Goat Breeds Around the World; CTA; Margraf/FAO: Weikersheim, Germany. 1996:186.
  47. Ziadi C, Muñoz-Mejías E, Sánchez M, López M. D, González-Casquet O, Molina A. Selection criteria for improving fertility in Spanish goat breeds:

- estimation of genetic parameters and designing selection indices for optimal genetic responses. *Animals*. 2021;11(2):409. DOI: [10.3390/ani11020409](https://doi.org/10.3390/ani11020409)
48. Amiri Ghanatsaman Z, Ayatollahi Mehrgardi A, Asadollahpour Nanaei H, Esmailizadeh A. Comparative genomic analysis uncovers candidate genes related with milk production and adaptive traits in goat breeds. *Scientific Reports*. 2023;13(1):8722. DOI: [10.1038/s41598-023-35973-0](https://doi.org/10.1038/s41598-023-35973-0)
49. Brito LF, Kijas JW, Ventura RV, Sargolzaei M, Porto-Neto LR, Cánovas A, Schenkel FS. Genetic diversity and signatures of selection in various goat breeds revealed by genome-wide SNP markers. *BMC genomics*. 2017;18:1–20. DOI: [10.1186/s12864-017-3610-0](https://doi.org/10.1186/s12864-017-3610-0)
50. Zonaed Siddiki A, Miah G, Islam M, Kumkum M, Rumi MH, Baten A, Hossain MA. Goat Genomic Resources: The Search for Genes Associated with Its Economic Traits. *Int. J. Genom*. 2020;2020:5940205. DOI: [10.1155/2020/5940205](https://doi.org/10.1155/2020/5940205)
51. Zi XD, Hu L, Lu JY, Liu S, Zheng YC. Comparison of the sequences and expression levels of genes related to follicular development and atresia between prolific and nonprolific goat breeds. *Vet Med Sci*. 2020;6(2):187–195. DOI: [10.1002/vms3.225](https://doi.org/10.1002/vms3.225).
52. Ngoma L, Kambulu L, Mwanza M. Factors Influencing Goat's Semen Fertility and Storage: A Literature Review. *Journal of Human Ecology*. 2016;56(1–2):114–125. DOI: [10.1080/09709274.2016.1190704](https://doi.org/10.1080/09709274.2016.1190704)
53. Fatet A, Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B. Reproductive cycle of goats. *Animal reproduction science*. 2011;124(3–4):211–219. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2010.08.029](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.029)
54. Chemineau P, Malpaux B, Brillard J, Fostier A. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. *Animal*. 2007;1(3):419–432. DOI: [10.1017/s1751731107691873](https://doi.org/10.1017/s1751731107691873)
55. Leboeuf B, Delgadillo J, Manfredi E, Piacre A, Clment V, Martin P, de Cremoux R. Management of Goat Reproduction and Insemination for

- Genetic Improvement in France. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008;43(S2):379–385. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2008.01188.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01188.x)
56. Delgadillo JA, Cortez ME, Duarte G, Chemineau P, Malpaux B. Evidence that photoperiod controls annual changes in testosterone secretion and body weight in subtropical male goats. *Reprod Nutr Dev*. 2004;44(3):183–193. DOI: [10.1051/rnd:2004024](https://doi.org/10.1051/rnd:2004024)
57. Leboeuf B, Furstoss V, Guillouet P, Boue' P. Production of semen for artificial insemination from Alpine and Saanen bucks under different photoperiodic cycles. *S Afr J Anim Sci*. 2004;34(5):230–232.
58. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by short photoperiodic cycles in he-goats. *Small Ruminant Res*. 1992;9(1):47–59. DOI: [10.1016/0921-4488\(92\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0921-4488(92)90055-9)
59. Farsi H, Mhani M, Achaaban MR, Boukhliq R, Tibary A, El Allali K. Environmental cues and seasonal patterns of reproduction in goats. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*. 2018;6(2):158–167. Available online: [https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes\\_IAVH2/article/view/652/606](https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes_IAVH2/article/view/652/606)
60. Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenology*. 2009;71(8):1316–1325. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2009.01.007](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.007)
61. Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzman JL, Malpaux B. Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. *Theriogenology*. 2009;72(7):910–918. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2009.05.020](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.020)
62. Vivien-Roels B, Pévet P. The pineal Gland and the synchronization of reproductive cycles with variations of the environmental climatic conditions, with special reference to temperate. *Pineal. Res. Rev*. 1983;1:91–143.

- 63.Chemineau P, Bodin L, Migaud M, Thiéry JC, Malpaux B. Neuroendocrine and Genetic Control of Seasonal Reproduction in Sheep and Goats. *Reprod. Dom. Anim.* 2010;45(S3):42–49. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2010.01661.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01661.x)
- 64.Nakao N, Ono H, Yoshimura T. Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions. *Reprod.* 2008;136:1–8. DOI: [10.1530/REP-08-0041](https://doi.org/10.1530/REP-08-0041)
- 65.Martin GB, Rodger J, Blache D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod. Fertil. Develop.* 2004;16(4):491–501. DOI: [10.1071/RD04035](https://doi.org/10.1071/RD04035)
- 66.María TRL, Martha ODG, Jorge UM, Héctor VÁ, Héctor GV, Eugenio VAM, Carlos FAF, Francisco JEM. Seasonal variation in ovulatory activity of nubian, alpine and nubian × criollo does under tropical photoperiod (22°N). *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 2011;14(3):973–998. Available online: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93921493020>
- 67.Bazer FW. Reproductive physiology of sheep (*Ovis aries*) and goats (*Capra aegagrus hircus*). *Animal Agriculture.* 2020;199–209. DOI: [10.1016/B978-0-12-817052-6.00011-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00011-2)
- 68.Zhao W, Adjei M, Zhang Z, Yuan Z, Cisang Z, Song T. The role of GnRH in Tibetan male sheep and goat reproduction. *Reprod Domest Anim.* 2023;58(9):1179–1187. DOI: [10.1111/rda.14432](https://doi.org/10.1111/rda.14432)
- 69.Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of reproduction.* 2000;5(1):46–52. DOI: [10.1530/revreprod/5.1.46](https://doi.org/10.1530/revreprod/5.1.46)
- 70.Yáñez–Ortiz I, Catalán J, Rodríguez–Gil JE, Miró J, Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science.* 2022;246:106904. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2021.106904](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904)
- 71.Redden R, Thorne JW. Reproductive management of sheep and goats. *Animal Agriculture: Sustainability, Challenges and Innovations.* 2020;211–230. DOI: [10.1016/B978-0-12-817052-6.00012-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00012-4)

- 72.Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 2009;10:49–62. DOI: [10.1007/s10561-008-9081-4](https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4)
- 73.Saraswat S, Jindal SK, Kharche SD. Cryopreservation Of Sperm In Ruminants–A Review. *Wayamba Journal of Animal Science*. 2013;5:753–767. Available online: <http://www.wayambajournal.com/>
- 74.Kopeika EF, Petrushko MP, Piniayev VI, Yurchuk TO, Pavlovich OV, Mikson KB, Butskiy KI, Hapon HO, Puhovkin AY. Cryopreservation of Reproductive Cells and Embryos of Laboratory, Agricultural and Wild Animals. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019;29(1):3–18. DOI: [10.15407/cryo29.01.003](https://doi.org/10.15407/cryo29.01.003)
- 75.Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*. 1986;26(6):823–827. DOI: [10.1016/0093-691X\(86\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90011-7)
- 76.Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reproduction Nutrition Development*. 1994;34(5):491–500. DOI: [10.1051/rnd:19940510](https://doi.org/10.1051/rnd:19940510)
- 77.Singh MP, Sinha AK, Singh BK. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*. 1995;43(6):1047–1053. DOI: [10.1016/0093-691x\(95\)00068-j](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00068-j)
- 78.Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949;164:666. DOI: [10.1038/164666a0](https://doi.org/10.1038/164666a0)
- 79.Khan IM, Cao Z, Liu H, Khan A, Rahman SU, Khan MZ, Sathanawongs A and Zhang Y. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze–Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo–Tolerance in Farm Animals. *Front. Vet. Sci*. 2021;8:609180. DOI: [10.3389/fvets.2021.609180](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180)
- 80.Büyükleblebici S, Tuncer PB, Taşdemir U, Özgürtaş T, Durmaz E, & Büyükleblebici O. The comparison of three different cryoprotectants in cryopreservation of angora goat semen. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2014;20(4):613–619. DOI: [10.9775/kvfd.2014.10727](https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.10727)

81. Sikarwar AKS, Ramachandran N. Cryoprotectants used in buck semen preservation: A review. *Indian Journal of Small Ruminants (The)*. 2020;26(2):142–156. DOI: [10.5958/0973-9718.2020.00025.2](https://doi.org/10.5958/0973-9718.2020.00025.2)
82. Roy A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*. 1957;179:318–319. DOI: [10.1038/179318b0](https://doi.org/10.1038/179318b0)
83. Nunes JF, Corteel JM, Combarnous Y, Baril G. Role ^ du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoids de bouc. *Reprod. Nutr. Dev.* 1982;22:611–620. Available online: <https://rnd.edpsciences.org/>
84. Iritani A, Nishikawa. Studies on the egg yolk coagulating factors in goat semen: II properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulation. *Proceedings of Silver Jubilee Laboratory of Animal Husbandry, Kyoto University*. 1961;104:97–104.
85. Pellicer–Rubio MT, Magallon T, Combarnous Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60–kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 1997;57(5):1023–1031. DOI: [10.1095/biolreprod57.5.1023](https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.1023)
86. Juyena NS, Stelletta C. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *J Androl.* 2012;33(4):536–551. DOI: [10.2164/jandrol.110.012583](https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583)
87. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006;73(10):1338–1344. DOI: [10.1002/mrd.20565](https://doi.org/10.1002/mrd.20565)
88. Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*. 2014;68(2):276–280. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2014.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.008)
89. Chelucci S, Pasciu V, Succu S, Addis D, Leoni GG, Manca ME, Berlinguer F. Soybean lecithin–based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen

- cryopreservation. *Theriogenology*. 2015;83(6):1064–1074. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2014.12.012](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.012)
90. Valle I, Gómez-Durán A, Holt WV, et al. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *J Androl*. 2012;33(4):717–725. DOI: [10.2164/jandrol.111.014944](https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014944)
91. Hafez ESE. Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryos. *Reproduction in Farm Animals 7th Edition*. 2000; 431–442. DOI: [10.1002/9781119265306.ch30](https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch30)
92. Verheyen G. Sperm cryobanking. Male Infertility: Sperm Diagnosis, Management and Delivery. *IVF Lite*. 2014;1(3):93–102. Available online: <http://www.ivflite.org>
93. McLaughlin EA. Cryopreservation and storage of sperm. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. Martin Dunitz, London. 2001; 261–272.
94. Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci* 2012;130(3–4):187–192. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2012.01.014](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.014)
95. Sharafi M, Borghei–Rad SM, Hezavehei M, Shahverdi A, Benson JD. Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*. 2022;12(23):3271. DOI: [10.3390/ani12233271](https://doi.org/10.3390/ani12233271)
96. Khalil WA, El–Harairy MA, Zeidan AE, Hassan MA, Mohey–Elsaeed O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2018;6:49–56. DOI: [10.1016/j.ijvsm.2017.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001)
97. Yeste M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 2016;85(1):47–64. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2015.09.047](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047)

- 98.Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*. 2012;64(2):71–80. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2011.12.002](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.12.002)
- 99.Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science*. 2008;105(1–2):119–128. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2007.11.010](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010)
- 100.Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018;37(3), 327–339. DOI: [10.1016/j.rbmo.2018.05.012](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012)
- 101.McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biology of reproduction*. 2010;82(3):644–651. DOI: [10.1095/biolreprod.109.080507](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080507)
- 102.Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod. Biomed. Online*. 2010;21(4):456–462. DOI: [10.1016/j.rbmo.2010.05.011](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.011)
- 103.Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2008;25:403–411. DOI: [10.1007/s10815-008-9232-3](https://doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3)
- 104.Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. Freezing–thawing induces alterations in histone H1–DNA binding and the breaking of protein–DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology*. 2011;76(8):1450–1464. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2011.05.039](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.039)
- 105.Yurchuk TO, Pavlovich OV, Gapon GO, Pugovkin AY, Petrushko MP. Lipid peroxidation and DNA fragmentation in fresh and cryopreserved spermatozoa of men at different spermatogenesis state. *Ukr.Biochem.J.* 2021;93(3):24–29. DOI: [10.15407/ubj93.03.024](https://doi.org/10.15407/ubj93.03.024)

106. Dessouki ShM, Ashour G, El-Gayar M, El-Azzazi FE-H, Kodi E and Ghanem N. Gene Expression Profile and Enzymatic Activities of Frozen Buck Sperm Supplemented with Melatonin in Cold and Hot Temperatures. *World Vet. J.* 2020;10(1):125–136. DOI: [10.36380/scil.2020.wvj17](https://doi.org/10.36380/scil.2020.wvj17)
107. Chen X, Zhu H, Hu C, Hao H, Zhang J, Li K, Zhao X, Qin T, Zhao K, Zhu H, Wang D. Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by itraq-coupled 2d lc-ms/ms. *Reproduction.* 2014;147:321–330. DOI: [10.1530/REP-13-0313](https://doi.org/10.1530/REP-13-0313)
108. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller Jr RR. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction.* 2006;131(5):887–894. DOI: [10.1530/rep.1.01049](https://doi.org/10.1530/rep.1.01049)
109. Dorado J, Munoz-Serrano A, Hidalgo M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal reproduction science.* 2010;121(1–2):115–123. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2010.04.182](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.182)
110. Hitit M, Ugur MR, Dinh TTN, Sajeev D, Kaya A, Topper E, Memili E. Cellular and functional physiopathology of bull sperm with altered sperm freezability. *Frontiers in Veterinary Science.* 2020;7:581137. DOI: [10.3389/fvets.2020.581137](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.581137)
111. Recuero S, Fernandez-Fuertes B, Bonet S, Barranco I, Yeste M. Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology.* 2019;137:36–42. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2019.05.035](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.035)
112. Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod.* 2009;80(3):394–397. DOI: [10.1095/biolreprod.108.074088](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074088)
113. Plante G, Prud'homme B, Fan J, Lafleur M, Manjunath P. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell and Tissue Research.* 2016;363:105–127. DOI: [10.1007/s00441-015-2289-2](https://doi.org/10.1007/s00441-015-2289-2)

- 114.Dar MR, Singh M, Sharma R, Thakur S, Sheikh AA, Bhat SA. Bovine fertility as regulated by sperm binding proteins: a review. *Asian J Anim Vet Adv.* 2018;13(1):6–13. DOI: [10.3923/ajava.2018.6.13](https://doi.org/10.3923/ajava.2018.6.13)
- 115.Plante G, Lusignan MF, Lafleur M, Manjunath P. Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2015;13:1–13. DOI: [10.1186/s12958-015-0093-1](https://doi.org/10.1186/s12958-015-0093-1)
- 116.Boe–Hansen GB, Rego JPA, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, McGowan MR. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2–year–old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Animal Reproduction Science.* 2015;162:20–30. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2015.09.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.003)
- 117.Trougakos IP. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches—a mini–review. *Gerontology.* 2013;59(6):514–523. DOI: [10.1159/000351207](https://doi.org/10.1159/000351207)
- 118.Ugur MR, Dinh T, Hitit M, Kaya A, Topper E, Didion B, Memili E. Amino acids of seminal plasma associated with freezability of bull sperm. *Frontiers in cell and developmental biology.* 2020;7:347. DOI: [10.3389/fcell.2019.00347](https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00347)
- 119.Bilodeau J–F, Blanchette S, Gagnon C, Sirard M–A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology.* 2001;56(2):275–286. DOI: [10.1016/S0093-691X\(01\)00562-563](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-563)
- 120.Farshad A, Hosseini Y. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post–thaw Markhoz bucks semen quality. *Small Rumin. Res.* 2013;114(2–3):258–263. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2013.07.007](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.07.007)
- 121.El–Sheshtawy RI, El–Sisy GA, El–Nattat WS. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Glob. Vet.* 2008;2(4):146–150. Available online: <https://www.idosi.org/>

122. Santiago–Moreno J, Bernal B, Pérez–Cerezales S, Castaño C, Toledano–Díaz A, Estes MC. Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PLoS One*. 2009;14(1):e0209910. DOI: [10.1371/journal.pone.0209910](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209910)
123. Holt WV, Del Valle I, Fazeli A. Heat shock protein A8 stabilizes the bull sperm plasma membrane during cryopreservation: Effects of breed, protein concentration, and mode of use. *Theriogenology*. 2015;84(5):693–701. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.004)
124. Yeste M, Morató R, Rodríguez–Gil JE, Bonet S, Prieto–Martínez N. Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017;52(S4):12–27. DOI: [10.1111/rda.13082](https://doi.org/10.1111/rda.13082)
125. Prieto–Martínez N, Morató R, Muiño R, Hidalgo CO, Rodríguez–Gil JE, Bonet S, Yeste M. Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa: Identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reproduction, Fertility and Development*. 2017;29(6):1249–1259. DOI: [10.1071/RD16077](https://doi.org/10.1071/RD16077)
126. Vicente–Carrillo A, Ekwall H, Alvarez–Rodriguez M, Rodriguez–Martinez H. Membrane Stress During Thawing Elicits Redistribution of Aquaporin 7 But Not of Aquaporin 9 in Boar Spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim*. 2016;51(5):665–679. DOI: [10.1111/rda.12728](https://doi.org/10.1111/rda.12728)
127. Morató R, Prieto–Martínez N, Muiño R, Hidalgo CO, Rodríguez–Gil JE, Bonet S, Yeste M. Aquaporin 11 is related to cryotolerance and fertilising ability of frozen–thawed bull spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev*. 2018;30(8):1099–1108. DOI: [10.1071/RD17340](https://doi.org/10.1071/RD17340)
128. Vilagran I, Yeste M, Sancho S, Casas I, Rivera del Álamo MM, Bonet S. Relationship of sperm small heat–shock protein 10 and voltage–dependent anion channel 2 with semen freezability in boars. *Theriogenology*. 2014;82(3):418–426. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2014.04.023](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.023)

129. La Falci VS, Tortorella H, Rodrigues JL, Brandelli A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*. 2002;57(3):1035–1048. DOI: [10.1016/S0093-691X\(01\)00714-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00714-2)
130. Cabrera F, González F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reprod Domest Anim*. 2005;40(3):191–5. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2005.00544.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00544.x)
131. Domínguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sánchez E, Cesari A, Alberio RH. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen–thawed ram sperm. *Theriogenology*. 2008;69(5):564–573. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2007.11.010](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.010)
132. Rajoriya JS, Prasad JK, Ghosh SK, Perumal P, Kumar A, Kaushal S, Ramteke SS. Studies on effect of different seasons on expression of HSP70 and HSP 90 gene in sperm of Tharparkar bull semen. *Asian pacific journal of reproduction*. 2014;3(3):192–199. DOI: [10.1016/S2305-0500\(14\)60025-7](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60025-7)
133. Solanki GB, Singh VK, Kavani FS, Dhami AJ, Savsani HH, Kumar B, Patbandha TK. Seasonal influence on expression of heat shock proteins (HSP70 and HSP 90) vis-à-vis functional competence of Gir bull semen. *Anim Biotechnol*. 2023;3:1–10. DOI: [10.1080/10495398.2023.2218453](https://doi.org/10.1080/10495398.2023.2218453)
134. Пірова ЛВ, Сивик ТЛ. Технологія виробництва продукції дрібної рогатої худоби: методичні рекомендації та робочий зошит до практичних занять студентів біолого–технологічного факультету денної та заочної форм навчання освітнього ступеня «бакалавр» зі спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва» за кредитно–трансферною системою організації навчального процесу. 2018:57–60. Доступно на: <http://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/1389>
135. Wright JM. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. *Manual of the International Embryo Transfer Society, 4th Edition*. 2010:141–144.

- 136.NCBI [Електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- 137.Ковпак ВВ, Вальчук ОА, ДеркачСС, Жук ЮВ, Масалович ЮС. Біотехнологічні методи у ветеринарній репродуктології: навчальний посібник. 2020;45–54. Доступно на: <https://dglb.nubip.edu.ua/>
- 138.Crespo F, Quiñones–Pérez C, Ortiz I, Diaz–Jimenez M, Consuegra C, Pereira B, Dorado J, Hidalgo M. Seasonal variations in sperm DNA fragmentation and pregnancy rates obtained after artificial insemination with cooled–stored stallion sperm throughout the breeding season (spring and summer). *Theriogenology*. 2020;148:89–94. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2020.02.032](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.032)
- 139.Simões R, Feitosa WB, Siqueira AF, Nichi M, Paula–Lopes FF, Marques MG, Peres MA, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção ME. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*. 2013;146(5):433–41. DOI: [10.1530/REP-13-0123](https://doi.org/10.1530/REP-13-0123)
- 140.Alvarez Sedó C, Bilinski M, Lorenzi D, Uriondo H, Noblía F, Longobucco V, Lagar EV, Nodar F. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assist Reprod*. 2017;21(4):343–350. DOI: [10.5935/1518-0557.20170061](https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170061)
- 141.Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, Lowdell M, Mericka P, Petrenko A, Petrenko Y, Rogulska O, Stolzing A, Stacey GN. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med*. 2020;15(3):1463–1491. DOI: [10.2217/rme-2019-0145](https://doi.org/10.2217/rme-2019-0145)
- 142.Büyükleblebici S, Tuncer PB, Taşdemir U, Özgürtaş T, Durmaz E, Büyükleblebici O. The comparison of three different cryoprotectants in cryopreservation of angora goat semen. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 2014;20(4):613–619 DOI: [10.9775/kvfd.2014.10727](https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.10727)

- 143.Sharma A, Sood P, Chaudhary JK. Effect of different concentrations of glycerol in cryopreservation of Gaddi goat semen. *Journal of Veterinary Andrology*. 2020;5(1):1–6. Available online: <https://cesica.org/>
- 144.Sikarwar AKS,Ramachandran N. Cryoprotectants used in buck semen preservation: A review. *Indian Journal of Small Ruminants*. 2020;26(2):142–156. DOI: [10.5958/0973-9718.2020.00025.2](https://doi.org/10.5958/0973-9718.2020.00025.2)
- 145.Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreserv Biobank*. 2019;17(2):171–182. DOI: [10.1089/bio.2018.0113](https://doi.org/10.1089/bio.2018.0113)
- 146.Faigl V, Vass N, Jávör A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. Artificial insemination of small ruminants – a review. *Acta Vet Hung*. 2012;60(1):115–29. DOI: [10.1556/AVet.2012.010](https://doi.org/10.1556/AVet.2012.010)
- 147.Ahmad M, Nasrullah R, Riaz H, Sattar A, Ahmad N. Changes in motility, morphology, plasma membrane and acrosome integrity during stages of cryopreservation of buck sperm. *J S Afr Vet Assoc*. 2014;85(1):972. DOI: [10.4102/jsava.v85i1.972](https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.972)
- 148.Üstüner B, Nur Z, Alcay S, TOKER MB, Sagirkaya H, Soylu MK. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 2015;39(1):110–114. DOI: [10.3906/vet-1407-70](https://doi.org/10.3906/vet-1407-70)
- 149.Jiménez–Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García–Álvarez O, Maroto–Morales A, Iniesta–Cuerda M, Fernández–Santos MR, Montoro V, Pérez–Guzmán MD, Garde JJ. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Anim Reprod Sci*. 2016;167:103–108. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2016.02.013](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013)
- 150.Hong CY, Chiang BN, Turner P. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet*. 1984;2(8417–8418):1449–1451. DOI: [10.1016/s0140-6736\(84\)91634-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91634-9)
- 151.Konyali C, Tomás C, Blanch E, Gómez EA, Graham JK, Mocé E. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol–loaded

- cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology*. 2013;67(2):124–131. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.001)
- 152.Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*. 2000;63(5):1531–1537. DOI: [10.1095/biolreprod63.5.1531](https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1531)
- 153.Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(S2):57–66. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2010.01635.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01635.x)
- 154.Aguiar GV, van Tilburg MF, Catunda AGV, Celes CKS, Lima ICS, Campos ACN, Araújo AA. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2013;65(1):6–12. DOI: [10.1590/s0102-09352013000100002](https://doi.org/10.1590/s0102-09352013000100002)
- 155.Karagiannidis A, Varsakeli S, Karatzas G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*. 2000;53(6):1285–93. DOI: [10.1016/S0093-691X\(00\)00272-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00272-7)
- 156.Belkadi S, Safsaf B, Heleili N, Tlidjane M, Belkacem L, Oucheria Y. Seasonal influence on sperm parameters, scrotal measurements, and serum testosterone in Ouled Djellal breed rams in Algeria. *Vet World*. 2017;10(12):1486–1492. DOI: [10.14202/vetworld.2017.1486-1492](https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1486-1492)
- 157.Janett F, Thun R, Bettschen S, Burger D, Hassig M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. *Anim Reprod Sci*. 2003;77(3–4):213–21. DOI: [10.1016/s0378-4320\(03\)00039-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00039-3)
- 158.Al-Bulushi S, Manjunatha BM, de Graaf SP, Rickard JP. Reproductive seasonality of male dromedary camels. *Anim Reprod Sci*. 2019;202:10–20. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2018.12.013](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.013)

159. Fraser L, Strzeżek J, Filipowicz K, Mogielnicka-Brzozowska M, Zasiadczyk L. Age and seasonal-dependent variations in the biochemical composition of boar semen. *Theriogenology*. 2016;86(3):806–16. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2016.02.035](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.035)
160. Guh YJ, Tamai TK, Yoshimura T. The underlying mechanisms of vertebrate seasonal reproduction. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2019;95(7):343–357. DOI: [10.2183/pjab.95.025](https://doi.org/10.2183/pjab.95.025)
161. Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, Ghosh SK. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreserv Biobank*. 2019;17(6):603–612. DOI: [10.1089/bio.2019.0037](https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037)
162. Yoon J-W, Lee S-E, Kim W-J, Kim D-C, Hyun C-H, Lee S-J, Park H-J, Kim S-H, Oh S-H, Lee D-G, et al. Evaluation of Semen Quality of Jeju Black Cattle (JBC) to Select Bulls Optimal for Breeding and Establish Freezing Conditions Suitable for JBC Sperm. *Animals*. 2022;12(5):535. DOI: [10.3390/ani12050535](https://doi.org/10.3390/ani12050535)
163. Erdem Öztürk A, Numan Bucak M, Bodu M, Başpınar N, Çelik İ, Shu Z, Gao D. Cryobiology and Cryopreservation of Sperm. *IntechOpen*. 2020:1–42. DOI: [10.5772/intechopen.89789](https://doi.org/10.5772/intechopen.89789)
164. Akhtar MF, Ma Q, Li Y, Chai W, Zhang Z, Li L, Wang C. Effect of Sperm Cryopreservation in Farm Animals Using Nanotechnology. *Animals*. 2022;12(17):2277. DOI: [10.3390/ani12172277](https://doi.org/10.3390/ani12172277)
165. Nur Z, Zik B, Ustuner B, Sagirkaya H, Ozguden CG. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*. 2010;73(9):1267–1275. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2009.12.007](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.007)
166. Najafi A, Daghigh-Kia H, Dodaran HV, Mehdipour M, Alvarez-Rodriguez M. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. *Anim Reprod Sci*. 2017;177:35–41. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2016.12.004](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.004)

167. Yang J, Gao L, Liu M, Sui X, Zhu Y, Wen C, Zhang L. Advanced biotechnology for cell cryopreservation. *Transactions of Tianjin University*. 2020;26:409–423. DOI: [10.1007/s12209-019-00227-6](https://doi.org/10.1007/s12209-019-00227-6)
168. Paramio M, Soto-Heras S, Izquierdo D. Reproductive Technologies in Animals. *Reproductive technologies in goats*. 2020:55–66. DOI: [10.1016/B978-0-12-817107-3.00004-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817107-3.00004-7)
169. Ranjan R, Kumar M, Gangwar C, Kharche S. Developments in Goat Semen Cryopreservations. *Animal Reproduction Update*. 2022;1(1):41–45. DOI: [10.48165/aru.2021.1205](https://doi.org/10.48165/aru.2021.1205)
170. Pirahanchi Y, Sharma S. Biochemistry, Lipase. 2023 Jun 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. PMID: [30726031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30726031/)
171. Vollmer T, Ljungberg B, Jankowski V, Jankowski J, Glorieux G, Stegmayr BG. An in-vitro assay using human spermatozoa to detect toxicity of biologically active substances. *Sci Rep*. 2019;9(1):14525. DOI: [10.1038/s41598-019-50929-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-50929-z)
172. Gaitskell-Phillips G, Martín-Cano FE, Ortiz-Rodríguez JM, da Silva-Álvarez E, Masot J, Redondo E, Gil MC, Ortega-Ferrusola C, Peña FJ. Seminal plasma proteins as potential biomarkers for sperm motility and velocities. *Theriogenology*. 2022;177:34–41. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2021.10.007](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.10.007)
173. Okazaki T, Shimada M. New strategies of boar sperm cryopreservation: development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim Sci J*. 2012;83(9):623–9. DOI: [10.1111/j.1740-0929.2012.01034.x](https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2012.01034.x)
174. Jia B, Liang J, Lv C, Memon S, Fang Y, Wu G, Quan G. The characteristics of proteome and metabolome associated with contrasting sperm motility in goat seminal plasma. *Sci Rep*. 2021;11(1):15562. DOI: [10.1038/s41598-021-95138-9](https://doi.org/10.1038/s41598-021-95138-9)

175. Xu B, Wang R, Wang Z, Liu H, Wang Z, Zhang W, Zhang Y, Su R, Liu Z, Liu Y, Li J, Zhang J. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation. *Front Vet Sci.* 2022;9:1004683. DOI: [10.3389/fvets.2022.1004683](https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1004683)
176. Tuli RK, Holtz W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology.* 1994;42(3):547–555. DOI: [10.1016/0093-691x\(94\)90692-c](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90692-c)
177. Gomes FP, Park R, Viana AG, Fernandez-Costa C, Topper E, Kaya A, Memili E, Yates JR 3rd, Moura AA. Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. *Sci Rep.* 2020;10(1):14661. DOI: [10.1038/s41598-020-71015-9](https://doi.org/10.1038/s41598-020-71015-9)
178. Moreira SSJ, Lago AEA, Moura AAA, Silva AR. Impact of Seminal Plasma Composition on Sperm Freezability in Wild Mammals: A Review. *Biopreserv Biobank.* 2022;20(1):90–96. DOI: [10.1089/bio.2021.0026](https://doi.org/10.1089/bio.2021.0026)
179. Al-Essawe EM, Wallgren M, Wulf M, Aurich C, Macías-García B, Sjunnesson Y, Morrell JM. Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. *Theriogenology.* 2018;115:99–107. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2018.04.021](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.021)
180. Alipour R, Sereshki N, Rafiee M, Ahmadipanah V, Pashoutan Sarvar D, Rahimian K, Wilkinson D. The effect of probiotic bacteria on toll-like receptor-2 and -4 expression by spermatozoa in couples with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Rep.* 2022;33:101390. DOI: [10.1016/j.bbrep.2022.101390](https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101390)
181. Witte TS, Schäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2007;102(3–4):181–93. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2007.07.007](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.007)

182. Hong CY, Chiang BN, Turner P. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet*. 1984;2(8417–8418):1449–51. DOI: [10.1016/s0140-6736\(84\)91634-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91634-9)
183. Kamal MM, Alam ME, Das SK, Yeasmin MS, Ahmed S, Rahman MA, Das DK, Gofur MR, Masum MA. Effects of glucose and trehalose on tris–citric acid–egg yolk–fructose diluents for semen cryopreservation in goat. *J Adv Vet Anim Res*. 2023;10(2):169–177. DOI: [10.5455/javar.2023.j666](https://doi.org/10.5455/javar.2023.j666)
184. Pellicer–Rubio MT, Magallon T, Combarous Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60–kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol Reprod*. 1997;57(5):1023–1031. DOI: [10.1095/biolreprod57.5.1023](https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.1023)
185. Corteel JM, Baril G. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 1974;14(4):741–745. DOI: [10.1051/rnd:19740502](https://doi.org/10.1051/rnd:19740502)
186. Reddy NS, Mohanarao GJ, Atreja SK. Effects of adding taurine and trehalose to a tris–based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci*. 2010;119(3–4):183–90. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2010.01.012](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.01.012)
187. Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*. 1992;72(4):1063–1081. DOI: [10.1152/physrev.1992.72.4.1063](https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.4.1063)
188. Zhang XG, Hu S, Han C, Zhu QC, Yan GJ, Hu JH. Association of heat shock protein 90 with motility of post–thawed sperm in bulls. *Cryobiology*. 2015;70(2):164–169. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2014.12.010](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.12.010)
189. Varghese T, Divyashree BC, Roy SC, Roy KS. Loss of heat shock protein 70 from apical region of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm head after freezing and thawing. *Theriogenology*. 2016;85(5):828–834. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2015.10.029](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.029)

190. Cui Y, Liu P, Yu S, He J, Afedo SY, Zou S, Zhang Q, Liu J, Song L, Xu Y, Wang T, Li H. Expression Analysis of Molecular Chaperones Hsp70 and HSP 90 on Development and Metabolism of Different Organs and Testis in Cattle (Cattle–yak and Yak). *Metabolites*. 2022;12(11):1114. DOI: [10.3390/metabo12111114](https://doi.org/10.3390/metabo12111114)
191. Abedin SN, Baruah A, Baruah KK, Bora A, Dutta DJ, Kadirvel G, Katiyar R, Doley S, Das S, Khargharia G, Sarkar B, Sinha S, Phookan A, Dewry RK, Kalita MK, Chakravarty H, Deori S. Zinc oxide and selenium nanoparticles can improve semen quality and heat shock protein expression in cryopreserved goat (*Capra hircus*) spermatozoa. *J Trace Elem Med Biol*. 2023;80:127296. DOI: [10.1016/j.jtemb.2023.127296](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127296)
192. Pini T, Rickard JP, Leahy T, Crossett B, Druart X, de Graaf SP. Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *J Proteomics*. 2018;181:73–82. DOI: [10.1016/j.jprot.2018.04.001](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.001)
193. Hernández–Avilés C, Ramírez–Agámez L, Varner DD, Love CC. Effects of egg yolk level, penetrating cryoprotectant, and pre–freeze cooling rate, on the post–thaw quality of stallion sperm. *Anim Reprod Sci*. 2023;248:107162. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2022.107162](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107162)
194. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev*. 2006;73(10):1338–1344. DOI: [10.1002/mrd.20565](https://doi.org/10.1002/mrd.20565)
195. Bathgate R, Maxwell WM, Evans G. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post–thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim*. 2006;41(1):68–73. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x)
196. Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol–loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 2004;48(1):36–45. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2003.12.001](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.12.001)

197. Simon L, Emery B, Carrell DT. Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:87–105. DOI: [10.1007/978-3-030-21664-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_6)
198. Wang T, Gao H, Li W, Liu C. Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility. *Front Genet.* 2019;10:962. DOI: [10.3389/fgene.2019.00962](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00962)
199. Buderatska N, Gontar J, Ilyin I, Lavrinenko S, Petrushko M, Yurchuk T. Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy? *Cryobiology.* 2020;93:33–36. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.03.002](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.002)
200. Frydman N, Prisant N, Hesters L, Frydman R, Tachdjian G, Cohen–Bacrie P, Fanchin R. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril.* 2008;89(1):92–7. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2007.02.022](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.022)
201. Luño V, Martínez F, Muñoz A, Gil L. Effect of season on the dynamics of cat sperm DNA fragmentation. *BMC Vet Res.* 2023;19(1):113. DOI: [10.1186/s12917-023-03682-5](https://doi.org/10.1186/s12917-023-03682-5)
202. Baldassarre H. Laparoscopic Ovum Pick–Up Followed by In Vitro Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. *Animals.* 2021;11(1):216. DOI: [10.3390/ani11010216](https://doi.org/10.3390/ani11010216)
203. Morais MCC, Esteves LV, Souza–Fabjan JMG, Oliveira MEF, Silva MR, Brandão FZ, Fonseca JF. Factors affecting pregnancy rates for goat embryos recovered and transferred by transcervical route. *Small Ruminant Research.* 2020;192:1286–1295. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2020.106215](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106215)
204. Rahman MR, Rahman MM, Khadijah WEW, Abdullah RB. Effect of Recipient Surgery Cycles on Survival Rate of Transferred Embryo in Goats. *Pertanika J. Trop. Agric. Sc.* 2018;41(4):1731–1740. Available online: <http://www.pertanika.upm.edu.my>
205. Greyling JP, van der Nest M, Schwalbach LM, Muller T. Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. *Small*

- Ruminant Research*. 2002;43(1):45–51. DOI: [10.1016/S0921-4488\(01\)00257-7](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(01)00257-7)
206. Quan F, Zhang Z, An Z, Hua S, Wan M, Zhao X, Zhang Y. Effect of transporting donor or recipient does and their embryos on the outcome of fresh embryo transfer in Boer goats. *Small Ruminant Research*. 2010;88(1):1–5. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2009.10.015](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.015)
207. Amiridis GS, Cseh S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*. 2012;130(3–4):152–61. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.009)
208. Härter CJ, Castagnino DS, Rivera AR, Lima LD, Silva HG, Mendonça AN, Bonfim GF, Liesegang A, St-Pierre N, Teixeira IA. Mineral Metabolism in Singleton and Twin-pregnant Dairy Goats. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2015;28(1):37–49. DOI: [10.5713/ajas.14.0214](https://doi.org/10.5713/ajas.14.0214)
209. Härter CJ, Lima LD, Castagnino DS, Silva HO, Figueiredo FOM, St-Pierre NR, Resende KT, Teixeira IAMA. Net mineral requirements of dairy goats during pregnancy. *Animal*. 2017;11(9):1513–1521. DOI: [10.1017/S1751731117000258](https://doi.org/10.1017/S1751731117000258)
210. Zhang L, An XP, Liu XR, Fu MZ, Han P, Peng JY, Hou JX, Zhou ZQ, Cao BY, Song YX. Characterization of the Transcriptional Complexity of the Receptive and Pre-receptive Endometria of Dairy Goats. *Sci Rep*. 2015;5:14244. DOI: [10.1038/srep14244](https://doi.org/10.1038/srep14244)
211. Liu X, Zhang L, Han J, Yang L, Cui J, Che S, Cao B, Song Y. A comparative analysis of gene expression induced by the embryo in the caprine endometrium. *Vet Med Sci*. 2020;6(2):196–203. DOI: [10.1002/vms3.221](https://doi.org/10.1002/vms3.221)

## ДОДАТОК А

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

#### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

*Статті у фахових виданнях України, які входять до  
міжнародних наукометричних баз даних*

1. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Petrushko M. Seasonal Variability in Cryoresistance of Saanen Goats Spermatozoa and Reproductive Characteristics. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2022;32(1):34–43. DOI: [10.15407/cryo32.01.034](https://doi.org/10.15407/cryo32.01.034) (Scopus, Q4)

*Особистий внесок здобувача: проведення аналізу характеристик спермицанів, кріоконсервування сперматозоїдів, оцінки функціональних характеристик сперматозоїдів, виконання екстрокорпорального запліднення ооцитів кіз та культивування ембріонів, аналіз результатів, формулювання висновків та підготовка матеріалів до друку*

2. **Bogdaniuk AO**, Yurchuk TO, Petrushko MP. Seasonal Differences in Sperm Characteristics and the Level of DNA Fragmentation in Fresh and Cryopreserved Sperm of Saanen Goats. *Cytology and Genetics*. 2022;56(5):410–416. DOI: [10.3103/S009545272205003](https://doi.org/10.3103/S009545272205003) (Scopus, Q3)

*Особистий внесок здобувача: проведення кріоконсервування сперматозоїдів, оцінка рівня фрагментації їх ДНК перед та після заморожування-відігріву, аналіз результатів, формулювання висновків та підготовка матеріалів до друку*

3. **Bogdaniuk A**, Petrushko M. Morphological and morphometric characteristics of fresh and cryopreserved spermatozoa of saanen bucks. *Agricultural Science and Practice*. 2022;9(3):29–35. DOI: [10.15407/agrisp9.03.029](https://doi.org/10.15407/agrisp9.03.029)

*Особистий внесок здобувача: проведення морфологічної та морфометричної оціну гамет цанів після кріоконсервування, проведення*

*аналізу результатів, формулювання висновків та підготовка матеріалів до друку*

*Статті у фахових виданнях України*

4. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Petrushko M. Reproductive characteristics of Saanen and Alpine bucks. *Biologiya Tvarin*. 2023;25(3):8–13. DOI: [10.15407/animbiol25.03.008](https://doi.org/10.15407/animbiol25.03.008)

*Особистий внесок здобувача: проведення експериментів з визначення репродуктивних характеристик ців двох порід, порівняння їх сперміологічних характеристик та вплив сезонності на показники сперми, проведення статистичної обробки результатів, формулювання висновків та підготовка матеріалів до друку*

*Статті у закордонних журналах, внесених до міжнародних баз Scopus та Web of Science*

5. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Berestovoyy O, Tsvyk V, Yusifli N, Sigunov O, Kramareva O, Petrushko M. Kidding after Transfer of in Vitro Produced Saanen Goat Embryos into Local Ukrainian Breed Recipients in Different Seasons. *Open Journal of Ecology*. 2023;13(8):549–559. DOI: [10.4236/oje.2023.138034](https://doi.org/10.4236/oje.2023.138034) (Web of Science Zoological Record)

*Особистий внесок здобувача: проведення аналізу характеристик сперми ців, кріоконсервування сперматозоїдів, оцінка функціональних характеристик сперматозоїдів, виконання екстрокорпорального запліднення ооцитів кіз та культивування ембріонів, виконання трансплантації ембріонів та аналіз рівня імплантації, аналіз результатів, формулювання висновків та підготовка матеріалів до друку*

*Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації*

6. **Bogdaniuk AO**, Berestovyy OO, Tsvik VV. Kinetic Characteristics of Spermatozoa of Saanen Goats After Cryopreservation. *Problems of*

- Cryobiology and Cryomedicine*. 2019;29(2):169. DOI: [10.15407/cryo29.02.169](https://doi.org/10.15407/cryo29.02.169) (oral presentation)
7. **Bogdaniuk A**, Berestovoyy O, Tsvyk V, Garkavii V, Yusifli N, Sigunov O, Kramareva O. Different ovarian stimulation protocols used prior laparoscopic ovum pick-up in Saanen goats: preliminary results. *Proceedings of the 36th Annual Meeting of the Association of Embryo Technology in Europe – Animal Reproduction*. 2020;17(3):29. (poster)
  8. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Tsvyk V. Effect of Sucrose and Glycerol Based Cryoprotective Media on Kinetic Characteristics of Saanen Goat Spermatozoa. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020;30(3):283. DOI: [10.15407/cryo30.03a.283](https://doi.org/10.15407/cryo30.03a.283) (oral presentation)
  9. **Bogdaniuk A**, Garkavii V. The kinetic characteristics of semen from Saanen and Alpine goats after cryopreservation in different freezing media. *Cryobiology*. 2020;97:298. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.10.189](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.189) (poster)
  10. **Bogdaniuk A**, Garkavii V. Embryo development rate after fertilization with fresh vs. Frozen sperm in goats. *Cryoletters*. 2021;42(6):376. Available online: <http://www.cryoletters.org/sltb-2020-42-6-366-379-abstracts.pdf> (poster)
  11. **Богданюк АО**, Гарькавий ВВ. Цитотоксичний вплив гліцерину на рухливість сперматозоїдів самців кіз. *Матеріали XVII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» – Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна*. 2020:40–41. (усна доповідь)
  12. **Bogdaniuk A**, Berestovoyy O, Tsvyk V, Garkavii V, Yusifli N, Sigunov O, Kramareva O, Boiko D. Birth of kids after laparoscopic transfer of in vitro produced Saanen embryos into surrogate goats of Ukrainian local breed. *Reproduction In Domestic Animals*. 2021;57(S1):46. DOI: [10.1111/rda.14052](https://doi.org/10.1111/rda.14052) (poster)
  13. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Petrushko M. Pregnancy Rate After Transfer of In Vitro Produced Goat Embryos Using Fresh Vs Frozen Sperm In Different

Seasons. *Cryobiology*. 2021;103:182. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2021.11.087](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.11.087) (oral presentation)

14. **Bogdaniuk A**, Yurchuk T, Petrushko M. Cryopreservation influences goat spermatozoa characteristics in breeding and non–breeding season *Proceedings of the SLTB 2021*. 2021:14. (poster)
15. **Богданюк АО**, Гарькавий ВВ. Кріорезистентність сперматозоїдів цапів зааненської породи у нестатевий сезон. *Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини»* – Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2021:25. (усна доповідь)
16. **Bogdaniuk AO**, Yurchuk TO, Petrushko MP. DNA fragmentation rate of goat spermatozoa after cryopreservation with egg yolk contained and egg yolk–free cryoprotective media. *XV IMBG all–Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation. Biopolymers and Cell*. 2021;37(3):185. DOI: [10.7124/bc.000A56](https://doi.org/10.7124/bc.000A56) (усна доповідь)
17. **Богданюк АО**, Гарькавий ВВ. Репродуктивні характеристики сперматозоїдів самців кіз зааненської породи, кріоконсервованих у різні сезони. *Матеріали 45–ої щорічної міжнародної конференції молодих вчених Холод в біології і медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології; 2021 трав. 19–20, м. Харків; 2021:4*. (усна доповідь)
18. **Bogdaniuk A**, Garkavii V, Petrushko M. In vitro fertilization of Saanen goat oocytes in non–breeding season with epididymal spermatozoa. *Abstracts of The 1st Ukrainian–Polish Scientific Forum AGROBIOPERSPECTIVES. The Animal Biology*. 2021;23(3):15. DOI: [10.15407/animbiol23.03](https://doi.org/10.15407/animbiol23.03) (усна доповідь)
19. **Богданюк АО**, Гарькавий ВВ. Фертильність кози та цапа зааненської породи, народжених сурогатними козами української локальної породи після переносу ембріонів, створених *in vitro*. *Тези доповідей наукової конференції «Зоологія в сучасному світі: виклики XXI століття»* (м.

- Київ, Інститут зоології НАН України, 1–3 червня 2021 р.). 2021:109. (усна доповідь)
20. **Bogdaniuk A**, Petrushko M. Morphological characteristics of freshly isolated and cryopreserved spermatozoa of Saanen bucks in different seasons. *Cryobiology*. 2022;109:69. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2022.11.221](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.221) (poster)
  21. **Bogdaniuk A**, Petrushko M. Seasonal variation of morphometrical characteristics of fresh and cryopreserved Saanen goat sperm. *Anim Reprod*. 2022;19(2):e22217. Available online: <https://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/62fe8726a953957f0c02b102> (oral presentation)
  22. **Bogdaniuk A**, Garkavii V. Seasonality in kidding after transfer of *in vitro* produced Saanen goat embryos into recipients of local Ukrainian breed. *Reproduction In Domestic Animals*. 2022;57(S4):59–60. DOI: [10.1111/rda.14243](https://doi.org/10.1111/rda.14243) (oral presentation)
  23. **Богданюк АО**, Петрушко МП. Сезонні зміни біохімічних показників сім'яної плазми цапів та їх вплив на характеристики сперматозоїдів. *Матеріали XIX Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» – Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна*, 2022:94–96. (усна доповідь)
  24. **Богданюк АО**, Юрчук ТО, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів кіз, як метод природоохоронної біотехнології. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали II міжнародної наук.–практ. інтернет–конф. (20 травня 2022 р., м. Харків).* – Електрон. дані. – Х. : НФаУ. 2022:66. (усна доповідь)
  25. **Богданюк АО**, Гаркавий ВВ, Петрушко МП. Репродуктивні характеристики сперматозоїдів цапів залежать від породи. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XX Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців. (25–26 травня 2023*

р., м. Харків, Україна). – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2023:25.  
(усна доповідь)

26. **Bogdaniuk AO**, Petrushko MP, Garkavii VV. Cryotolerance of spermatozoa varies according to the breed of goat. *Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи: збірник тез доповідей всеукр. наук.– практ. конф. науковців, викладачів та аспірантів, 23 травня 2023 р. Харків:* ДБТУ. 2023:26–27.  
<https://repo.btu.kharkov.ua/handle/123456789/36580> (усна доповідь)
27. **Bogdaniuk AO**, Petrushko MP, Garkavii VV. Correlation between biochemical parameters of seminal plasma and cryoresistance of spermatozoa of Saanen bucks. *47th Annual International Conference of Young Scientists «Cold in Biology and Medicine: Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology»*. 2023:5. (oral presentation)

## ДОДАТОК Б

### Відомості про апробацію результатів дисертації

Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:

- 44-тій щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, 2020);
- 45-тій щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, 2021);
- 46-тій щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, 2022);
- 47-тій щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, 2023);
- 17-ій Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (м. Харків, 2020);
- 18-ій Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (м. Харків, 2021);
- 19-ій Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (м. Харків, 2022);
- 20-ій Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (м. Харків, 2023);
- 57-ій щорічній Конференції Спілки Кріобіології (CRYO) (віртуально, 2020);
- 58-ій щорічній Конференції Спілки Кріобіології (CRYO) (м. Чикаго, 2021);

- 56-й Конференції Співки Біології Низьких Температур (SLTB) (віртуально, 2020);
- 57-й Конференції Співки Біології Низьких Температур (SLTB) (віртуально, 2021);
- 36-й Щорічній Конференції Європейської Асоціації Ембріо технологій (АЕТЕ) (віртуально, 2020);
- 38-й Щорічній Конференції Європейської Асоціації Ембріо технологій (АЕТЕ) (м. Утрехт, 2022);
- 15-й Всеукраїнській конференції молодих учених з молекулярної біології та генетики (м. Київ, 2021), конференції «Зоологія в сучасному світі: виклики XXI століття», присвячена 90-річчю від часу заснування Інституту зоології ім І.І. Шмальгаузена Національної академії наук (м. Київ, 2021);
- I-ому українсько-польському науковому форумі «Агробіоперспективи» (м. Львів, 2021);
- 24-й Конференції Європейської Співки Репродукції Домашніх Тварин (ESDAR) (віртуально, 2021);
- 25-й Конференції Європейської Співки Репродукції Домашніх Тварин (ESDAR) (м. Салоніки, 2022);
- CRYO 2022 Joint Meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology (Дублін, 2022);
- II-й Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та Досягнення Сучасної Біотехнології» (м. Харків, 2022);
- Всеукраїнській науково-практичній конференції науковців, викладачів та аспірантів «Актуальні питання ветеринарної медицини: реалії та перспективи» (м. Харків, 2023).