УДК 636.4.082.453.51/54:57.022

ЗБЕРЕЖЕННЯ ТА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ СПЕРМИ КНУРІВ ЗА РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУРНИХ РЕЖИМІВ І УМОВ СЕРЕДОВИЩА

С. Б. КОРНЯТ, М. М. ШАРАН, О. Б. АНДРУШКО

Інститут біології тварин УААН

Проаналізовано літературні дані про вплив температурних режимів і реакції середовища на збереження життєздатності сперми кнурів при технологічній обробці.

Ключові слова: СПЕРМІЇ, КНУР, ТЕМПЕРАТУРА, pH, ЗБЕРЕЖЕННЯ, ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ, МЕМБРАНА.

Перші спроби штучного осіменіння свиней були зроблені у 1926-1927 роках І. І. Івановим та продовжені у 1930-1936 роках В. К. Мілованoвим. Перші розчинники (глюкозо-сульфатний і глюкозо-тартратний) для сперми кнурів були запропоновані В. К. Мілованoвим у 1931-1933 роках [1]. У цих ранніх роботах було показано, що тільки розбавлена сперма може вижити при тривалому зберіганні. Також було встановлено, що виживання сперміїв є значно вищим при зберіганні в рідкому розбавленому вигляді, ніж у замороженому стані, а зниження температури призводить до зменшення кількості сперміїв з непошкодженою мембраною й ультраструктурою, а отже і здатністю до запліднення.

Використання сперми кнурів, яка попередньо зберігалася, для штучного осіменіння свиноматок суттєво зросло у світі в останні 15 років, що зумовлене вдосконаленням технологій і інструментів, а також концентрацією виробництва свинини. В США зараз штучно осіменяється більше 80 % свиноматок у господарствах з кількістю 500 і більше свиноматок [2]. У світі щорічно осіменяють приблизно 19 мільйонів свиноматок у рік і більше 99 % з них спермою, яка була розбавлена і зберігалася в рідкому стані в день взяття чи зберігалася при температурі 15-20 ^{o}C від 1 до 5 днів [3]. До 85 % всіх осіменінь проводиться в день взяття сперми чи в наступний. Деконсервована сперма кнурів використовується для осіменіння свиноматок менше ніж в 1 % випадків у зв'язку з більшими витратами часу на розморожування сперми та нагрівання її до температури тіла, а також внаслідок нижчої ефективності осіменіння (відсоток запліднених свиноматок, кількість народжених живих поросят та середня жива маса поросят). Найчастіше кріоконсервовану сперму кнурів використовують при експорті або імпорті з метою покращення генофонду поголів'я в окремому стаді чи країні [4]. Країни суттєво відрізняються за обсягами застосування штучного осіменіння в свинарстві – від 5 % загального поголів'я свиноматок в одних до 90 % поголів'я в інших, головним чином Європейських державах. Навести показники застосування штучного осіменіння свиноматок в Україні складно, внаслідок триваючого реформування аграрного сектору і відсутності належного обліку.

З 1975 по 1990 роки використання розбавленої сперми кнурів, яка попередньо зберігалася, для штучного осіменіння свиноматок у країнах Європи зростало з вражаючою швидкістю. Після 1990 року цей ріст відбувався головним чином у Північній і Південній Америці, де він триває і зараз. Підвищення застосування штучного осіменіння у свинарстві, зокрема в Західній півкулі, є, з одного боку вимогою часу, а з іншого – наслідком покращення технологічної обробки сперми, підвищення вимог до якості маточного поголів'я, а також покращення систем транспортування, що робить розбавлену сперму можливою до застосування в день взяття чи в наступний майже в будь-якій країні. Важливе значення має те, що значна кількість виробників свинини готові до впровадження сучасних методів ведення свинарства, що стає відчутним зараз і в Україні. В США є досвід значного росту застосування штучного осіменіння в свинарстві: від 5 % осіменених від загальної кількості свиноматок у 1993 році до 50 % в кінці 90-х років [3].

Успіх штучного осіменіння в свинарстві залежить від трьох складових: продуктивних якостей кнура, як виробника сперми, технологічних умов роботи із спермою від її взяття до осіменіння та продуктивності і здоров'я свиноматки, яку осіменяють. Однією з перешкод на шляху застосування штучного осіменіння в свинарстві є підвищені вимоги до ведення виробництва та кваліфікації спеціалістів порівняно з використанням природного парування. При паруванні свиноматок кнуром сперма не піддається змінам у навколишньому середовищі і вводиться в статеві шляхи самки в оптимальний для запліднення час. На противагу цьому багато різних чинників навколишнього середовища діють на сперму при її взятті, розбавленні, зберіганні, транспортуванні і штучному введенні в статеві шляхи свиноматок. Осіменіння має бути проведене в оптимальний для цього час, що вимагає високої кваліфікації персоналу при виявленні охоти й осіменінні. Дотримання санітарно-гігієнічних вимог до інструментів, що використовуються при осіменінні, є також важливим чинником успішності штучного осіменіння, що сьогодні полегшується можливістю використання одноразових стерильних інструментів. Для запобігання розвитку шкідливих мікроорганізмів у спермі застосовують сануючі засоби, які додають у середовища для розбавлення, які складаються з кількох антибактеріальних препаратів (здебільшого антибіотиків) широкого спектру дії [5, 6].

Перевагою застосування штучного осіменіння є можливість використання генетичного потенціалу плідників нових, високопродуктивних ліній при менших технологічних витратах порівняно з природним паруванням зі зменшенням ризику передачі захворювань від кнура до свиноматки та виключення загрози травмування. Сперму можна також використовувати від плідників різних порід, що застосовується для оптимізації систем розведення в малих господарствах і прискорення генетичного прогресу без купівлі і утримання кнура. Крім того, добрі кнурі можуть бути використані більш інтенсивно, ніж це є при природному паруванні, оскільки штучне осіменіння дозволяє збільшити кількість спермодоз з еякуляту.

Розбавлення сперми, яка використовується в подальшому для штучного осіменіння робиться не тільки для збільшення об'єму еякуляту, що має значення при осіменінні великої кількості самок, а й для створення захисного середовища для сперміїв поза організмом самців, фізико-хімічні і біологічні властивості якого сприяли б подовженню тривалості життя сперміїв поза організмом, порівняно до зберігання нативного еякуляту, з максимальним збереженням їх запліднювальної здатності.

В сперміях активно проходять метаболічні процеси при зберіганні сперми. Зокрема, при інкубації з міченими фруктозою, глюкозою, гліцерил-3-фосфатом, лактатом і піруватом мітка виявляється в вуглекислому газі [7]. Також у сперміях відбувається синтез фосфоліпідів de novo, на що вказує виділення з інкубаційного середовища мічених фосфатидної кислоти, 1,2 диацилгліцеролу і фосфатидилхоліну після інкубування їх з міченими пальмітиновою і арахідоновою кислотами та гліцерилом; синтез фосфоліпідів у сперміях зменшується з зниженням температури [8]. Включення складників різноманітної природи у середовища для зберігання сперми кнурів у рідкому стані має своїм завданням впливати на ці процеси так, щоб довше зберігалася її запліднювальна здатність.

У даний час знайшла застосування велика кількість різних синтетичних середовищ для розбавлення сперми. Серед основних складників, які застосовуються в більшості середовищ для зберігання охолодженої сперми кнурів у рідкому стані можна навести наступні речовини:

- глюкозу, яка є енергетичним матеріалом для сперматозоїдів і запобігає втраті ними електричного заряду, а отже їх аглютинації;
- цитрат, бікарбонат натрію, чи хлорид калію, які є природними буферами, що перешкоджають отруєнню сперміїв кислими продуктами їхнього розпаду, зменшують проникність оболонок сперміїв, послаблюють дію антитіл у статевих шляхах свиноматок на сперматозоїди, виводять з сироватки сперми кальцій, вільні іони якого є шкідливими для сперматозоїдів [9];
- трилон Б (хелатон-3 або двонатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти), запропонований у 1965 році Н. Т. Плішко в Інституті біології тварин [10], який і зараз

застосовується в більшості синтетичних середовищ для зберігання охолодженої сперми кнурів у рідкому стані, який захоплює дивалентні іони металів, зокрема кальцію, й обмежує його проникнення через плазматичну мембрану [11], запобігає початку капацитації і змінам акросоми;

- речовини, які містять сульфгідрильні групи, котрі допомагають стабілізувати мембрану сперміїв при зберіганні й охолодженні та попереджують капацитацію [3];
- антиоксиданти, які продовжують життя сперміїв з збереженням запліднювальної здатності на вищому рівні [12];
- протимікробні препарати (переважно антибіотики) широкого спектру дії, які затримують розвиток мікроорганізмів у спермі, що можуть попасти в неї при взятті, фасуванні і зберіганні.

В удосконаленні методів технологічної обробки сперми важливе значення має збільшення тривалості зберігання сперми. Їх складовою частиною є два чинники – температура, при якій сперму беруть, розбавляють і зберігають після взяття і розчинення та реакція середовища (pH), в якому спермії перебувають протягом зберігання.

Температура. Характерною особливістю сперміїв кнура у порівнянні зі сперміями самців інших видів сільськогосподарських тварин є більша варіабельність інтенсивності прямолінійного поступального руху при різних температурах. При природному паруванні менш теплі спермії з придатків сім'яників змішуються з теплішими секретами придаткових статевих залоз, еякулят потрапляє в статеві шляхи свиноматки, де температура становить близько 40 ˚С, внаслідок чого прискорюється перебіг біохімічних процесів у сперміїв та збільшується швидкість їхнього руху. Однак, подальше підвищення температури сповільнює швидкість руху сперміїв, що вказує на негативний вплив підвищеної температури на процеси життєдіяльності сперміїв. При температурі 45-47 ˚С спермії швидко втрачають запліднювальну здатність, а при 48-50 ˚С гинуть внаслідок коагуляції білків [13].

При зниженні температури рух сперміїв сповільнюється. Порівняльна характеристика рухливості сперміїв при 35 і 20 ˚С показує, що кількість рухомих гамет у другому випадку менша. Але загальновідомо, що спермії кнурів, порівняно зі сперміями самців інших видів свійських тварин, чутливі до холодового шоку. Це відбувається при швидкому охолодженні свіжоеякульованої сперми кнурів від температури тіла до температури, нижчої від 15 ˚С, що викликає втрату рухливості значною кількістю сперміїв, зменшення часу їх виживання та загибель, що особливо виражене при швидкому охолодженні еякуляту до 1-2 ˚С. Спермії, одержані з придатків сім'яників і не активовані секретом придаткових статевих залоз, холодового удару не зазнають [14].

Температурний шок призводить до зниження вмісту в сперміях фосфоліпідів, ліпопротеїдів, цитохрому С, порушення іонної рівноваги, гліколізу, дихання та синтезу АТФ. Ці зміни пов'язані в основному з структурними порушеннями фібрил джгутика та плазматичної мембрани, що й зумовлює зниження рухливості сперміїв та їх запліднювальної здатності [15].

Тривалість активності сперміїв кнура поза організмом при різних температурах також різна: при температурі 39 ˚С спермії кнура в нативному еякуляті рухаються до 10 годин, а при 15-20 ˚С – до 24 годин зі збереженням до 40 % рухливих сперміїв. Однак, живими вони залишаються значно довше – 12 годин при 39 ˚С та 48 годин при 15-20 ˚С відповідно, без суттєвої втрати запліднювальної здатності і можуть успішно використовуватися для штучного осіменіння та запліднення яйцеклітин in vitro [16]. Охолодження сперми при зберіганні поза організмом сповільнює метаболічні процеси в сперміях, капацитацію сперміїв і сприяє тривалішому збереженню цілісності акросоми сперміїв [17].

При зберіганні нерозбавленої сперми кнура протягом кількох годин при температурі понад 15 ˚С, спермії поступово набувають стійкості до холодового шоку і зберігають запліднювальну здатність [18]. Попередня інкубація впродовж 24 годин перед можливим зменшенням температури до 15 ˚С і нижче також посилює стійкість сперміїв кнура до холодового шоку. Це має суттєве значення, оскільки спермії кнурів чутливіші до зниження температури, ніж спермії бугаїв чи баранів [19]. Є дані, що спермії кнурів при їх інкубуванні при кімнатній температурі у власній сім'яній плазмі стають досить стійкими до холодового

шоку впродовж 16 годин після еякуляції внаслідок змін в їхній мембрані. Ця стійкість досягає максимуму через 18-24 години [20]. Відомо, що основні зміни в ліпідній фазі мембрани сперміїв мають місце при температурі 5-15 ˚С, що є температурними межами пошкодження акросомної мембрани. Застосування розріджувачів сперми також сприяє продовженню тривалості їх життя поза організмом при пониженій температурі [21].

Зниження температури відповідно сповільнює обмінні процеси в сперміях. При температурі біля 0 ˚С настає стан анабіозу, спермії припиняють рух, а обмінні процеси в них знаходяться на низькому рівні. Це супроводжується продовженням часу виживання сперміїв зі збереженням запліднювальної здатності. Глибокий анабіоз, який має місце при кріоконсервації сперми в рідкому азоті дозволяє зберігати запліднювальну здатність сперміїв протягом багатьох років [22]. При нагріванні охолоджених або відтаюванні і нагріванні заморожених сперміїв, які не загинули при кріоконсервуванні, відновлюється їх рухливість і здатність до запліднення яйцеклітини. Зниження температури є одним з головних факторів при зберіганні сперми кнурів, а також інших тварин.

Зміни, які відбуваються в інкубованих сперміях кнура при набуванні ними стійкості до холодового шоку остаточно не з'ясовані. Холодовий шок сперміїв пов'язують із змінами в ліпідному складі мембрани [23]. При зниженні температури обмеження латерального руху фосфоліпідів мембрани може викликати перехід рідкої фази у гелеву. Внаслідок різних температур топлення окремих ліпідів, частини мембрани можуть роз'єднуватися, що призводить до руйнування білків [24]. Автори роблять висновок, що саме ліпідний склад мембран несе відповідальність за зміну ультраструктури мембран при низькій температурі.

У склад мембран сперміїв входять протеїни, фосфоліпіди, стерини, гліколіпіди та протеоліпіди, які відрізняються між собою не тільки кількісно і якісно, а й розташуванням. Фосфоліпіди в мембранах розташовані у вигляді бішару, що утворює рідкокристалічну серцевину. При цьому полярні гідрофільні головки фосфоліпідів обернені назовні, а неполярні хвости залишків жирних кислот і інших вуглеводнів – всередину бішару, утворюючи таким чином гідрофобну фазу. Однією з причин зниження стійкості сперміїв до низьких температур є фазове розмежування ліпідів у період охолодження.

Вміст ліпідів у плазматичній мембрані сперміїв кнура складає біля 50 % сухої речовини [25]. Найбільше в фосфоліпідах плазматичної мембрани сперміїв кнура є пальмітинової, стеаринової, олеїнової, докозапентаєнової і докозагексаєнової кислот [26]. Встановлено, що кількість ліпідів у цільних сперміях після заморожування та відтаювання сперми знижується [27-30]. При охолодженні, і особливо після замороження і відтаювання, кількість поліненасичених жирних кислот у спермі кнурів суттєво зменшується [31]. Включення α-токоферолу в середовище для розбавлення сперми як антиоксиданту не тільки подовжувало тривалість їхнього зберігання, а й запобігало окисненню основних поліненасичених жирних кислот, головним чином докозагексаєнової [32].

Таким чином, відмінності у викликаних холодом структурних змінах, які спостерігаються між стійкими до холоду сперміями бугаїв і чутливими до холоду сперміями кнурів можна пояснити різним ліпідним складом їх мембран. Найбільші відмінності між складом мембран сперміїв бугаїв і кнурів виявлено в складі фосфоліпідів: менший відсоток фосфатидилхоліну і вищий відсоток фосфатидилетаноламіну та сфігноміеліну в мембрані сперміїв кнурів.

Інший фактор, який впливає на залежну від температури поведінку мембран сперміїв і може частково усунути дестабілізуючу дію ліпідів при охолодженні є вміст холестеролу. Оскільки відношення холестеролу до фосфоліпідів у сперміях кнурів є дуже низьким і холестерол розташований асиметрично, він є більш присутній в зовнішньому, ніж у внутрішньому шарі мембрани. Внаслідок цього внутрішній шар дуже вразливий до холодового шоку. При вищій його концентрації в плазматичній мембрані, що має місце в сперміях кролів, при кріоконсервуванні сперміїв фазових переходів не спостерігається [15]. Викликане холодом перетворення частин мембрани, хоч і є частково зворотнім, може впливати на функцію мембрани в багатьох випадках, а саме збільшувати її проникність, зменшувати активність ферментів, спричиняти зміни в латеральному русі в каналах. [33]. Дослідження мембран перед, під час і після охолодження показало, що частина сперміїв

тільки частково відновлюються після повторного нагрівання [34, 35]. Також було підтверджена важлива роль складу ліпідів плазматичної мембрани сперміїв у стійкості до охолодження, значення ліпідних компонентів у механізмі пошкодження [36]. Під впливом низьких температур на мембрани спостерігається перехід ліпідів з рідкокристалічного в рідкий стан, що призводить до переміщення білків на поверхню мембрани або й до їхнього видалення. Отже фазовий перехід ліпідів впливає на вміст білків, активність ферментів та проникність плазматичних мембран сперміїв [37].

У стійкості сперміїв кнура до холодового шоку має значення також вміст у плазматичній мембрані та середовищі для зберігання білків, незважаючи на те, що їх вміст набагато нижчий порівняно до вмісту в мембрані ліпідів, тому що мембранні білки стійкіші до зниження температури, ніж ліпіди і при зростанні співвідношення білків до ліпідів в мембранах виявлене зниження негативної дії на них низьких температур [15, 38]. У свіжоотриманих сперміях бугаїв, які порівняно з сперміями кнура добре переносять охолодження, замороження та відтаювання, співвідношення білків плазматичної мембрани до ліпідів становить 0,43±0,014. В мембрані ж сперміїв кнурів, які характеризуються високою порівняно з іншими тваринами чутливістю до зниження температури виявлено найнижче співвідношення цих компонентів серед сільськогосподарських тварин – 0,176±0,027. Після замороження і відтаювання сперміїв сільськогосподарських тварин відбувається значне зниження співвідношення білки:ліпіди в їхніх плазматичних мембранах порівняно з свіжоотриманими сперміями (для кнура 0,128±0,01 проти 0,176±0,027). Особливо низький вміст білків відмічено в сперміях кнура відразу після розбавлення свіжоотриманої сперми. Набування сперміями кнурів стійкості до холодового шоку після інкубації при кімнатній температурі ряд дослідників пояснюють адсорбцією білків плазми сперми сперміями [39-42]. Адсорбовані білки сприяють зміні співвідношення білків до ліпідів у плазматичній мембрані сперміїв кнура і відповідно підвищенню їх стійкості при охолодженні та кріоконсервації. Інкубація свіжоотриманої сперми кнурів при кімнатній температурі протягом 40-60 хвилин підвищує стійкість сперміїв до зниження температури, що й знайшло широке застосування в практиці. Інший підхід для корекції величини співвідношення білків до ліпідів у плазматичних мембранах сперміїв кнурів та інших тварин передбачає включення в склад синтетичних середовищ для розбавлення сперми білків чи амінокислот, які були б здатні утворювати комплекси з компонентами мембрани сперміїв.

Внутрішні протеїни мембран руйнуються при відокремленні ліпідних складників мембрани при охолодженні, що змінює їх структуру і проникність каналів [43]. Розчинення і охолодження сперми робить мембрану сперміїв кнурів проникнішою [44, 45, 46]. Зміна фази ліпідів і супутній вхід іонів вільного кальцію з навколишнього середовища в клітину може стимулювати кальцій-залежні процеси, пов’язані з капацитацією і тому робить клітинну мембрану сперміїв більш плавкою (рідкою) [23]. У деяких випадках зміни в русі кальцію через мембрану можуть бути несумісні з подальшою життєдіяльністю сперміїв [47].

Важливим з практичного боку є те, що чутливість сперміїв кнурів до холодового шоку змінюється з часом і в залежності від температури. Факторами, які на думку дослідників відіграють у цьому важливу роль, є ступінь зрілості сперміїв, плазма сперми, ступінь розбавлення і дія на неї протягом інкубації. Плазма сперми не відіграє в цих процесах домінуючої ролі [48], але дослідження залежних від температури взаємодій мембрани сперміїв і середовища, в якому вони розбавлені, протягом інкубації, може допомогти зрозуміти як уникнути чи зменшити викликані холодом зміни [49].

Реакція pH середовища, в якому зберігаються спермії кнурів від взяття до осіменіння, є другим за значенням чинником для збереження їх життєздатності та запліднювальної здатності. При збільшенні кислотності енергетичні процеси в сперміях сповільнюються, при зростанні лужності середовища, в якому вони перебувають, ці процеси навпаки, зростають.

У свіжоотриманому еякуляті кнурів pH становить у середньому 7,2-7,5, а її зниження поступово зменшує рухливість сперміїв та інтенсивність метаболічних процесів, які в них відбуваються. Високий вміст глюкози в більшості розчинників для сперми кнурів спричиняє значне зниження внутрішньоклітинного pH в сперміях до 6,0 і нижче, що дає можливість

клітинам переживати зберігання протягом кількох днів внаслідок сповільнення в них енергетичних процесів і зниження їх рухливості, але при дальшому підвищенні кислотності спермії гинуть. Вивести їх зі стану нерухомості можна додаванням до середовища речовин, які знижують чи нейтралізують його кислотність або підвищенням температури середовища. При підвищеній лужності спермії також швидко гинуть.

Гліколітичний метаболізм у сперміях кнурів є дуже слабким порівняно зі сперміями інших сільськогосподарських тварин і тому тільки розбавлена сперма кнурів звичайно зберігається в пластикових флаконах з незначним вмістом або й зовсім без доступу кисню з повітря, що спричиняє відчутне зменшення рухливості сперміїв навіть при відносно високій температурі. При зберіганні ж сперми кнурів з доступом повітря її pH повільно, але невпинно зростає, що активує спермії, внаслідок чого зменшується тривалість їхнього зберігання із збереженням запліднювальної здатності.

Іони в середовищах для розбавлення і зберігання свіжої сперми кнурів представлені бікарбонатом натрію і (або) цитратом натрію та в деяких розчинниках хлоридом калію. Дані сполуки використовувалися в першу чергу як буфери, пізніше в низьких концентраціях (мінімум 4 мМ K^+) для підтримання Na^+-K^+ помпи клітини для запобігання витягування внутрішньоклітинного K^+ і втрати рухливості сперміями [50]. Бікарбонат натрію є важливою складовою, яка викликає зміни складу ліпідів мембрани сперміїв після кількох хвилин витримки, що є початком фінальної дестабілізації мембрани – важливого кроку до капацитації [51]. Новіші розчинники складаються в основному з органічних буферів, зокрема TES і HEPES, які захоплюють важкі метали та утримують pH в розбавленій спермі кнурів на сталому рівні [52].

Заключення

Наведені дані свідчать про те, що при технологічній обробці сперми кнурів важливе значення відіграють температурні режими та реакція середовища для зберігання та заморожування. Чітке дотримання оптимальних термічних параметрів при відборі сперми, її розбавленні та зберіганні, а також pH середовища, в якому зберігають сперму кнурів від взяття до осіменіння, забезпечують високу біологічну цінність, життєздатність та запліднювальну здатність. У зв'язку з цим вивчення біологічних властивостей сперми та підвищення її життєздатності повинно завжди супроводжуватися дослідженням температурних режимів та реакції середовища. Більше розуміння механізмів, відповідальних за викликані холодом зміни мембрани дає краще усвідомлення стану зберігання сперми.

S. B. Kornyat, M. M. Sharan, O. B. Andrushko

PRESERVATION AND VIABILITY OF BOAR SEMEN UNDER DIFFERENT TEMPERATURE REGIMENS AND STORAGE CONDITIONS

S u m m a r y

The analytical data of the world's scientific achievements in studying temperature regimens and pH influence on the biological integrity and viability of boar semen under technological processing have been analyzed.

The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Science of Ukraine

1. *Милованов В. К.* Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных. Москва.– Издательство сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов.– 1962.– 696 с.
2. *Singleton, W. L.* State of the art in artificial insemination of pigs in the United States. // Theriogenelogy.– 2001.– V. 56.– P. 1305-1310.
3. *Johnson L. A., Weitze K. F., Fiser P., Maxwell W.M.C.* Storage of boar semen. // Animal Reproduction Science.– 2000.– V. 62.– P. 143-172.
4. *Eriksson B. M., Petersson H., Rodriguez-Martinez H.* Field Fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. // Theriogenelogy.– 2002.– V.58 (6), Oct. 1.– P. 1065-1079.

5. Інструкція із штучного осіменіння свиней. / Відповідальний за випуск Ю. Ф. Мельник.– К.: Аграрна наука.– 2003.–56 с.
6. *Плишко Н., Смирнов И., Фам Тхе Ке.* Хранение спермы при разных температурах. // Свиноводство.– 1976.– № 7.– С. 27-28.
7. *Jones A. R.* Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. // Reprod. Fertil. Dev.– 1997.– V. 9.– P. 227-223.
8. *Varguez J. M., Roldan E. R.* Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the de novo formation of phosphatidylcholine. // Mol. Reprod. Dev.– 1997.– V. 47 (1).– P. 105-112.
9. *Gadella B. M., Harrison R. A. P.* The capacitations agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent change in phospholipids transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. // Development.– 2000.– V. 127.– P. 2407-2420.
10. *Плишко Н. Т.* Способ продления жизни и оплодотворяющей способности половых клеток хряка. // Свиноводство.– 1965.– № 6.– С. 37-41.
11. *Watson P. F.* Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming, G.(Ed.), Marshall's Physiology of Reproduction 4th edn. V. 2.– Churchill Livingstone, Edinburg, 1990, P. 747-869.
12. *Funahashi H., Sano T.* Select antioxidants improve the function of extender boar semen stored at 10 degrees C. // Theriogenology.– 2005.– V. 63 (6).– P. 1605-1616.
13. *Левин К.Л.* Искусственное осеменение свиней. // Москва: Россельхозиздат.– 1980.– 128 с.
14. *Коваленко В. Ф.* Довідник техніка по штучному осіменінню свиней. // Київ: Урожай,– 1975.– 96 с.
15. *Наук В. А.* Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. // Кишинев.– Штиинца.– 1991.– 200 с.
16. *Chun-Xia Zou and Zeng-Ming Yang*. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. // Theriogenology.– 2000.– V. 53.– P. 1477-1488.
17. *Huo L. J., Yue K. Z., Yang Z. M.* Characterization viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. // Reprod. Fertil. Dev.– 2002.– V. 14 (7-8).– P. 509-514.
18. *Pursel V. G., Johnson S. A., Shuman L. L.* Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. // J. Anim. Sci.– 1973.– V. 37.– P. 532-535.
19. *Weber H.* Influence of dilution media, incubation and cooling rate on cold-shock sensitivity of boar spermatozoa. // Thesis, School of Veterinary Medicine, Hannover.– 1989.– 103 p.
20. *Tamuli M. K., Watson P. F.* Cold resistance in the live acrosome-intakt subpopulation of boar spermatozoa acquired during incubation after ejaculation. // Vet. Rec.–1994.– V. 135.– P. 160-162.
21. *Drobnis E. Z., Crowe L. M., Berger T., Anchordoguy T., Overstreet J. W., Crowe J. H.* Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. // J. Exp. Zool.– 1993.–V. 265.– P. 432-437.
22. *Holt W. V.* Basic aspects of frozen storage of semen. // Anim. Reprod. Sci.– 2000.– V. 62.– P. 3-22.
23. *Watson P. F.* Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: Rath, D. Johnson, L. A., Weitze, K. F., (Eds.), Boar Semen Preservation III Proc. 3rd Int. Conf. Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, August, 1995, Reprod. Domest. Anim.– V. 31.– Blackwell, Berlin.– 1996.– P. 135-140, (1).
24. *De Leeuw, F. E., Colenbrander B., Verkleij A. J.* The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. // Reprod. Domest. Anim.– 1990.–Suppl. 1.– P. 95-104.
25. *Sajonski H.* Die Lipide der Zytomembranen und ihre Bedentung fur die Ciefriezkon servierung von Spermien. // Vortage anlasslick des Intern. Symp. Gefrierkonserv. Von Spermien. Schonow (DDR).– 1978.– S. 64-65.

26. *Waterhouse K. E., Hofmo P. O., Tverdal A. M., Miller R. R. Jr.* Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. // Reprod.– 2006.– V. 131(5).– P. 887-894.
27. *Антонюк В. С.* Изменение содержания липидов в сперме хряка в процессе глубокого замораживания. // Доклады ВАСХНИЛ.– 1982.– № 4.– С. 31-34.
28. *Гуськов А. М.* Криогенные изменения липидов и функциональная полноценность гамет хряков и быков: Автореф дис. … канд. биол. наук. Львов.– 1984.– 24 с.
29. *Ким Е. Д.* Фосфолипиды семени с.-х. животных: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Киев.– 1966.– 27 с.
30. *Коваленко В., Бурлаченко Л.* Глубокое замораживание спермы хряков. // Свиноводство.– 1980.– № 7.– С. 27-28.
31. *Cerolini S., MaldJian A., Pizzi F., Gliorri T. M.* Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. // Reprod.– 2001.– V. 121(3).– P. 395-401.
32. *Cerolini S., Maldjian A., Surai P., Noble P.* Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. // Anim. Reprod. Sci.– 2000.– V. 58 (1-2).– P. 99-111.
33. *De Leeuw A. M., den Daas D. H. G., Woelders H.* The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. // J. Androl.– 1991.– V. 12, № 2.– P. 112-118.
34. *Holt W. V., North R. D.* Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalians sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. // J. Exp. Zool.– 1984.– V. 230.– P. 473-483.
35. *Pettitt M. J., Buhr M. M.* Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behaviour during cryopreservation. // J. Androl.– 1998.– V. 19.– P. 736-746.
36. *Watson P. F.* The causes of reduces fertility with cryopreserved semen. // Anim. Reprod. Sci.– 2000.– V. 60-61.– P. 481-492.
37. *Белоус А. М., Бондаренко В. А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. // Киев: Наукова думка.– 1982.– 256 с.
38. *Brandts J. F.* Heat effects on protein and enzymes. // Theriogenelogy, London: Acad. Press.– 1967.– P. 25-72.
39. *Crabo B. G.* Post-testicular sperm maturation and its importance to deep freezing of boar semen.// Proc. 1st Intern. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen.– Upsala.– 1985.– P. 17-37.
40. Moore H. D. M., Hibbitt K. G. The binding of labelling basic proteins by boar spermatozoa. // J. Reprod. Fertil.– 1976.– № 1.– P. 71-76.
41. *Moore H. D. M., Hibbitt K. G.* Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. // J. Reprod. Fertil.– 1977.– V. 50, № 2.– P. 349-351.
42. *Yasuhisa Y., Mutsuo O.* Localization of the sperm coating antigen on boar spermatozoa. // Jap. J. Zootechn. Sci.– 1973.– V. 44, № 1.– P. 75-78.
43. *Robertson L., Watson, P. F.* Calcium transport in diluted or cooled ram semen. // J. Reprod. Fertil.– 1986.– V. 77.– P. 177-185.
44. *Robertson L., Watson, P. F., Plummer, J. M.* Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. // Cryo-Lett.– 1988.– V. 9.– P. 286-293.
45. *Ortman K., Rodriguez-Martinez, H.* Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. // J. Vet. Med.– 1994.– Ser. A41.– P. 37-47.
46. *Bailey J. L., Buhr, M. M.* Cryopreservation alters the Ca^{++} flux of bovine spermatozoa. // Can. J. Anim. Sci.– 1994.– V. 74.– P. 45-51.
47. *Kotzias-Bandeira E., Waberski D., Weitze K. F.* Cooling of boar spermatozoa prior to freezing and post thaw quality and evaluation of the membrane state using Chlortetracyclin(CTC)-staining. // Tierarztl : Wschr.– 1997 –V. 104.– P. 302-306.
48. *Petrounkina, A., Petzoldt, R., Topfer-Petersen, E., Weitze, K.F.* Influence of fresh semen preservation on osmotic activity of boar spermatozoa during a posterior capacitacion treatment. // 5th Intern. Conf. Pig Reprod., Rolduc, The Nerherlands,– 1997.– Abstracts.– P. 126.

49. *Alvarez J. G., Storey B. T.* Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. Biol. Reprod.– 1982.– V. 27.– P. 1102-1108.
50. *Harrison R. A. P*. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. // Reprod. Fertil. Dev.– 1996.– V. 8.– P. 581-594.
51. *Crabo B. S., Brown K. I., Graham E. F*. Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. // J. Anim. Sci.– 1972.–V. 35.– P. 376-382.
52. *Weitze K. F.* The use of long-term extender in pig AI – a view of the international situation. Pig News Information.– 1990.– V. 11(1).– P. 23-26.