

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИЙ
В ЗООТЕХНИИ И ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи
УДК: 636.3.082.453.53

БРАДУ НИНА

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА BioR НА КРИОКОНСЕРВАЦИЮ
СПЕРМЫ БАРАНА**

421.01. Разведение и биотехнология воспроизводства животных

Диссертация на соискание ученой степени
доктора сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:

ДАРИЕ Григоре,
др. хаб., проф. унив.

Научный консультант:

РУДИК Валериу,
др. хаб., проф. унив.,
академик

Автор:

БРАДУ Нина

МАКСИМОВКА, 2023

**INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE BIOTEHNOLOGII
ÎN ZOOTEHNIE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 636.3.082.453.53

BRADU NINA

**INFLUENȚA PREPARATULUI BioR ASUPRA
CRIOCONSERVĂRII SPERMEI DE BERBEC**

421.01. Ameliorarea și biotehnologia reproducerii animalelor

Teză de doctor în științe agricole

Conducător științific:

DARIE Grigore,
Dr. hab., prof. univ.

Consultant științific:

RUDIC Valeriu,
Dr. hab., prof. univ.,
academician

Autor:

BRADU Nina

MAXIMOVCA, 2023

© Bradu Nina, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ADNOTARE	6
АННОТАЦИЯ.....	7
ANNOTATION.....	8
СПИСОК ТАБЛИЦ	9
СПИСОК РИСУНКОВ.....	10
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	12
ВВЕДЕНИЕ	13
1. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ	26
1.1. Физико-химические основы замораживания и оттаивания биологических объектов	26
1.2. Криповреждение сперматозоидов животных разных видов	32
1.3. Хранение спермы в глубокозамороженном состоянии	41
1.4. Устойчивость сперматозоидов к влиянию различных факторов.....	46
1.5. Выводы по первой главе	51
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ BioR, ZooBioR-1 и ZooBioR-2 НА КРИОКОНСЕРВАЦИЮ СПЕРМЫ БАРАНА	52
2.1. Материал, объекты и схема исследования показателей спермопродукции баранов- производителей.....	52
2.2. Методы исследования показателей спермопродукции баранов-производителей	56
2.3. Выводы по второй главе	62
3. ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СПЕРМОПРОДУКЦИЮ	63
3.1. Результаты оценки свежеполученной спермы баранов-производителей	63
3.2. Круглогодичное использование высокопродуктивных баранов-производителей	68
3.3. Влияние ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на воспроизводительные качества баранов- производителей.....	78
4. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ И ИХ ОПЛОДОТВОРЯЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ.....	87
4.1. Разработка метода длительного хранения спермы барана в замороженном виде	87
4.2. Изучение защитного влияния препарата BioR в составе среды для разбавления и замораживания спермы баранов	91
ВЫВОДЫ	110
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	111
ЛИТЕРАТУРА	112
ПРИЛОЖЕНИЯ	131
Приложение № 1. Патент на изобретение № 4513	131
Приложение № 2. Патент на изобретение № 1460	132

Приложение № 3. Патент на изобретение № 4715	133
Приложение № 4. Акты внедрения.....	134
Приложение № 5. Дипломы и медали, полученные на национальных и международных конференциях.....	136
ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ	141
CV – АВТОРА.....	142

ADNOTARE

**Bradu Nina „Influența preparatului BioR asupra crioconservării spermei de berbec”,
teză de doctor în științe agricole, Maximovca, 2023.**

Structura tezei: introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 213 titluri, 111 pagini de text de bază, 23 figuri, 27 tabele, 5 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 23 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: spermă, mediu de crioconservare, ejaculate, berbec-reproducător, mobilitate, volum, densitatea, acrozom, viteza de mișcare.

Scopul lucrării: perfecționarea metodelor de crioconservare a materialului seminal prelevat de la berbeci și corecția spermatogenezei în sezonul secundar al reproducției pentru eficientizarea înșămânțării artificiale a ovinelor.

Obiectivele cercetării: studiul indicilor spermogramelor în sezonul secundar al reproducției prelevate de la berbeci-reproducători de rasa Țigaie tip moldovenesc pentru lână-carne-lapte; studiul impactului preparatelor ZooBioR-1 și ZooBioR-2 asupra corecției spermatogenezei la berbeci în sezonul secundar al reproducției; determinarea eficienței introducerii preparatului BioR în componența mediului de crioconservare (glucoză-citrat-gălbenuș de ou) ca component suplimentar asupra calității spermei decongelate de berbec; evaluarea proprietăților morfologice și fiziologice ale spermatozoizilor în funcție de diluantul utilizat; elaborarea unui mediu de protecție pentru diluarea și crioconservarea spermei de berbec și studiul impactului acestuia asupra calității biologice a materialului seminal congelat-decongelat; studiul fecundității oilor înșămânțate cu spermă diluată și congelată-decongelată cu mediu de protecție pentru crioconservare elaborat.

Noutatea și originalitatea științifică: constă în completarea prevederilor teoretice existente care permit sporirea eficienței metodei biotehnologice de înșămânțare artificială a oilor cu material seminal congelat-decongelat, în condițiile Republicii Moldova. S-au obținut indicatori optimi de fecunditate la oile înșămânțate cu material seminal congelat-decongelat obținut de la berbeci din rasa Țigaie tip moldovenesc pentru lână - carne - lapte. A fost demonstrată posibilitatea colectării, crioconservării și depozitării materialului seminal congelat în banca de gene, pentru menținerea genotipurilor locale. Pentru prima dată a fost demonstrată posibilitatea sporirii criorezistenței spermatozoizilor prin introducerea în componența mediului pentru crioconservare a concentrațiilor scăzute de substanțe cu acțiuni specifice și nespecifice (BioR). În rezultatul cercetărilor au fost elaborate: recomandări pentru înșămânțarea artificială a ovinelor (2020); mediu de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci (Brevet nr. 4513); procedeu de stimulare a spermatogenezei la berbeci în extrasezon (Brevet nr. 1460).

Rezultatul obținut care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante: constă în elaborarea și implementarea în condiții de producție a unui mediu de protecție pentru diluarea și crioconservarea materialului seminal al berbecilor-reproducători, precum și corecția spermatogenezei la berbeci în sezonul secundar al reproducției, ceea ce eficientizează utilizarea acestora și crearea unei bănci genetice de material seminal congelat, care va accelera rata de ameliorare a calităților productive ale raselor locale.

Semnificația teoretică: constă în argumentarea principiilor fundamentale care stau la baza elaborării biotehnologiilor eficiente a reproducerii ovinelor.

Valoarea aplicativă: se propune o metodă de corecție a spermatogenezei la berbecii reproducători în extrasezon, care are următoarele calități pozitive: îmbunătățirea indicatorilor cantitativi și calitativi a materialului seminal proaspăt obținut, sporește rezistența spermatozoizilor în procesul de prelucrare tehnologică. Utilizarea acestei metode face posibilă obținerea pe tot parcursul anului a materialului seminal de calitate înaltă, potrivit pentru congelare și reducerea costurilor de întreținere a berbecilor prin optimizarea numărului acestora.

Se propune un mediu de protecție eficient care permite reducerea la minimum a deteriorării spermatozoizilor în procesul crioconservării.

Rezultatele cercetării au devenit baza pentru perfecționarea metodelor și mijloacelor de înșămânțare artificială a oilor și crearea unei bănci de material seminal de berbeci-reproducători valoroși.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele obținute sunt implementate la ferma de ovine STE „Maximovca”. În baza rezultatelor cercetării au fost elaborate recomandări practice pentru înșămânțarea artificială a ovinelor; a fost creată banca genetică de material seminal crioconservat prelevat de la berbeci-reproducători de mare valoare zootehnică.

АННОТАЦИЯ

Браду Нина «Влияние препарата BioR на криоконсервацию спермы барана», диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук, Максимовка, 2023.

Структура диссертации: введение, четыре главы, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения, библиография из 213 источников, 111 страниц основного текста, 23 рисунков, 27 таблиц, 5 приложений. Полученные результаты отражены в 23 научных работах.

Ключевые слова: сперма, среда для криоконсервации, эякулят, баран-производитель, подвижность, объем, концентрация, акросома, скорость движения.

Цель исследований: совершенствование методов криоконсервации спермы баранов и коррекции сперматогенеза в неслучной сезон для улучшения результативности искусственного осеменения овец.

Задачи исследований: изучить количественные и качественные показатели спермы баранов-производителей Цигайской породы овец молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления продуктивности; изучить влияния препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на коррекцию сперматогенеза баранов в неслучной сезон; определить эффективность введения препарата BioR в состав среды для криоконсервации (глюкозо-цитрато-желточную) как дополнительного компонента на качество оттаянной спермы баранов; оценить морфологические и физиологические свойства сперматозоидов в зависимости от применяемого разбавителя; разработать синтетическую среду для разбавления и криоконсервации спермы баранов и изучить её влияние на качество и биологическую полноценность заморожено-оттаянной спермы; изучить эффективность оплодотворяемости овец, осеменённых заморожено-оттаянной спермой, разбавленной перед замораживанием разработанной синтетической средой.

Научная новизна: заключается в усовершенствовании теоретических положений, позволяющих повысить эффективность биотехнологического метода искусственного осеменения овец заморожено-оттаянной спермой в условиях Республики Молдова. Получены оптимальные показатели суягности овец, осеменённых заморожено-оттаянной спермой, полученной от баранов-производителей Цигайской породы молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления. Доказана возможность сохранения замороженной спермы и создания банка генов баранов-производителей местных пород овец для сохранения местных генотипов. Впервые показана возможность повышения криоустойчивости сперматозоидов введением в состав среды для замораживания низких концентраций веществ со специфическими и не специфическими действиями (BioR). На основе проведённых исследований разработаны: рекомендации по искусственному осеменению овец (2020); среда для криоконсервации спермы баранов-производителей (Патент № 4513); способ стимуляции сперматогенеза у баранов-производителей в неслучной сезон (Патент № 1460).

Полученный результат способствующий решению важной научной проблемы: состоит в разработке и применении в производственных условиях синтетической среды для разбавления и замораживания спермы баранов-производителей, а также коррекции сперматогенеза у баранов в неслучной период, что способствует решению проблем улучшения их эффективности использования и создания генетического банка замороженной спермы, что позволит ускорить темпы улучшения продуктивных качеств местных пород.

Теоретическое значение заключается в аргументации фундаментальных принципов, лежащих в основе разработки эффективных биотехнологий воспроизводства овец.

Практическая значимость. Предложен способ коррекции сперматогенеза у баранов-производителей в неслучной сезон, обладающий следующими положительными качествами: улучшаются количественные и качественные показатели свежеполученной спермы, а также повышается резистентность сперматозоидов в процессе технологической обработки. Применение данного способа позволяет получать качественную сперму в течение всего года, пригодную для глубокого замораживания и снизить затраты на содержание баранов-производителей, за счёт оптимизации их необходимого количества. Предложена эффективная защитная среда, позволяющая минимизировать повреждение сперматозоидов в процессе криоконсервации. Результаты исследований стали основой для усовершенствования методов и способов искусственного осеменения овец и создания банка спермы высокоценных баранов-производителей.

Внедрение научных результатов: полученные результаты внедрены на овцеводческой ферме STE "Maximovca". На основании результатов исследований разработаны практические рекомендации по искусственному осеменению овец, создан генетический банк криоконсервированной спермы баранов-производителей высокой зоотехнической ценности.

ANNOTATION

Bradul Nina "The effect of BioR preparation on the cryopreservation of the ram sperm", dissertation for the degree of Doctor of Agricultural Sciences, Maksimovka, 2023.

Thesis structure: introduction, four chapters, discussion of the results, conclusions, practical suggestions, bibliography from 213 sources, 111 pages of main text, 23 figures, 27 tables, 5 appendices. The results obtained are reflected in 23 scientific papers.

Key words: sperm, medium for cryopreservation, ejaculate, breeding ram, mobility, volume, concentration, acrosome, movement speed.

The aim of the research: improving the methods of cryopreservation of ram semen and correcting spermatogenesis in a non-producing period to improve the effectiveness of artificial insemination of sheep.

Research objectives: to study the quantitative and qualitative indicators of the sperm of rams-producers of the Tsigai breed of sheep of the Moldovan type of wool-meat-dairy productivity; to study the effects of ZooBioR-1 and ZooBioR-2 preparations on the correction of spermatogenesis in rams in the secondary breeding season; to determine the effectiveness of introducing the BioR preparation into the composition of the glucose-citrate-yolk medium, as an additional component, on the quality of thawed semen of rams; evaluate the morphological and physiological properties of spermatozoa depending on the diluent used; to develop a protective medium for dilution and cryopreservation of ram semen before freezing and to study its effect on the quality and biological usefulness of frozen-thawed semen; to study the fertility efficiency of sheep inseminated with frozen-thawed sperm diluted before freezing with the developed protective medium.

Scientific novelty: it consists in the improvement of theoretical provisions that allow to increase the efficiency of the biotechnological method of artificial insemination of sheep with frozen-thawed sperm in the conditions of the Republic of Moldova. Optimal indicators of pregnancy of sheep inseminated with frozen-thawed sperm obtained from rams of the Tsigai breed of the Moldovan type of the wool-meat-and-milk direction were obtained. The possibility of obtaining, cryopreserving and storing frozen sperm in a gene bank to preserve local genotypes. For the first time, the possibility of increasing the cryoresistance of spermatozoa by introducing into the composition of the medium for cryopreservation low concentrations of substances with specific and non-specific actions has been shown (BioR). On the basis of the conducted research, the following were developed: recommendations for artificial insemination of sheep (2020); protective medium for cryopreservation of ram semen (Patent No. 4513); a method for stimulating spermatogenesis at rams in the non-roaming season (Patent No. 1460).

The obtained result, which contributes to the solution of an important scientific problem: it consists in the development and application of a protective medium under production conditions for diluting and freezing the sperm of rams, as well as correcting spermatogenesis at rams in a non-producing period, which contributes to solving problems of improving their efficiency of use and creating a genetic frozen sperm bank, which will accelerate the rate of improvement of the productive qualities of local breeds.

The theoretical significance consists in arguing the fundamental principles underlying the development of effective biotechnologies of sheep reproduction.

Practical significance. A method is proposed for correcting spermatogenesis at rams in a non-roaming season, which has the following positive qualities: the quantitative and qualitative indicators of freshly obtained sperm are improved, and the resistance of spermatozoa in the process of technological processing is also increased. The use of this method makes it possible to obtain high-quality sperm throughout the year, suitable for deep freezing and to reduce the cost of keeping rams by optimizing their required number. An effective protective environment has been proposed to minimize damage to spermatozoa during cryopreservation. The research results have become the basis for improving the methods and forms of artificial insemination of sheep and creating a sperm bank of high-value rams.

Implementation of scientific results: the obtained results are implemented at the TES sheep farm "Maximovca". Based on the research results, practical recommendations for artificial insemination of sheep have been developed, the genetic bank of cryopreserved semen taken from breeding rams of high zootechnical value was created.

СПИСОК ТАБЛИЦ

Таблица 3.1. Показатели спермопродукции баранов-производителей в случной сезон	64
Таблица 3.2. Аномалии сперматозоидов в случной сезон	66
Таблица 3.3. Скорость движения сперматозоидов в случной сезон.....	66
Таблица 3.4. Характеристика спермы в неслучной сезон	69
Таблица 3.5. Характеристика спермы в случной сезон	70
Таблица 3.6. Процент сохранности акросом в неслучной сезон	71
Таблица 3.7. Аномалии сперматозоидов в зависимости от сезона размножения	72
Таблица 3.8. Качественные показатели спермы после замораживания-оттаивания ...	72
Таблица 3.9. Гематологические и биохимические показатели крови	82
Таблица 3.10. Количество тестостерона в крови баранов-производителей опытных групп	83
Таблица 4.1. Подвижность сперматозоидов на разных этапах технологической обработки	88
Таблица 4.2. Сперматозоиды с прямолинейно-поступательным движением разных этапах технологической обработки	89
Таблица 4.3. Скорость движения сперматозоидов VAP на разных этапах технологической обработки	89
Таблица 4.4. Скорость движения сперматозоидов VSL на разных этапах технологической обработки	90
Таблица 4.5. Скорость движения сперматозоидов VCL на разных этапах технологической обработки	90
Таблица 4.6. Влияние препарата BioR на показатели подвижности сперматозоидов.	92
Таблица 4.7. Влияние препарата BioR на процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением	93
Таблица 4.8. Влияние препарата BioR на динамику подвижности сперматозоидов после оттаивания	94
Таблица 4.9. Влияние препарата BioR на динамику подвижности сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после замораживания-оттаивания	95
Таблица 4.10. Влияние препарата BioR на морфологические показатели спермы	97
Таблица 4.11. Влияние препарата BioR на скорость движения сперматозоидов - VAP	99

Таблица 4.12. Влияние препарата BioR на скорость движения сперматозоидов - VSL	100
Таблица 4.13. Влияние препарата BioR на скорость движения сперматозоидов – VCL.....	100
Таблица 4.14. Подвижность сперматозоидов после оттаивания, с периодом охлаждения перед замораживанием в течение 2-х часов	106
Таблица 4.15. Подвижность сперматозоидов после оттаивания, с периодом охлаждения перед замораживанием в течение 4-х часов	107
Таблица 4.16. Подвижность сперматозоидов после оттаивания, с периодом охлаждения перед замораживанием 6 часов.....	108
Таблица 4.17. Результаты искусственного осеменения овец заморожено - оттаянной спермой	109

СПИСОК РИСУНКОВ

Рисунок 2.1. Схема опыта №1. Показатели спермопродукции баранов-производителей.....	53
Рисунок 2.2. Схема опыта № 2. Влияние препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на коррекцию сперматогенеза баранов-производителей в неслучной сезон.....	54
Рисунок 2.3. Схема опыта № 3. Влияние препарата BioR на криорезистентность сперматозоидов при замораживании.....	54
Рисунок 3.1. Качественные показатели заморожено-оттаянной спермы	68
Рисунок 3.2. Скорость движения сперматозоидов.....	71
Рисунок 3.3. Динамика количества подвижных сперматозоидов после замораживания-оттаивания	73
Рисунок 3.4. Динамика количества сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после замораживания-оттаивания	75
Рисунок 3.5. Средняя скорость движения сперматозоидов по усредненной траектории после замораживания-оттаивания - VAP	76
Рисунок 3.6. Прямолинейная скорость движения сперматозоидов после замораживания-оттаивания - VSL	76
Рисунок 3.7. Криволинейная скорость движения сперматозоидов после замораживания-оттаивания - VCL	77
Рисунок 3.8. Объем эякулята баранов-производителей в начале и в конце опыта ...	79
Рисунок 3.9. Процент подвижных и прямолинейно-поступательных сперматозоидов в начале и в конце опыта	80

Рисунок 3.10. Концентрация сперматозоидов в эякуляте в начале и в конце опыта ...	81
Рисунок 3.11. Процент подвижных сперматозоидов после оттаивания в начале и в конце опыта	84
Рисунок 3.12. Процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после оттаивания в начале и в конце опыта	85
Рисунок 3.13. Скорость движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL) после оттаивания (ZooBioR-1).....	86
Рисунок 3.14. Скорость движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL) после оттаивания (ZooBioR-2).....	86
Рисунок 4.1. Влияние BioR на динамику сохранности акросомы.....	96
Рисунок 4.2. Подвижность сперматозоидов после замораживания-оттаивания в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации	102
Рисунок 4.3. Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после замораживания-оттаивания в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации	103
Рисунок 4.4. Скорость движения сперматозоидов VAP после замораживания-оттаивания в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации	104
Рисунок 4.5. Скорость движения сперматозоидов VSL в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации	105
Рисунок 4.6. Скорость движения сперматозоидов VCL в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BioR - экспериментальный препарат

ZooBioR-1 - экспериментальный препарат

ZooBioR-2 - экспериментальный препарат

VAP - (velocity average path), средняя скорость движения сперматозоида по усредненной траектории

VSL - (velocity straight line), усредненная по времени скорость движения сперматозоида вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точкой траектории

VCL - (velocity curve line), расстояние и скорость перемещения по всей траектории

ГЦЖ - глюкозо-цитратно-желточная среда

STE - экспериментально-технологическая станция

CEROS - компьютерная программа

Stat FAX - название биохимического анализатора

ГЖУК - глицерин - желточно - углеводно - комплексономно - трис - буферная среда

СОЭ - скорость оседания эритроцитов

ELISA -enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA (сокращённо ИФА)

ИФА - иммуноферментный анализ

Zn - цинк

Se - селен

ФЭК - фотоэлектроколориметр — оптический прибор.

АсАТ - аспаргатаминотрансфераза

АлАТ - аланинаминотрансфераза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Для многих районов Республики Молдова овцеводство является традиционно основной отраслью животноводства. За годы реформ ситуация в отрасли овцеводства приобрела критический характер. Овцеводство оказалось в сложной экономической ситуации и низкой приспособляемости к рыночным условиям. Это привело к убыточности отрасли, а в результате к сокращению поголовья овец и снижению их продуктивности.

В последнее время планируется стремление к стабилизации отрасли, появляется интерес к разведению разнообразных, более продуктивных пород овец, что позволит стабилизировать и увеличить поголовье овец. Одним из основных условий, обеспечивающих увеличение производства продуктов овцеводства, наряду с улучшением кормовой базы, повышением продуктивности овец, является интенсивное воспроизводство стада, использование биологических возможностей маточного поголовья, а также высокоценных производителей.

Разработка учеными метода низкотемпературной консервации биологических объектов была бы невозможна без глубокого познания причин и механизмов повреждения и устойчивости клеток и организмов при охлаждении и замерзании.

Была предложена теория замерзания биологических объектов (Осташко Ф.И. 1978) в которой теоретически дано объяснение закономерностям криоанабиоза - в результате переохлаждения и замерзания воды в клетках.

Многие ученые в своих исследованиях показали, что процесс замораживания - оттаивания в целом определяется физико-химическими свойствами воды, ее особым поведением при понижении температуры, тогда как на процесс кристаллизации и таяния льда влияют характер объекта, состав биологической жидкости и скорость охлаждения.

Искусственное осеменение — это высокоэффективный метод улучшения породных и продуктивных качеств животных путем использования спермы ценных племенных производителей (Милованов В.К. 1962).

Милованов В.К., Соколовская И.И. (1984) сравнили методы естественного и искусственного осеменения и установили, что если сперму вводить во влагалище, то для оплодотворения требуется от 3 до 10 млрд. сперматозоидов. Введение спермы в наружное отверстие шейки матки позволяет уменьшить требуемое для плодотворного осеменения число сперматозоидов до 300-1000 млн (Дувакина Е.В. 2019).

Установлено, что для дальнейшего совершенствования метода искусственного осеменения животных, кроме теоретических исследований, очень важно уделять внимание практическим методам и их усовершенствованию. Аванов Н.Я. (1990), Наук В.А. (1991) в своих исследованиях доказали, что данные методы должны быть связаны с анатомическими и биологическими особенностями воспроизводительной системы овец.

Установлено что, одной из причин низкой оплодотворяемости овец являются сопутствующие факторы, связанные с использованием некоторых технологических приемов и инструментария для искусственного осеменения, оказывающих отрицательное влияние на оплодотворяемость (Милованов В.К. 1962, Аванов Н.Я. 1990, Наук В.А. 1991, Деряжанцев В.И. 2007, Корнеев-Жилиев Л. В. 2008, Небогатилов Г.В. 2011, Ерохин А.С. 2017, Айбазов М.М. 2020,).

Установлено что, результативность искусственного осеменения овец спермой, сохраняемой в глубоко замороженном состоянии, все еще остается недостаточно высокой, а изучение сперматозоидов на субклеточном уровне будет способствовать разработке эффективных способов повышения живучести сперматозоидов и их оплодотворяющей способности.

В исследованиях многих авторов показано, что повышение результативности искусственного осеменения овец можно добиться с помощью использования в средах различных биологически активных веществ и соединений (Rudic V. 2016, Jäkel H. 2021, Chiselița N. 2022).

Значительные структурные и биохимические повреждения сперматозоидов происходят при технологической обработке спермы, разбавлении синтетическими средами и хранении в глубоко замороженном состоянии, которые приводят к нарушению проницаемости плазматических мембран и выхода из сперматозоидов ряда компонентов клеточного метаболизма, что значительно снижает оплодотворяющую способность сперматозоидов (Наук В.А. 1991, Нарижный А.Т. 2005, Cibotaru E. 2018).

Из анализа литературных источников следует, что основной идеей исследований служило предположение, что степень выхода клеточных ферментов из сперматозоидов зависит от их локализации и прочности связывания их со структурами сперматозоида, состава используемой среды, режимов хранения и др. Таким образом, выяснение состояния защиты в процессе хранения разбавленной спермы позволит выявить новые пути повышения биологической полноценности сперматозоидов при долговременном хранении спермопродукции. Разрешению этой важной проблемы могут послужить сравнительные исследования особенностей сперматозоидов баранов реагировать на

термодинамические процессы, а, следовательно, на образование защитных реакций и адаптационных свойств, при хранении вне организма.

Анализ литературных источников позволяет заключить, что в этой связи представляется перспективным разработать более эффективные синтетические среды для длительного хранения спермы баранов с применением антиоксидантов, биологически активных веществ и других криопротекторов. Приобретает большое значение и применение физических способов обработки спермы, в частности при оттаивании спермы баранов.

В зоотехнии перспектива использования заморожено-оттаянной спермы открывает широкие практические возможности и, в то же время, ставит задачу более интенсивного использования ценных баранов-производителей не только в случной период, но и в другие сезоны года путём накопления от них замороженной спермы.

Улучшение селекционно-племенной работы невозможно без применения такого прогрессивного метода в разведении животных, как искусственное осеменение с использованием глубокозамороженной спермы.

Искусственное осеменение дает возможность одним эякулятом, полученным от самца, осеменить несколько самок. Это стало самое крупное открытие в области животноводства после приручения и одомашнивания животных (Милованов В. К. 1962, Студенцов А. П. 2011, Куликова Н.И. 2018, Селионова М.И. 2018).

В селекционно-племенной работе разработка более современных биотехнологических методов замораживания спермы позволит существенно повысить масштабы использования высокопродуктивных самцов в процессе воспроизводства. Данная разработка позволяет увеличить интенсивность отбора баранов-производителей, точность оценки их племенной ценности и, тем самым, увеличить эффективность селекционно-племенной работы в овцеводстве. Решение проблемы длительного хранения спермы баранов позволит хранить сперму годами и создавать нужные запасы генетического материала, а также в неограниченных размерах производить перевозки замороженной спермы баранов в целях племенного подбора заказных спариваний, межпородных скрещиваний и выведения новых пород.

Эффективность отрасли в новых экономических условиях и формах ведения хозяйств особенно зависит от уровня организации воспроизводства овец. Однако потенциальные возможности искусственного осеменения реализуются не полностью. Одной из главных причин такого положения является трудоемкость ряда технологических операций при проведении искусственного осеменения. Поэтому, наряду с

совершенствованием биотехнологических методов воспроизводства овец, актуальное значение приобретает и создание новых эффективных технологий длительного хранения спермы баранов в замороженном состоянии.

Цель исследований. Совершенствование методов длительного хранения спермы баранов и коррекции сперматогенеза в неслучной сезон для улучшения результативности искусственного осеменения овец.

Задачи исследований. Для достижения поставленной цели были запланированы следующие задачи:

- изучить количественные и качественные показатели спермы баранов-производителей Цигайской породы овец молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления продуктивности;
- изучить влияния препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на коррекцию сперматогенеза баранов в неслучной сезон;
- определить эффективность введения препарата BioR в состав среды для криоконсервации (глюкозо-цитрато-желточную) как дополнительного компонента на качество размороженной спермы баранов;
- оценить морфологические и физиологические свойства сперматозоидов в зависимости от применяемого разбавителя;
- разработать синтетическую среду для разбавления и криоконсервации спермы баранов и изучить ее влияние на качество и биологическую полноценность заморожено-оттаянной спермы;
- изучить эффективность оплодотворяемости овец, осемененных заморожено-оттаянной спермой, разбавленной перед замораживанием разработанной синтетической средой.

Гипотеза исследования основана на том, что повышение эффективности воспроизводства овец возможно за счет применения новых биотехнологических методов, позволяющих эффективно использовать генетический потенциал высокоценных производителей. Применение биологически активных препаратов, для коррекции сперматогенеза в неслучной период у баранов-производителей, позволили улучшить количественные и качественные показатели спермы и тем самым повысить устойчивость сперматозоидов при криоконсервации, что позволит повысить эффективность круглогодичного использования баранов-производителей и создания генетического банка спермы.

Синтез методологии исследования и обоснование выбранных методов исследования. Применены макроскопические, микроскопические, морфологические и кинетические методы оценки спермопродукции баранов-производителей и внедрены в процессе криоконсервации спермы с применением при искусственном осеменении овец, одновременно оценена эффективность применения биологически активного препарата (BioR) при замораживании спермы баранов-производителей в лабораторных и производственных условиях.

Объектами исследования были бараны-производители Цигайской породы молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления и их сперма. В лабораторных условиях оценку качественных показателей свежеполученной спермы, а также в процессе разбавления, охлаждения, замораживания и оттаивания проводили при помощи компьютерной системы «CEROS» (Versiunea 12.3).

Биологически активные препараты BioR, ZooBioR-1 и ZooBioR-2 изготавливались Институтом микробиологии и биотехнологии технического университета.

Для подтверждения гипотезы исследований в соответствии с поставленной целью и задачами исследований применялись современные методы исследования. Исследовали: процент живых сперматозоидов в эякуляте, процент сперматозоидов с прямолинейно - поступательными формами движения, скорость движения сперматозоидов VAP, VSL и VCL в процессе технологической обработки спермы, используя специализированную компьютерную программу CEROS; динамику аномальных форм сперматозоидов; целостность акросомы сперматозоидов в процессе технологической обработки спермы; динамику изменения гормона тестостерона; морфологические и биохимические исследования крови у баранов; определяли оплодотворяемость овец осемененных заморожено-оттаянной спермой по результатам окота овец.

Резюме разделов диссертации

Глава 1. «Технологические аспекты криоконсервации биологических объектов». Проанализирована информация по 213 источникам литературы. Данная глава разделена на 4 части, в которых:

- представлены научные данные по физико-химическим основам замораживания и оттаивания биологических объектов, где показаны причины и механизмы повреждения, и их устойчивость, необходимые при разработке методов низкотемпературного консервирования биологических объектов;

- описаны методы криповреждений сперматозоидов и метод криобиологии спермы животных, которые открыли большие возможности не только в ускорении

развития и широком внедрении метода искусственного осеменения животных, а также дали возможность для сохранения генетически наиболее ценных и исчезающих пород и видов животных. В овцеводстве, согласно литературным источникам, метод криоконсервации ещё не получил широкого практического применения, данный метод связан с нестабильностью результатов осеменения, однако исследования в данном направлении являются весьма перспективными;

- освещены методы хранения спермы в глубоко замороженном состоянии, при этом отмечается, что эффективность низкотемпературного замораживания, как указано в научной литературе, в значительной степени зависит от использования синтетических защитных сред, которые должны содержать неэлектролиты, электролиты, фосфолипиды, антиоксиданты, криопротекторы, биологически активные соединения и другие вещества, которые призваны обеспечить биологическую полноценность сперматозоидов в процессе их технологической обработки;

- изложены методы устойчивости сперматозоидов к влиянию различных факторов, действие яичного желтка куриных яиц от холодового удара сперматозоидов при охлаждении спермы, криозащитное действие глицерина, вводимого в состав криозащитных сред и влияние процесса замораживания – оттаивания на сохранение биологической полноценности сперматозоидов.

Глава завершается выводами.

Глава 2. «Объекты и методы проведения исследований влияния препаратов BioR, ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на криоконсервацию спермы барана» представляет схему научных исследований, объекты и методы исследований, используемые при выполнении научных опытов по теме диссертации.

В качестве основных биологических объектов исследований были использованы бараны-производители Цигайской породы молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления в возрасте 2 - 4 лет и сперма, полученная от них с использованием искусственной вагины, а также препарат BioR, разработанный в Институте микробиологии и биотехнологии Технического университета.

Выявление эффективности препарата BioR вводимого в состав синтетической среды ГЦЖ, как дополнительный компонент, на качество заморожено - оттаянной спермы проводили в лаборатории «Биотехнологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов» Научно-Практического Института Биотехнологии в Зоотехнии и Ветеринарной Медицины с применением компьютерной программы «CEROS».

Определение эффективности препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на коррекцию сперматогенеза у баранов в неслучной сезон проводили на овцеводческой ферме Экспериментально - технологической станции «Максимовка» с использованием баранов-производителей Цигайской породы молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления. Полученные данные позволили применить предлагаемый ZooBioR-1 и ZooBioR-2 для стимуляции и коррекции сперматогенеза у баранов в неслучной сезон с целью получения, оценки и замораживания спермы для хранения в спермобанке лаборатории «Биотехнологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов».

Биохимические и гематологические исследования проб крови подопытных баранов выполняли в лаборатории «Биотехнологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов» Научно-Практического Института Биотехнологии в Зоотехнии и Ветеринарной Медицины с использованием биохимического анализатора Stat FAX.

Разработку синтетической среды для замораживания спермы баранов-производителей с применением препарата BioR, вводимого в качестве как дополнительного компонента в состав синтетической среды ГЦЖ в концентрации от 0,1 до 1,0 %, выполняли в условиях лаборатории «Биотехнологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов» Научно-Практического Института Биотехнологии в Зоотехнии и Ветеринарной Медицины.

Оценку качественных показателей спермы баранов-производителей проводили согласно ГОСТУ 32277-2013 для передачи на хранение в спермобанке лаборатории «Биотехнологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов»

Статистическую обработку полученного цифрового материала проводили с применением пакета пользовательских программ Microsoft Excel.

Глава завершается выводами.

Глава 3. «Влияние биологически активных препаратов на спермопродукцию» включает 3 раздела.

В разделе 3.1. «Результаты оценки свежеполученной спермы баранов-производителей», отражены результаты исследований и оценки спермограммы баранов-производителей Цигайской породы молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления по: объёму эякулята, подвижности сперматозоидов, концентрации сперматозоидов в эякуляте, проценту сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением, скорости движения (VAP, VSL, VCL), морфологическими аномалиями и целостности акросомы, а также пригодность эякулята к замораживанию и накоплению их в спермобанке.

Раздел 3.2 «Круглогодичное использование высокопродуктивных баранов-производителей» посвящён разработке методов коррекции сперматогенеза у баранов-производителей в неслучной сезон с целью накопления от них максимального количества доз замороженной спермы высокого качества. Качественные параметры спермы, полученной от баранов-производителей в неслучной сезон, изучались в сравнении с аналогичными параметрами в случной сезон по: подвижности, объему эякулята, концентрации сперматозоидов и по общему количеству сперматозоидов в эякуляте. По результатам сравнительных исследований было установлено, что в неслучной сезон, полученные эякуляты спермы от баранов-производителей, малопригодны для замораживания при -196°C по сравнению с полученными эякулятами в случной сезон.

Также в данном разделе представлены данные по влиянию сезона года на криоустойчивость сперматозоидов баранов-производителей. При этом установлено, что в неслучной сезон сохранение биологической полноценности сперматозоидов после криоконсервации (подвижность) была ниже на 6% по сравнению со случным сезоном.

Скорость движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL) в неслучной период ниже по сравнению со случным периодом.

Выживаемость сперматозоидов при $+37^{\circ}\text{C}$ после оттаивания и сохраняемой в течение 5 часов в неслучной сезон, также ниже на 9,1 % по сравнению со случным сезоном.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что для эффективного круглогодичного использования высокоценных баранов-производителей необходимо научно обосновать и разработать более совершенные методы эффективного использования генофонда высокоценных производителей для ускорения темпов повышения племенных и продуктивных качеств овец, разводимых в Республике Молдова.

В Разделе 3.3 «Влияние ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на воспроизводительные качества баранов-производителей» отражены результаты исследования по влиянию метода стимуляции сперматогенеза в неслучной сезон экзогенным введением в основной рацион кормления биологически активных препаратов. С этой целью была изучена эффективность препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2, которые вводили дополнительно к основному рациону по 5 г на голову в сутки в течение 50 дней. Установлено, что объем эякулята, подвижность сперматозоидов после замораживания-оттаивания, скорость движения сперматозоидов, были выше в конце периода исследований у баранов опытной группы по сравнению с контрольной. Также было установлено, что уровень гормона тестостерона был выше в опытной группе. Эффективность метода коррекции

сперматогенеза у баранов в неслучной сезон подтверждена патентом на изобретение № 1460.

Глава 4. «Криоконсервация сперматозоидов и их оплодотворяющая способность» включает 2 раздела.

Раздел 4.1 «Разработка метода длительного хранения спермы баранов в замороженном виде». Полученные результаты позволили установить, что использование коммерческой среды ГЦЖ позволяет получить после замораживания-оттаивания довольно большие колебания подвижности (от 11 до 46%), что не удовлетворяет специалистов, занимающихся этими вопросами.

Раздел 4.2 «Изучение защитного влияния препарата BioR в составе среды для разбавления и замораживания спермы баранов». Был испытан препарат BioR, синтезированный в Институте микробиологии и биотехнологии, обладающий антиоксидантным действием, стабилизирующий клеточные мембраны, вводимый в состав ГЦЖ среды в концентрациях от 0,1 до 1,0% на эффективность сохранения биологической полноценности сперматозоидов в процессе разбавления, охлаждения, замораживания и оттаивания спермы.

Установлено, что введение препарата BioR в состав ГЦЖ среды в концентрации 0,6%/V позволило получить наивысшие показатели по подвижности, выживаемости при +37 °C, сохранении целостности акросом, скорости движения сперматозоидов по сравнению с контрольной группой, где применялась среда ГЦЖ без добавления препарата BioR.

Оплодотворяемость овцематок, осемененных заморожено-оттаянной спермой, где в состав среды вводили 0,6%/V BioR, составила 47,8%. На разработанную среду получен патент на изобретение № 4513.

Раздел «Литература» включает 213 литературных источника, цитируемых в диссертационной работе.

Раздел «Приложения» включает: акты внедрения, копии патентов на изобретение, дипломы и медали, полученные на национальных и международных конференциях.

Научная новизна заключается в усовершенствовании теоретических положений, позволяющих повысить эффективность биотехнологического метода искусственного осеменения овец заморожено-оттаянной спермой в условиях Республики Молдова.

Впервые изучен уровень спермопродукции баранов-производителей Цигайской породы молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления и получены

оптимальные показатели суягности овец, осемененных заморожено-оттаянной спермой, полученной от баранов-производителей

Доказана возможность сохранения замороженной спермы и создания банка генов баранов-производителей местных пород овец для сохранения местных генотипов.

Впервые показана возможность повышения криоустойчивости сперматозоидов введением в состав среды для замораживания низких концентраций препаратов со специфическими и неспецифическими действиями (BioR).

Научная новизна представленных в диссертационной работе проведенных исследований подтверждена патентами на изобретение № 4513, № 1460.

На основе проведенных исследований были разработаны:

1. Рекомендации по искусственному осеменению овец одобрены и рекомендованы в практику Ученым советом Научно-Практического Института Биотехнологии в Зоотехнии и Ветеринарной Медицины
2. Защитная среда для криоконсервации семенного материала баранов (Патент на изобретение № 4513).
3. Способ стимуляции сперматогенеза у баранов в межсезонье (Патент на изобретение № 1460).
4. Способ оценки морфологии сперматозоидов с использованием компьютерной программы CEROS.

Полученный результат, способствующий решению важной научной проблемы. Разработана и предложена для широкого практического применения синтетическая среда для замораживания спермы баранов-производителей (Патент на изобретение № 4513) с целью создания банка спермы высокоценных баранов-производителей местной и импортной селекции. Разработан способ коррекции сперматогенеза производителей в неслучной сезон, который позволяет использовать высокоценных баранов-производителей в течение всего года, что способствует решению научной проблемы интенсивного использования высокопродуктивных производителей, проверенных по качеству потомства для улучшения племенных и продуктивных качеств местного поголовья овец.

Теоретическое значение заключается в обосновании и разработке эффективных методов воспроизводства овец, реализуемого путём создания банка спермы высокоценных баранов-производителей, что позволяет ускорить процесс улучшения продуктивных качеств поголовья овец и более эффективно использовать имеющийся генофонд.

Практическая значимость. На овцеводческой ферме экспериментально - технологической станции «Максимовка» апробирована новая синтетическая среда для замораживания спермы баранов-производителей при -196 °С и доказана её эффективность.

Предложен способ коррекции сперматогенеза у баранов-производителей в неслучной сезон, обладающий следующими положительными качествами: улучшаются количественные и качественные показатели свежеполученной спермы, а также повышается резистентность сперматозоидов в процессе технологической обработки. Применение данного способа позволяет получать качественную сперму в течение всего года, пригодную для глубокого замораживания и снизить затраты на содержание баранов-производителей за счёт оптимизации их необходимого количества.

Результаты исследований стали теоретической основой для усовершенствования методов и способов искусственного осеменения овец и создания банка спермы высокоценных баранов-производителей, которые ускорят темпы генетического улучшения низкопродуктивного маточного поголовья овец в Республике Молдова.

Использованные в исследованиях препараты являются биологически активными веществами, способствующими стабилизации биологических мембран в процессе технологической обработки спермы, а также при её замораживании - оттаивании, и сохранении на довольно высоком уровне оплодотворяющей способности оттаянных сперматозоидов.

Полученный экспериментальный материал и результаты исследований были использованы при разработке рекомендаций по Искусственному осеменению овец (Dărie Gr. și al. 2020).

Основные положения, выносимые на защиту: результаты морфологических исследований сперматозоидов баранов по активности, выживаемости и скорости движения сперматозоидов на разных этапах технологической подготовки спермы к глубокому замораживанию; разработка и практическое применение усовершенствованной среды для длительного хранения спермы баранов-производителей (Патент на изобретение № 4513); разработка и практическое применение коррекции сперматогенеза у баранов в неслучной сезон (Патент на изобретение № 1460).

Внедрение результатов исследований: результаты исследований по теме диссертации используются в протоколах, проводимых в лаборатории «Биотехнологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов» опытов, в обучении студентов, магистрантов, докторантов Департамента RASA, ТУМ по специальностям: с/х

биотехнологии и зоотехнии; в практике воспроизводства овец на Экспериментально - технологической станции «Максимовка». На основании полученных результатов исследований разработаны практические рекомендации по искусственному осеменению овец (Darie Gr. și al. 2020); создан спермобанк замороженной спермы элитных баранов-производителей, в котором находится на хранении более 2000 доз спермы, пригодной для использования в сети искусственного осеменения овец.

Апробация работы. Основные результаты, изложенные в диссертации, были доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета Научно-Практического Института Биотехнологии в Зоотехнии и Ветеринарной Медицины в 2016 - 2022 гг., на научных конференциях: Simpozionul Științific cu participare internațională dedicat aniversării a 60-a de la fondarea Institutului, 29 septembrie-01 octombrie, Maximovca, 2016. Simpozionul Științific Internațional „85 ani ai Facultății de Agronomie-realizări și perspective”, Chișinău, 2018. Международная научно-практическая конференция: „Научные основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных” Краснодар, 2016. International Scientific Symposium: "Modern animal husbandry – food safety and durable development", Iasi-România, 2016. Scientific conference with international participation. “Animal Science-challenges and innovations”. Institute of Animal Science-Kostinbrod Sofia, Bulgaria, 2017. Simpozionul științific internațional: „Modern Animal Husbandry – Food Safety And Durable Development” Iași, 2019. Conferința „Cercetări și inovații în viziunea tinerilor cercetători” „Cadet INOVA'20”, Sibiu, România, 26-28 martie 2020. Conferința științifico-practică cu participare internațională „Inovații în zootehnie și siguranța produselor animaliere – realizări și perspective”. Maximovca, 30 septembrie – 01 octombrie 2021.

По материалам диссертации опубликовано 23 научные работы, в том числе: одна рекомендация по искусственному осеменению овец, а также по теме диссертации получено три патента на изобретение.

Личный вклад соискателя. Экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично, согласно институционального научного проекта (2015-2019) „Asigurarea suportului științific la competitivitatea producțiilor zootehnice prin valorificarea biotehnologiilor în ameliorare, nutriție, reproducție și asanarea animalelor autohtone și de import” cu cifrul 15.817.05.01.A. Проведены опыты по изучению влияния препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2 с целью стимуляции сперматогенеза у баранов-производителей в неслучной сезон. Изучены количественные и качественные показатели спермограммы баранов-производителей. На базе проведенных исследований получен патент на изобретение № 1460 (Способ стимуляции сперматогенеза у баранов в

межсезонье). Согласно государственной научной программе (2020-2023) „Managementul potențialului genetic și a producțiilor animalelor de rasă reproduse și exploatare în condițiile pedoclimaterice ale Republicii Moldova” 20.80009.5107.20 проведены исследования по изучению влияния препарата BioR, введенного как дополнительный компонент в состав синтетической среды для замораживания спермы баранов-производителей на качественные показатели спермы после её криоконсервации. Полученные результаты позволили получить патент на изобретение № 4513.

Публикации. Основные материалы исследований опубликованы в 23 публикациях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 111 страницах компьютерного исполнения, содержит 27 таблиц, 23 рисунка. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных исследований, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Список литературы включает 213 источников.

1. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

1.1. Физико-химические основы замораживания и оттаивания биологических объектов

Исследованиями доказано, что при охлаждении и замораживании клеток и организмов без глубокого познания причин и механизмов их повреждения и устойчивости невозможна успешная разработка методов низкотемпературной консервации биологических объектов (Борончук Г.В., Балан И.В. 2003, 2008). Реальное разрешение получила проблема временной, обратимой остановки жизни. Открыты искусственные условия, в которых можно в замороженном жизнеспособном состоянии сохранить клетки, ткани и другие объекты в течение срока, значительно превышающего продолжительность их физиологической жизни (Борончук Г.В., Балан И.В. 2003). Исследованы механизмы криозащиты, открыты криопротекторы, предупреждающие повреждения биологических структур при воздействии глубокого холода (Осташко Ф.И. 1978, Наук В.А. 1991, Rotari D. 2022).

Работы Милованова В.К. (1962, 1972) положили начало теории замораживания спермы производителей сельскохозяйственных животных. Им впервые было дано теоретическое обоснование закономерностей криоанабиоза в результате переохлаждения и замораживания воды в клетках. Показано, что переохлаждение и снижение температуры жидкости ниже точки ее замерзания до критической температуры играет существенную роль в сохранении жизнеспособности клеток. При охлаждении и замораживании клеток и организмов, без глубокого познания причин и механизмов повреждения и устойчивости невозможна успешная разработка методов низкотемпературной консервации биологических объектов (Борончук Г.В., Балан И. В., 2003).

Милованов В.К. (1962), Лозино-Лозинский Л.К. (1972), Осташко Ф. И. (1978) используя термодинамический метод, а также применение электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа расшифровали процессы, происходящие на начальных этапах замораживания. При использовании термодинамического метода основное влияние авторы уделяли изучению процессов в среде замерзания, динамике образования внутри и внеклеточного льда, образованию внутриклеточных растворов солей при замерзании воды и действию их на клетки. Также было показано, что процесс замораживания-оттаивания в целом определяется физико-химическими свойствами воды, ее особым поведением при

понижении температуры, тогда как на процесс кристаллизации и таяния льда влияет характер объекта, состав биологической жидкости и скорость охлаждения.

Сведения о структуре воды являются ключом для понимания процессов, которые происходят при охлаждении и замораживании (Белоус А. М. 1982).

Вода, как известно, принимает участие во всех жизненных процессах. Она не просто растворитель, в котором протекают все биохимические реакции, но и структурный компонент клетки (Осташко Ф.И. 1978, Белоус А.М. 1982, Zāhan M. 2017). Вода составляет около 80% сухой массы клеток и тканей, при этом 10-15% прочно связано в молекулах и не замерзает. Вода обладает особыми физическими – аномалиями. Наиболее характерные из них - высокие значения точки кипения и замерзания, критическая температура, диэлектрическая проницаемость, теплота плавления, способность увеличивать объем при переходе из жидкого состояния в твердое, сжиматься при таянии и переохлаждаться (Белоус А.М. 1982).

Исследованиями установлено, что в капиллярах и клетках чистая вода замерзает при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ и даже $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Эти свойства воды объясняются уголковым строением её молекулы, а также способностью связываться с другими молекулами воды, биомакромолекулами и поверхностью различных частиц при помощи водородных связей Н-О-Н. Таким образом, кристаллическая решетка из молекул воды в виде тетраэдра, у которого угол между связями центра и вершиной равен $109\text{ }^{\circ}\text{C } 28'$. Способность воды переохлаждаться в капиллярах до $-30\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Белоус А. Н. (1977) и Cury M. R. (2000) объясняют её связыванием капиллярными системами и увеличением упорядоченности структуры. При температуре около $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, вода принимает нестабильную «льдообразную» структуру, обладающую центрами, вокруг которых образуются кристаллы. Механический удар, загрязнение способствуют внезапной кристаллизации. Напротив, кипение разрушает центры кристаллизации, разрушает порядочность структур. Установлено, что растворы солей, сахара, глицерина как бы скрепляют решетку и дольше сохраняются в переохлажденном состоянии. Фазовый переход воды из жидкого состояния в твердое происходит в широком диапазоне температур от $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В этой зоне вода принимает жидкокристаллическое состояние. Замерзая, она образует кристаллы гексагональной формы, при этом выделяется скрытая теплота кристаллизации (320 Дж/г). Лёд имеет рыхлые структуры и занимает большой объем, чем вода. Форма кристаллов зависит от температуры, скорости охлаждения и состава раствора (Luyet M. 1937).

Исследованиями установлено, что растворы образуют несколько типов кристаллов гексагональной формы, неправильные дендриты и полные сферолиты.

Дендриты крупные, неправильной разветвленной формы. Сферолиты невелики и возникают при большой скорости охлаждения. Если скорость замораживания настолько высока, что молекулы воды не успевают переохлаждаться и образовать кристаллическую решётку, вода переходит не в кристаллическое, а аморфное состояние или превращается в стеклообразный лёд. Это явление, получило название «витрификация» и было впервые описано M. Luyet (1937).

Открытие витрификации сыграло большую роль в разработке методов низкотемпературной консервации спермы, так как не кристаллическое замерзание мало повреждает клетки и сохраняет их жизнеспособность (Грочевский Э.Я. 1988, Yoshino T. 1993, Zăharin M. 2013). Однако, как указывают авторы, оно происходит лишь при очень высоких скоростях охлаждения, порядка 500 °C/с, что практически не достижимо.

Исследованиями было показано, что стекловидное состояние неустойчиво, так как, начиная с температуры -100 °C происходят образование и укрупнение кристаллов. Это явление называли рекристаллизацией при оттаивании или миграционной кристаллизацией.

Рекристаллизация является губительной для клеток. Стекловидное состояние можно сохранить при температуре ниже – 130 °C. Это дало повод ученым провести поиск защитных веществ, которые бы способствовали не кристаллическому замерзанию.

Наиболее эффективным оказался глицерин. Использование глицерина при замораживании спермы сельскохозяйственных животных английскими учеными Polge C., Rowson L. (1952) позволило разработать метод криоконсервации спермы быков, который быстро вошел в зоотехническую практику.

Исследованиями установлено, что весь температурный интервал, происходящий при охлаждении клеток, был разделен на ряд температурных зон. Процессы, протекающие в сперме при охлаждении, наиболее точно отражает шкала, предложенная Осташко Ф.И. (1978). Автор выделяет следующие температурные зоны: от 40 до 25 °C – зона высокой активности обменных процессов; от 25 до - 5 °C – зона понижения уровня обменных и перехода в состоянии анабиоза; от 0 до - 80 °C зона низких температур, перехода в состоянии анабиоза, переохлаждения и кристаллизации вне- и внутриклеточной воды и солей; от -80 до -150 °C – зона ультранизких температур, при которых имеет место полная кристаллизация и рекристаллизационные процессы; от -150 до -273 °C – зона отсутствия кристаллизационных и рекристаллизационных процессов. Схема эта наиболее хорошая, так как отражает уровень жизнедеятельности клеток, а также характер физико-химических процессов, которые протекают в той или иной температурной зоне.

Открытие витрификации и физико-химических процессов, протекающих при переохлаждении, сыграло существенную роль в разработке метода криоконсервации спермы сельскохозяйственных животных.

Применение быстрого режима замораживания при температуре -78 , -196 °C для спермы кроликов, баранов и быков (Нгумак К. 2020) послужило точкой для разработки технологии криоконсервации спермы быков в форме открытых гранул (Nagase H., Niwa T. 1964).

Осташко Ф.И. (1978) установил, что сперма животных оказалась прекрасным модельным объектом для изучения физико-химического и биологического действия охлаждения на клетку. Это обусловлено тем, что она представляет собой суспензию сперматозоидов, взвешенных в плазме, являющейся сложной биологической жидкостью. Малые размеры сперматозоидов (55-100 мкм) позволяют охлаждать их с большой скоростью, что дает возможность наблюдать витрификацию клеток (Осташко Ф.И. 1978).

Исследования, проведенные по криоконсервации спермы животных, позволили высказать предположение об одновременном протекании процессов кристаллического затвердевания воды в межклеточной жидкости и витрификации клеток (Смирнов И.В. 1974, Осташко Ф. И. 1978).

Согласно схеме, предложенной Смирновым И.В. (1974), при медленном охлаждении спермы свободная вода вне- и внутри клетки затвердевает в виде крупных кристаллов, что приводит их к гибели. Также сперматозоиды гибнут при быстром погружении в жидкий азот, так как вода не успевает выйти из клеток и для ее витрификации нужны недостижимые в практике скорости. При охлаждении с оптимальной скоростью в межклеточной жидкости начинается кристаллическое затвердевание воды, и образуются концентрированные растворы солей и сахаров. Под действием гиперконцентрированных растворов благодаря осмотическому давлению из сперматозоидов выходит свободная вода. Вода же, связанная с белками, резко отличается по свойствам от свободной, она образует мелкие кристаллы, не разрушая клетки (Patist A. 2005, Tucker M.J. 2007, Усипбек Б.А. и др. 2018).

Платов Е.М. (1973) провел интересные исследования о влиянии кристаллизации и изменения физико-химических свойств среды на результаты замораживания спермы и установил четкую связь между скоростью замораживания, формой кристаллов и выживаемостью сперматозоидов.

Автор доказал, что в начальном периоде медленного охлаждения (от 0 до -10 °C) сперматозоиды вытесняются кристаллами в жидкую фазу, где располагаются в

межкристалльных каналах. При дальнейшем быстром охлаждении (от -11 до -196 °C), а также при наличии защитных веществ (глицерина, сахаров) вода замораживается не только внутри сперматозоидов, но и снаружи, где образуются защитные некристаллические зоны. Быстрое охлаждение в опасной зоне (-15, -50 °C) необходимо для сокращения времени пребывания сперматозоидов в концентрированных растворах солей.

По мнению Платова Е.М. (1973), вся внутри - и внеклеточная вода в охлажденной и замороженной сперме находится в структурированном псевдокристаллическом виде, что ведёт к витрификации. Защитное действие глицерина и сахаров связано с тем, что эти вещества структурируют воду, упорядочивают ее структуру.

Осташко Ф. (1978) в своих исследованиях установил, что механическое повреждение сперматозоидов кристаллами льда маловероятно из-за малых размеров сперматозоидов и эластичности мембран, а применение оптимальных режимов замораживания и криопротекторов позволяет до минимума свести действие этих факторов.

Большую опасность для сперматозоидов представляют осмотические явления на мембране, возникающие в результате быстрого охлаждения или оттаивания клеток (Милованов В.К. 1962, Осташко Ф.И. 1978, Борончук Г.В., Балан И. В. 2003).

Антонюк В.С. (1988) в своих исследованиях установил, что губительное действие на половые клетки имеют растворы с отклонением осмотического давления от нормы. При действии на сперматозоиды гипотонических растворов возникает явление плазмоптиза. Сперматозоиды набухают вследствие проникновения в протоплазму воды, изменяют направление движения, хвосты их закручиваются и в конечном итоге они гибнут. Под действием гипертонических растворов происходит явление плазмолиза. Вода из протоплазмы сперматозоидов выходит в окружающую среду, вследствие чего они сморщиваются, хвосты их деформируются и так же погибают. Автор пришел к выводу, что прекращение движения сперматозоидов под влиянием неизотонических растворов, следует считать нарушение конфигурации клетки вследствие разницы молекулярной концентрации в среде и клетке.

Осташко Ф. (1978), Watson P.F. (1985, 1981), Борончук Г.В., Балан И.В. (2008) доказали, что температурный шок – это главный фактор в механизме повреждения сперматозоидов при охлаждении. В основе механизма температурного шока лежит повреждение мембраны сперматозоидов, вызываемое уравниванием концентрационного градиента, который возникает на границе раздела клетка-среда при

резком изменении температуры. Так как клетки окружены мембраной, обладающей избирательной проницаемостью, уравнивание происходит в результате выхода или входа воды из клетки. Слишком быстрый поток воды через мембраны может привести к ее повреждению.

Горбунов Л.В. (2002) в своих исследованиях установил, что при замораживании воды увеличивается концентрация солей в межклеточной жидкости, что приводит к возникновению градиента осмотического давления на клеточной мембране и возникает выход воды из клетки. Наблюдается дегидратация клетки и уменьшение ее объема. Полученные зависимости можно использовать для определения критической скорости охлаждения, превышение которой приводит к гибели клеток вследствие того, что вода не успевает выйти из них.

Смирнов И.В. (1974), Осташко Ф. (1978) изучая температурные кривые замораживания спермы сельскохозяйственных животных показали, что применяемые на практике режимы замораживания, являются двухэтапными. При замораживании спермы в форме гранул температура от 0 до -10 °C падает медленно, а затем от -11 до -196 °C падает быстро.

Кинетика обезвоживания клеток, предложенная Mazur Р. (1966), при замораживании послужила двухфакторной основой повреждения биологических объектов, согласно которой на первом этапе (от 0 до -7 °C) наиболее отрицательно действует фактор, заключающийся в быстрой дегидратации клеток, а на втором (от -7 до -50 °C) наиболее опасна повышенная концентрация солей. Влияние каждого фактора зависит от вида клеток, состава разбавителей и скорости замораживания: замедленная скорость замораживания необходима на первом этапе, а на втором – повышенная для уменьшения отрицательного действия гиперконцентрации солей.

Медленное замораживание на первом этапе способствует внеклеточной кристаллизации и сперматозоиды находятся в концентрированных растворах, обезвоживаются. Дегидратация способствует витрификации воды внутри клеток, а также образованию мелких кристаллов, не повреждающих сперматозоиды.

Особое внимание необходимо уделить процессу оттаивания спермы, так как в период рекристаллизации при повышении осмотических нагрузок на мембрану отмечается больше всего повреждений сперматозоидов.

Бугров А. Д., Олексеев Т. Д. (1977) установили, что наиболее критические зоны при оттаивании находятся в диапазоне температур от -50 до -30 °C и от -30 до 0 °C. Авторы установили, что скорость процесса рекристаллизации можно уменьшить

подбором криопротектора, действие же гиперконцентрации солей – увеличением скорости оттаивания. Чем выше скорость оттаивания, тем меньше размер возникающих кристаллов и меньше время пребывания сперматозоидов в концентрированных растворах солей, а чрезмерно большой нагрев опасен для сильно обезвоженных сперматозоидов из-за осмотических нагрузок на мембрану.

Основные повреждения клеток, по мнению Мечутан Н. (1966), происходят в результате превышения ими критического максимального объёма из-за разбухания после возвращения в изотонические условия, поэтому подбор оптимального режима оттаивания – важное условие криоконсервации.

Следует отметить, что многофакторность является отличной особенностью действия низких температур. В исследованиях Наук В. (1982) доказано, что замораживание спермы сельскохозяйственных животных нужно рассматривать как сложный процесс, который складывается из ряда этапов. На каждом этапе действует много взаимосвязанных условий, а результат зависит от вида животного, скорости замораживания и оттаивания и применяемого криопротектора (Корочкина Е.А. 2022).

Анализ литературных данных позволяет сделать вывод что, знание повреждающих факторов, действующих на разных этапах низкотемпературной консервации, даст возможность разработать соответствующую технологию замораживания и применять криозащитные среды, позволяющие по минимуму уменьшить действие этих факторов.

1.2. Криповреждение сперматозоидов животных разных видов

Метод искусственного осеменения сельскохозяйственных животных, а также теоретические исследования в криобиологии спермы животных открыли большие перспективные возможности не только в ускоренном развитии и широком внедрении методов искусственного осеменения, но и в сохранении генетически наиболее ценных и исчезающих пород и видов животных (Халипаев М.Г. 2005, Zāhan M. 2017).

В овцеводстве метод криоконсервации спермы ещё не получил такого же размаха, как в искусственном осеменении крупного рогатого скота.

Это связано с нестабильностью результатов осеменения. Поэтому проблема совершенствования методов криоконсервации спермы баранов и поиск подходов и способов повышения криоустойчивости сперматозоидов остается актуальной (Amidi F. 2016, Asturiano J.F. 2017).

Милованов В.К. (1962), Осташко Ф.И. (1978) доказали, что при подготовке спермы к низкотемпературному замораживанию повреждения в основном бывают связаны с температурным и осмотическим стрессом.

За последние годы в отечественной и зарубежной литературе накопился значительный материал об изменении основных морфологических, структурных и биохимических показателей спермы сельскохозяйственных животных различных видов при охлаждении, замораживании и оттаивании (Милованов В. К. 1962, Осташко Ф. И. 1978, Рошка Н. 2019, Cibotaru E. 2019, 2020, Rotari D. 2019, 2020, Казакова Ю. 2020).

Первое теоретическое объяснение процессов, происходящих при температурном шоке, было высказано Миловановым В.К. и Соколовской И.И. (1959). Однако, остаётся ещё недостаточно изученной природа этого явления, а также причины неодинаковой устойчивости к холодовому удару сперматозоидов животных разных видов (Белоус А.М. 1977, Зверева А.П. 1984, Гуськов А.М. 1989).

Было установлено, что при быстром охлаждении спермы сельскохозяйственных животных от + 37 °С до 0 °С сперматозоиды теряют подвижность и метаболическую активность (Платов Е.М. 1988).

Проведенные фундаментальные исследования Pursel V.G. (1975), Watson P. (1983) доказали, что потеря метаболической активности сопровождается выходом из сперматозоидов в плазму внутриклеточных ферментов, протеинов и перераспределением ионов между клеткой и окружающих их средой. Наблюдается также перелом в области шейки сперматозоида и скручивание жгутика. Значительным изменениям подвергается и акросома (Cibotaru E. et al. 2019, Rotari D. 2020).

Было установлено также, что происходят набухание, отслоение и разрывы акросомы. Степень повреждения в сперматозоидах быков, баранов и хряков неодинакова. Так количество поврежденных после холодового удара акросом в сперматозоидах быков составляет 28 %, баранов 49 % и хряков 78 %.

В исследованиях Корбана Н.В. (1980) установлено, что сперматозоиды хряка очень чувствительны к холодовому удару, особенно после получения спермы, а сперматозоиды птицы наиболее устойчивы к быстрому охлаждению. Для снижения процента поврежденных акросом после температурного шока, сперму хряков необходимо выдерживать при комнатной температуре. В исследованиях при помощи электронного микроскопа были выявлены особенности повреждения различных структур сперматозоидов на этапах разбавления, охлаждения и замораживания. Автор установил, что на этапах разбавления и эквilibрации в сперматозоидах быков, баранов и хряков

наблюдаются лишь незначительные изменения в плазматической мембране и акросоме. После эквilibрации эти изменения увеличиваются, у части сперматозоидов обнаруживается отслоение мембраны и набухание акросомы. Автором также установлено, что замораживание и оттаивание вызывает более сильное отслоение и набухание мембраны, разрывы плазматической и акросомальной мембраны.

По наблюдениям Милованова В.К. и др. (1985), Наук В.А. (1991), Rotari D. (2020) разница между числом подвижных сперматозоидов и числом сперматозоидов с поврежденной акросомой у баранов достигает десятикратной величины, в то время как у быков она не более трехкратной. На этом основании авторы пришли к выводу о том, что повреждение акросомы является основной причиной утраты оплодотворяемости криоконсервированных сперматозоидов барана.

Вопрос о том, какой фактор является главенствующим в механизме повреждения сперматозоидов при охлаждении и замораживании в настоящее время окончательно не выяснен (Деряженцев В.И. 2008, Епишина Т.М. 2009, Rotari D. 2021).

Осташко Ф.И. (1978) в своих исследованиях установил, что механическое повреждение сперматозоидов кристаллами льда, маловероятно из-за небольшого их размера и эластичности мембран.

Исходя из полученных экспериментальных данных при изучении влияния физико-химических факторов, действующих в процессе охлаждения и замораживания на метаболизм и структуру биологических объектов, было сформулировано несколько теорий, объясняющих механизмы повреждения клеток при замораживании.

На первом этапе была предложена механическая теория, которая объясняет гибель клеток при замораживании повреждением их мембран и протоплазмы образующимися кристаллами льда (Luyet B.J. 1940).

Липопротеидная теорию была предложена Jovelock T.E. (1959) связывающую гибель клеток при замораживании с повреждением липопротеидов мембран концентрированными растворами солей.

Сульфгидрильная теория, предложенная Levitt I. (1962) объясняет причину гибели клеток при замораживании денатурацией белков при их дегидратации, что является следствием образования дисульфидных связей при окислении. Предложена теория минимального объема, которая объясняет причину низкотемпературного повреждения клеток тем, что при дегидратации снижается их минимальный объем и происходит денатурация мембран.

По мнению Милованова В.К., Соколовской И.И. (1984), Борончук Г.В., Балан И.В. (2003) при замораживании воды увеличивается концентрация солей в межклеточной жидкости, что ведет к возникновению градиента осмотического давления на клеточной мембране и вызывает выход воды из клетки, что ведёт к обезвоживанию клетки и уменьшение ее объема.

Наук В.А. (1991), Squieres E.L. (2013), Yaro-Ghiuzu et al. (2015), Балан И. и др. (2016) в своих исследованиях установили, что при глубоком охлаждении с повышением концентрации солей разрушительному действию подвергаются мембранные структуры клетки, в особенности липопротеидные комплексы мембран, а нарушение белково-липидного взаимодействия может быть следствием действия гиперконцентрации электролитом.

Под влиянием этого фактора, как установил в своих исследованиях Кононов В.П. (1984), белки претерпевают такие же изменения, как и от обычного воздействия раствора с высокой ионной силой: одни из них могут денатурировать и выпадать в осадок, а растворимость других может повышаться. Кроме того, по данным Прокопцева В.М. и др. (1974) и Наука В.А. и др. (1986), молекулярное взаимодействие концентрированных молекул может приводить к изменению структуры белков.

К числу биологических реакций, углубляющих повреждение мембраны клеток в процессе низкотемпературного воздействия, относятся: перекисное окисление липидов, активация внутриклеточных фосфолипаз и лизосомных гидролаз, элиминация основных фосфолипидов из состава мембран и др. (Платов Е.М., 1986).

Многими исследованиями было установлено, что при низкотемпературном воздействии на сперматозоиды наблюдается определенная последовательность развития криповреждений, таких как: термодинамические, которые проявляются в ослаблении гидрофобных взаимодействий при снижении температуры и фазовых переходов в липидах; физико-химические, которые проявляются в изменении концентрации электролитов, в процессах кристаллизации, повышении осмотического давления и др. и биохимические, которые сопровождаются окислением SH-групп белков, активацией различных фосфолипаз и перекисного окисления липидов (Дарий Г.Е. 1977, 1993). Были выделены два важных интервала температур, которые оказывают различные физико-химические воздействия на клетки, а именно: первый охватывает температуры от 37 °C до 0°C, второй от 0°C до -196 °C и ниже.

Первый интервал температур вызывает повреждение половых клеток через механизм термального шока, так называемого холодового удара

Осташко Ф.И. и др. (1978) в своих исследованиях установили, что низкие температуры вызывают многообразие биохимических влияний на клетку, которые могут быть объяснены какой-либо одной теорией.

При быстром охлаждении спермы от 37 °С до 0 °С наблюдается проявление температурного шока (Милованов В.К. 1962, Осташко Ф.И. 1978, 1988, Watson P. F. 2000). Согласно теории Милованова В.К. и Соколовской И.И. (1959) при холодовом ударе происходят необратимые изменения в сперме, в результате затвердевания метаболически важных фосфолипидных компонентов клетки, в частности плазмалогена.

Осташко Ф.И. и др. (1978, 1988) объясняют последствия температурного шока с точки зрения осмотических явлений в результате протекания метаболических процессов, сперматозоиды имеют более высокую температуру по сравнению с окружающей средой, вследствие чего они могут подвергаться действию гипотонии и биореструктивных изменений клеточных мембран.

Теория, выдвинутая Платовым Е.М. (1973) объясняется тем, что при снижении температуры до 0 °С, внутриклеточная вода в сперматозоидах переходит в более упорядоченное состояние, конформационным изменениям белков и других макромолекул, что способствует морфологическим изменениям в фибриллах и других клеточных структурах.

В сперматозоидах при температурном шоке происходят несколько мембранных механизмов, включающие фазовые переходы липидов и их разделение в плоскости бислойа. В основу этой теории авторы выделяют четыре этапа, а именно: первый – фазовые переходы из жидкокристаллического состояния в гелеобразное; второй – образование кластеров; третий – латеральное разделение; четвертый – обратимые или необратимые изменения в белках (Наук В.А. 1982, Wolf D.E. 1990, Holt W.V., North R.D. 1994).

В процессе охлаждения происходит два типа изменений в поверхностной воде: взаимосвязанные процессы, захватывающие большое количество молекул воды и процессы, сопровождающиеся изменением ее структуры.

Платов Е.М. (1986) установил, что фазовые переходы вицеллярной воды также являются одним из факторов температурного шока сперматозоидов.

На втором этапе замораживания сперматозоидов от 0 °С до -196 °С повреждающим фактором является внутри – и внеклеточная кристаллизация воды и осмотические эффекты (Белоус И.М. 1987).

Смирнов И.В., Емец А.З. (1972) высказали предположение, что возможно одновременное протекание кристаллизации и витрификации воды, а, по мнению Белоус

И.М., Гордиенко И.А., Розанов Л.Ф. (1987) витрификация при замораживании не наблюдается.

В своих исследованиях Милованов В.К., Соколовская И.И. (1984) установили, что в процессе вымерзания воды увеличивается концентрация солей в межклеточной жидкости, что ведет к возникновению градиента осмотического давления на клеточной мембране, вызывая выход воды из клетки, в результате чего наблюдается дегидратация клетки и уменьшение ее объема.

Holt W.V., North R.D. (1994) установили определенные видовые особенности структурного повреждения сперматозоидов и больше всего морфологическим изменениям подвергаются сперматозоиды баранов и хряков.

Белоус А.М. (1987), Varo-Ghiuru F. (2015) выдвинули идею, что при низкотемпературном воздействии на клетки наблюдается определенная последовательность развития криповреждений: термодинамические – выражаются в ослаблении гидрофобных взаимодействий при снижении температуры и фазовых переходах в липидах; физико-химические – выражаются в изменении концентрации электролитов, в процессах кристаллизации, повышении осмотического давления и т.д.; биохимические – окислением SH-групп белков, активацией различных фосфолипаз и перекисного окисления липидов. Из этого следует вывод, что наиболее уязвимыми структурами при криоконсервации сперматозоидов, являются их мембраны.

Абилов А.И. и др. (2011) установили, что повреждение акросомы является основной причиной снижения оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы баранов.

Повреждение сперматозоидов барана зависит от состава криоконсервирующей среды (Желтобрюх Н.А. 1989, Holt W.V., North R.D. 1994). Это свидетельствует о том, что сперматозоиды баранов и хряков, и особенно их мембранные структуры, более подвержены криогенным повреждениям по сравнению со сперматозоидами быка.

Thomson J.G., Cummins J.M. (1988) установили, что морфологические изменения акросомы происходят на всех этапах технологической обработки спермы баранов.

Замораживание спермы барана в сахарозном разбавителе приводит к набуханию мембран в области головки и жгутика, а наиболее лабильными структурами были акросома и плазматическая мембрана клетки (Данов Д.И. 1983).

В отличие от ядра, по мнению авторов, плазматическая мембрана и акросома сперматозоидов представляет собой липопротеидные и гликолипипротеидные

образования, содержащие много воды и поэтому они оказываются наиболее лабильными структурами и в первую очередь подвергаются криогенным изменениям.

По мнению Корбана Н.В. (1988) степень повреждения отдельных структур сперматозоидов зависит от применяемых режимов замораживания и оттаивания спермы и, что они должны быть оптимальны и учитывать видовые особенности сперматозоидов.

При исследовании биохимических изменений в процессе замораживания спермы животных большое внимание уделялось изучению сохранности ДНК (Кононов В.П., Соколовская И.И. 1968). В исследованиях Наук В.А. (1970, 1991) установил высокую криостабильность ДНК в сперматозоидах различных видов животных. По мнению авторов, криоустойчивость ядерного материала сперматозоидов обусловлена высоким содержанием в хроматине ядерных белков, образующих в соединении с ДНК губчатую сеть, препятствующую криоповреждениям.

В исследованиях Наук В.А. (1982) было установлено, что в семени баранов криогенным изменениям подвергаются аминокислоты, входящие в состав липопротеидов, при этом самые большие изменения происходят в содержании оксиаминокислот, моноаминомонокарбоновых и моноаминодикарбоновых кислот.

Исследования, проведенные Осташко Ф.И. и др. (1984) при изучении влияния охлаждения на сперму быков и баранов показали, что при этом происходит нарушение активного транспорта ионов. В исследованиях Наука В.А. (1991) было доказано, что нарушение транспортной функции и проницаемости мембран сперматозоидов проявляется не только в отношении ионов, но и молекул. Автор указывает, что после холодового шока и замораживания-оттаивания сперматозоидов, наряду со снижением подвижности, происходит резкое снижение содержания липидов, фосфолипидов и их фракций в половых клетках и увеличение в семенной плазме в среднем на 11 - 60%.

В своих исследованиях Милованов В.К. и др. (1981) доказали, что при охлаждении сперматозоиды баранов и быков теряют аминокислоты, входящие в состав протоплазматических белков и менее устойчивы к действию замораживания сперматозоиды баранов, которые теряют их вдвое больше, чем сперматозоиды быков (20% против 11%). Наук В.А. (1991) в своих исследованиях установил, что охлажденная сперма быка, разбавленная в лактозо-глицериновой среде, не вызывает существенного изменения общего содержания аминокислот, однако после замораживания-оттаивания наблюдается снижение на 11% общего количества аминокислот.

Однако, охлаждение и замораживание спермы баранов способствует уменьшению аминокислот на 15% и 20% соответственно. Снижение содержания аминокислот

наблюдалось и при замораживании-оттаивании сперматозоидов хряка. Эти потери автор объясняет не только нарушением проницаемости мембран сперматозоидов, но и нарушением в липопротеидных комплексах, а биохимические исследования показали, что низкие температуры ускоряют распад липопротеидного покрова сперматозоидов. Разрушение мембран сперматозоидов сопровождается утечкой основных компонентов мембран липидов и белков. Это явление после охлаждения и замораживания-оттаивания спермы наблюдали Антонюк В.П. (1982), Наук В.А. (1986).

Было показано, что потеря общих липидов из сперматозоидов быка несколько больше чем из спермы хряка и барана, однако у баранов теряются специфические фосфолипиды.

Различия в локализации липидов внутри клеток свидетельствуют о повреждениях в сперматозоидах быков, хряков и баранов разных структур.

Сперматозоиды хряков теряют фосфатидилэтаноламин, сперматозоиды баранов – фосфорилглицериды.

По данным Антонюка В.С. (1984) в плазме спермы хряка увеличивается содержание специфических фосфолипидов (сфингомиелина и кефалина) и гликолипидов (ганглиозиды), что является результатом деструкции мембран под влиянием более высокой активности гидролитических ферментов. Сперматозоиды хряка теряют также большее количество холестерина в сравнении со спермой быков.

Наук В.А. (1991), Ерохин А.С. (2017) установили, что нарушение проницаемости мембран, при криогенных повреждениях, приводит к утечке из сперматозоидов ряда ферментов и увеличению их активности в семенной плазме.

Доказано, что ферменты занимают важное место, как самого крупного и наиболее высокоспециализированного класса белковых молекул. Они участвуют в процессах гликолиза и дыхания, которые обеспечивают половые клетки энергией для жизнедеятельности и движения, катализируют тысячи химических реакций, из которых складывается клеточный обмен и, в конечном счете, реализуется генетическая информация, закодированная в молекуле ДНК.

Успенский А.Н. (1991) в своих исследованиях установил, что особенно чувствительны к различным технологическим процессам со спермой акросомальные ферменты и наибольшим изменениям подвержена активность гиалуронидазы, аспаратаминотрансминазы, сукцинатдегидрогеназы, акрозина, кислой и щелочной фосфатаз.

Антонюк В.С. (1984) доказал, что выход ферментов из половых клеток служит причиной потери оплодотворяющей способности сперматозоидов, даже при сохранении их подвижности. А также установлены значительные видовые различия в изменении активности акросомальных ферментов в процессе замораживания спермы. Изменениям подвержены: активность гиалуронидазы, акрозина, кислой и щелочной фосфатазы в сперме хряков и баранов.

Криоконсервация спермы вызывает изменение активности ферментов гликолиза, а именно, уменьшение активности, гексокиназы, глюкозофосфатизомеразы, альдолазы и цитохромоксидазы в сперме хряков, быков и баранов в результате выхода этих ферментов в плазму (Семаков В.Г. 1991).

Свободнорадикальный характер пероксидного окисления липидов приводит к снижению содержания фосфолипидов и ненасыщенных жирных кислот в мембранах сперматозоидов. Наиболее интенсивно происходят эти процессы в сперме хряков и баранов, а сперма быков практически не подвержена пероксидации липидов (Гуськов А.М., Дарий Г.Е., Пузына Г.И. 1993, Нарижный А.Г. 2002, 2005).

При окислении ненасыщенных жирных кислот в клетках возникают продукты свободнорадикального окисления, а, как известно, свободнорадикальное окисление происходит во всех тканях живых организмов, которое является одним из типов обычных метаболических процессов. Низкая концентрация образующихся гидроперекисей нужна для метаболизма, а усиление свободнорадикальных процессов приводит к патологии (Журавлев А.И, Пантюшенко В.Т. 1989). Поэтому, в литературе большое внимание уделяется вопросу свободнорадикального окисления и биологической значимости перекисного окисления липидов мембран.

Накопление продуктов пероксидного окисления липидов в мембранах как установила Храпова Н.Г. (1998) меняет структуру мембран, их проницаемость, устойчивость липид-белковых комплексов и в результате происходит нарушение функциональной деятельности мембранных структур клетки.

Многими авторами установлено, что при замораживании спермы баранов, быков и хряков наблюдается накопление токсичных продуктов перекисного окисления липидов (Науков В.А., Гуськов А.М. 1983) и изменение активности антиоксидантных ферментов (Ерохин А.С. 2004), что приводит к нарушению белково-липидных комплексов мембран (Науков В.А. 1991) и гомеостаза клеток.

Анализ литературных данных позволяет нам сделать вывод, что под действием глубокого замораживания спермы нарушается ряд морфологических, биохимических и

биофизических изменений, ведущих к снижению биологической полноценности сперматозоидов и их оплодотворяющей способности. Устойчивость сперматозоидов различных видов животных к замораживанию обуславливается особенностями химического состава плазмы, молекулярной организации мембран сперматозоидов, ферментного набора и метаболизма. Поэтому, при разработке синтетических сред и технологии замораживания спермы все это необходимо учитывать.

1.3. Хранение спермы в глубокозамороженном состоянии

Разработка методов низкотемпературного замораживания биологических объектов невозможна без глубокого познания причин повреждения и устойчивости клеток при замораживании. Литература по этому вопросу обширна.

Эффективность низкотемпературного замораживания спермы в значительной степени зависит от состава используемых синтетических сред. Они должны содержать неэлектролиты, электролиты, фосфолипиды, антиоксиданты, криопротекторы, биологически активные вещества и другие, которые призваны обеспечить биологическую полноценность сперматозоидов в процессе их технологической обработки. (Наук В.А. 1991, Zāhan M. 2017, Рошка Н. 2019, Казакова Ю. 2020, Силукова, Ю.Л. 2020).

В исследованиях установлено, что криозащитное действие желтка куриного яйца на сперматозоиды обусловлено его разупорядочивающим действием на липиды их плазматических мембран (Кононов В.П. 1984, Айбазов М.М. 2021).

Исследованиями Платова Е.М. (1986) и Осташко Ф.И. и др. (1988) установлено, что солевые компоненты защищают сперматозоиды в интервале температур до 0 °С, а сахара и глицерин при температуре ниже 0 °С.

Проведены и другие исследования по замене желтка в составе замораживающих сред на другие липидные компоненты (Милованов В.К. 1962, Ерохин А.С. 2008, Айбазов М.М. 2021).

При испытании криозащитного действия на сперматозоиды барана липопротеинов, полученных из бобов сои, гомогената плодов облепихи, икры минтая и лосося Семенова В.А. (1987) установила, что исследованные препараты обладают более слабым защитным действием, чем желток куриного яйца.

Ерохин А.С. (1991, 1994) при изучении криозащитного действия сухого желтка и яичного порошка при замораживании спермы баранов установил их высокое криозащитное влияние.

Обнаружено также криозащитное действие на сперматозоиды различных белков, таких как: альбумин, казеин, белки желтка и др. (Наука В.А. 1982, Платова Е.М. 1986, Семёнова В.А. 1987).

Harrison R. A. (1984) установил, что механизм защитного действия белков на сперматозоиды заключается в способности связывать токсичные для клеток ионы металлов.

Проведенные исследования по изучению добавления сыворотки крови в состав среды для спермы баранов Желтобрюх Н.А. и др. (1981) получили повышение результативности осеменения овец замороженной спермой.

В проведенных исследованиях Наука В.А. (1991), Soacke R.G. et al. (1986) установлено, что в период технологической обработки перед замораживанием большое значение имеет введение в состав синтетических сред для замораживания спермы баранов некоторых электролитов – трис – (оксиметил) – аминотан и двунатриевой соли этилен диамин – тетрауксусной кислоты. Милованов В.К., Соколовская И.И. (1959) объясняют их положительное действие способностью стабилизировать pH в сперме при её охлаждении и замораживании. Кроме того, они способны оказывать антиокислительное влияние на сперматозоиды животных (Ерохин А.С. 1994, Ротарь С. и др. 2021).

Белоус И. М. (1987) объясняет механизм защитного действия электролитов не только способностью создавать буферные свойства среды, но и способностью понижать точку замерзания водных растворов. Сахара, как неэлектролиты, снижают электропроводность семени, что способствуют уменьшению агглютинации сперматозоидов, выполняя роль антиоксидантов, инактивируют спермолизины и повышают вязкость среды. Также они обладают способностью структурировать воду и препятствуют чрезмерной гидратации белков и органелл (Наука В.А. 1991, Allai L. 2018).

Многие авторы предлагают вводить в состав сред для замораживания спермы баранов, различные сахара. Шайдуллин И.Н., Варнавская В.А. (1982), Ротари Д. (2020) получили лучшие результаты при применении сахарозы или лактозы, а также комплекса сахарозы с лактозой.

Ерохин А.С. (1994) использовал для замораживания спермы баранов среду ГЖУК-трис - буферную среду (глицерин – желточно – углеводно – комплексонатно – трис – буферная среда) с применением декстрина и получил высокие результаты по оплодотворяемости овец. Автор объясняет положительное действие декстрина при криоконсервации его способностью повышать вязкость раствора, что может затруднять взаимодействие ионов многовалентных металлов с субстратом окисления в

плазматических мембранах сперматозоидов и тем самым ингибировать свободнорадикальное окисление липидов.

Епишина Т.М. (2009) установила, что определенным криозащитным действием на сперму барана обладают полисахариды: инулин, гликоген, декстран, крахмал, гуммиарабик и декстрин.

Платов Е.М. (1986) получил более высокие результаты оплодотворяемости овец при криоконсервации спермы баранов в комплексной среде из электролитов и не электролитов. При использовании разработанной среды – лактозо – желточно – гуммиарабико -трис – цитратной для замораживания спермы баранов обьягнилось 50% маток. Автор предположительно обьясняет криозащитное действие полисахарида гуммиарабика, его способностью снижать эвтектическую точку солей и благоприятствовать витрификации воды, расположенной непосредственно вокруг сперматозоидов.

Открытие защитного действия глицерина имело важное значение для криоконсервации спермы сельскохозяйственных животных. Автор использовал глицерин для разработки способа замораживания спермы быков – производителей (Наука В.А. 1982) и установил, что время эквilibрации спермы животных с глицерином можно сократить до нескольких минут. Позднее при минус 75 °С. автор рекомендовал выдерживать сперму в среде с глицерином в течение 18-24 часов (Bailey R. 2017).

По мнению Осташко Ф.И. (1978), Наука В.А. (1982) механизм защитного действия глицерина в основном сводится к следующему: он проникает внутрь клетки и играет роль противосолевого буфера, позволяет вызывать переохлаждение системы путём связывания части свободной воды, что способствует протеканию витрификации, ионных процессов, укрепляет мембраны клеток, предохраняя их от повреждающего действия воды перераспределения ее по обе стороны мембраны. Кроме того, по мнению авторов, глицерин, проникая в клетку, замещает часть свободной воды и вытесняет электролиты, снижая их внутриклеточную концентрацию до степени, не оказывающей вреда при замораживании.

Платов Е.М. (1986) установил, что при добавлении глицерина в состав разбавителя происходит понижение точки замерзания раствора. При замораживании спермы барана глицерин применяют в концентрации 4-6%.

Глицерин длительно применяется в составе синтетических сред, однако конкретный механизм его положительного действия на сперматозоиды животных окончательно не выяснен (Наука В.А. 1982).

По мнению ряда авторов, глицерин может оказывать и отрицательные действия на биологическую полноценность сперматозоидов. Он способствует разрушению акросом у сперматозоидов баранов из-за его высокой растворяющей способности, повреждаются цитоплазматические мембраны, вследствие растворения входящих в них компонентов, в частности липидов, что ведет к потере многих жизненно важных соединений клетки, или подавляет дыхательную активность сперматозоидов (Осташко Ф.И. 1978).

Проводились опыты по изучению возможности замораживания спермы животных без глицерина, однако оплодотворяющая способность такого семени на 50-60% ниже, чем при применении глицерина. Также было проверено защитное влияние других криопротекторов: диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля, поливинилпирролидона, полиэтилен - оксидов, пропиленгликоля, полиакриламида, этиленгликоля и др. (Наука В.А. 1991, Епишина Т.М. 1996, 1998, Ерохин А.С., Епишина Т.М., Чернова И.Е. 1997). Однако, преимущество данных криопротекторов по сравнению с глицерином, не было обнаружено.

Интересное сообщение приводит Епишина Т.М. (1996) о том, что высокими криозащитными свойствами на клетки животных обладают некоторые эфиры глицерина, такие как монометиловый и моноэтиловый эфиры глицерина. Автор объясняет это тем, что при введении алкильных групп в молекулу глицерина, образуются неполные эфиры глицерина, имеющие свойства как спиртов, так и эфиров, так как изменяется липофильно-гидрофильный баланс молекулы и с увеличением алкильного радикала гидрофобность полученных производных глицерина растёт.

Исследования по применению эфиров глицерина при замораживании спермы человека показали, что моноэтиловый эфир оказал слабое защитное влияние, а моноэтиловый оказал сходное с глицерином действие при концентрации в два раза больше, чем у моноэтилового эфира (Паращук Ю.С. и др. 1989).

В состав спермы производителей сельскохозяйственных животных входят собственные антиоксиданты, предохраняющие сперматозоиды от перекисного окисления липидов, такие как фосфолипиды, токоферолы, убихинон, коэнзим Q, глутатион, цистеин, витамин Е и др. (Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И. 2004, Varo-Ghiuru 2015).

Были получены положительные результаты при использовании в состав синтетических сред для замораживания спермы баранов различных жирорастворимых антиоксидантов: витамина Е (Милованов В.К. и др. 1989), ди-трет-бутил-крезола и бутилситолуола (Шайдулин И.Н. 1980), эхинохрома (Милованов В.К. и др. 1970).

Jones R. (1973, 1976), Казакова Ю. и др. (2020) сообщают, что процесс криоконсервации сперматозоидов, в результате пероксидного окисления оказывает токсическое влияние на сперматозоиды путем повреждения плазматических мембран и воздействия на энергетику сперматозоидов.

Милованов В.К. и др. (1989) предложили для ингибирования перекисного окисления липидов спермы баранов замораживать её в атмосфере нейтральных газов, однако широкого применения данный метод замораживания не нашел в связи с его трудоемкостью. Было установлено, что при их использовании в составе синтетических сред повышается подвижность сперматозоидов после замораживания – оттаивания и увеличение оплодотворяемости овцематок. Бутилокситолуол и витамин Е повышают устойчивость сперматозоидов к холодовому удару, Шайдулин И.Н. (1980), Holt W.V. (1994) полагают что этот защитный эффект связан с их влиянием на состояние микровязкости плазматической мембраны сперматозоидов.

Используя в составе синтетических сред для замораживания спермы баранов ди-трет-бутил-крезола Милованов В.К. и др. (1989) установили, что после осеменения овец данной средой объегнилось на 14% маток больше. Авторы предполагают, что защитное действие ди-трет-бутил-крезола связано с его мембранотропным действием.

Гуськов А.М. и др. (1993) сообщили о положительном влиянии водорастворимых антиоксидантов при замораживании спермы баранов.

Ерохин А.С (1996) испытал криозащитное действие на сперматозоидах баранов новых синтетических водорастворимых антиоксидантов, таких как: анфен - натрия и феноксан. Было установлено, что они оказывают положительное влияние на подвижность и живучесть заморожено - оттаянных сперматозоидов.

Варнавский А.Н., Варнавская В.А. (1989) предложили в качестве антиоксидантов при замораживании спермы баранов использовать гомогенат морковного сока и получили такие же результаты ягнения маток, как и при использовании бутилокситолуола.

Изучая криозащитное действие различных каротиноидов на сперму баранов, таких как фукоксантина, β - каротина и каратиноидов из шафрана Милованов В.К., Парамонов Л. И., Лизунков А.Ф. (1988) установили, что при осеменении овец спермой, замороженной с данными веществами, соответственно объегнилось 58, 54 и 51% против 39% в контроле. Авторы также установили, что каратиноиды могут абсорбироваться на клеточной мембране.

В работах болгарских исследователей (Маринов П.И., Грудова Ц. Н., Семков М.М. 1983) приводятся данные, что каротин не оказал заметного криозащитного влияния на

сперму баранов, а в некоторых случаях даже снижал подвижность и живучесть оттаянных сперматозоидов. Авторы установили, что бутилгидроксисулфид и токоферол не предохраняли холестериновый комплекс сперматозоидов барана, при замораживании и приводили к снижению живучести сперматозоидов в оттаянном состоянии.

Дарий Г.Е. (1993) и др. в своих исследованиях установили, что при криоконсервации семени животных в сперматозоидах может происходить окисление сульфгидридных групп (SH-групп) белков, что приводит к повреждению мембранных белков, инаktivации ряда ферментов и нарушению энергетических процессов в сперматозоидах. Использование в состав синтетических сред тиоловых соединений, таких как глутатион, унитиол и цистеин снижало окисление SH-групп и повышало биологическую полноценность оттаянных сперматозоидов быков и баранов (Ерохин А.С., Епишина Т.М., Чернова И.Е. 1997).

Экспериментально установлено, что тиоловые соединения увеличивают выживаемость заморожено-оттаянных сперматозоидов, снижают количество поврежденных макросом, стабилизируют содержание SH-групп и активность ЛДГ – лактатдегидрогеназы (Корбан Н.В. 1983).

Епишина Т.М. (1996), Ерохин А.С., Епишина Т.М. (1997) установили значение ряда металлов в процессе метаболизма половых клеток и повышения их криоустойчивости. Ионы калия, кальция, магния, железа, меди, молибдена и цинка входят в состав ферментов, катализирующих таких реакций, как перенос химически активных групп, окислительно-восстановительные, гидролитические процессы. Тяжёлые металлы - кальций, цинк и медь необходимы для жизнедеятельности сперматозоидов и играют важную роль в воспроизведении.

В заключение следует отметить, что несмотря на большое число исследований, проведенных по поиску эффективных методов защиты сперматозоидов при замораживании и оттаивании, результаты этих опытов весьма противоречивы, что требует дальнейших фундаментальных исследований в данном направлении с целью поиска более эффективных соединений.

1.4. Устойчивость сперматозоидов к влиянию различных факторов

Воспроизводительная функция самцов, как и другие функции организма, находятся во взаимосвязи с факторами внешней среды, которые имеют существенное влияние на количество и качество получаемой спермы от производителей (Антонюк В.С. 1988, Boronciuc Gh. et al. 2020, Rotari I. et al. 2020).

Возможность консервации спермы производителей вне организма появилась после открытия защитного действия желтка куриных яиц от холодового удара сперматозоидов, наблюдаемого при разном охлаждении спермы (Милованов В.К. 1962). Причём было установлено, что защитным действием от холодового удара обладают липопротеиды и фосфолипиды желтка куриных яиц.

Криозащитное действие желтка куриных яиц на сперматозоиды животных Ерохин А.С. и др. (1989) объясняют его разупорядочивающим действием на липиды плазматической мембраны сперматозоидов.

Немецкие ученые Wabeski D. et al (1989) установили, что введение в состав синтетической среды бычьего сывороточного альбумина способствует повышению выживаемости сперматозоидов в результате замедления реакции капацитации.

Upreti G. et. al. (1995) установили, что использование бычьего сывороточного альбумина в составе разбавителя спермы хряков оказывает антиоксидантное влияние и повышает результативность искусственного осеменения свиноматок.

Rewel S. (1990) предложил использовать в качестве заменителя бычьего сывороточного альбумина поливиниловый спирт.

Изучение влияния замораживания на биологическую полноценность сперматозоидов различных видов сельскохозяйственных животных представляет значительный научный и практический интерес в связи с совершенствованием методов консервации спермы.

Существует целый ряд приемов снижения повреждающего воздействия глубокого замораживания на биологическую полноценность сперматозоидов. Этому способствует введение в состав синтетической среды для спермы различных криопротекторов (Pegg D.E. 2002).

Важную роль в области замораживания спермы животных сыграло открытие криозащитного действия глицерина на сперматозоиды быков и петухов (Polge C. et al. 1952).

Позднее Wilmut I., Polge C. (1972) установили, что глицерин обладает высоким защитным эффектом и при замораживании спермы хряков.

В опытах по проверке криозащитного действия на сперматозоиды глицерина, эритрита, диметилсульфоксида и ацетамида установлена более высокая эффективность глицерина (Raquignon M. 1985).

Комбинированное использование в составе среды для замораживания спермы глицерина, диметилсульфоксида и диметилацетамида способствовало улучшению биологической полноценности сперматозоидов после оттаивания (Hahn R. et al. 1974).

Замораживание-оттаивание сперматозоидов барана вызывает некоторые нарушения в области шейки в виде просветления составных частей и набухания оболочки, а также разрывов оболочки и дезинтеграции структурных элементов (Скорняков Б.А., Осташко Ф.И. 1975, Visser D., Salamon S. 1974, Багиров В.А. 2017). Все эти изменения наблюдаются относительно реже, чем изменения в области головки. У сперматозоидов барана, которые менее устойчивы к замораживанию-оттаиванию, эти нарушения встречаются чаще, чем у спермы быков.

Visser D., Salamon S. (1974) установили, что в результате замораживания-оттаивания наблюдаются также отделение головок сперматозоидов от шейки и разломы частей тела.

Healey P. (1964) установил, что при замораживании-оттаивании спермы, хвостовая часть сперматозоида также претерпевает некоторые повреждения, но они значительно меньше, чем нарушения в головке.

При быстром охлаждении сперматозоидов наблюдается набухание и разрыв мембран (Скорняков Б.А., Осташко Ф.И. 1975).

Имеется обширная литература о физико-химическом составе сперматозоидов, которые представлены в монографиях Mann T. (1964) и Шергина Н.П. (1967). Накоплены значительные экспериментальные материалы по влиянию процесса замораживания-оттаивания на сохранение биологической полноценности сперматозоидов сельскохозяйственных животных.

Исследования, проведенные Осташко Ф.И. (1978) и Vossen A.M., Foot R.H. (1967) по влиянию охлаждения на сперму показали, что при этом происходит нарушение активного транспорта ионов.

В исследованиях Ким Е.Д. (1968) установлено, что при быстром охлаждении сперматозоидов быка снижается активность, а также происходит резкое снижение (до 60%) содержания фосфолипидов в сперматозоидах и увеличение их в плазме (на 12%).

В работах Успенского А.Н., Платова Е.М. (1968), Ильинской Т.М., Казанцева Г.М. (1972), Антонюка В.С. (1984), Darrin-Bennet A. et. al (1973) показано снижение содержания липидов, фосфолипидов и их фракций при замораживании-оттаивании сперматозоидов. Замораживание-оттаивание спермы приводит к деструктивным изменениям в мембранных структурах, таких как выход из клеток высокомолекулярных

соединений. Доказано, что после замораживания-оттаивания спермы происходит выход акросомальных ферментов гиалуронидазы и акрозина из сперматозоидов в окружающую среду; снижение активности этих ферментов находится в зависимости от концентрации глицерина в синтетической среде для замораживания. С повышением концентрации глицерина снижается сохранность ферментов в сперматозоидах, однако поэтапное введение способствует лучшей сохранности гиалуронидазы и акрозина (Johnson L.H., Pursel V.G. 1972, Стшежек Е. и др. 1984).

Милованов В.К. и др. (1974) установили, что при охлаждении сперматозоиды барана и быка теряют аминокислоты, входящие в состав протоплазматических белков.

В исследованиях Наук В.А. (1970, 1985) установлено, что охлаждение спермы быка, разбавленной в лактозо-глицериновой среде, не вызывает существенного изменения общего содержания аминокислот, однако после замораживания и оттаивания наблюдается снижение общего количества аминокислот на 11%, а при замораживании спермы баранов в той же лактозо-глицериновой среде вызывает уменьшение содержания аминокислот на 15-20%. Эти потери автор объясняет не только нарушением проницаемости мембраны клеток, но и нарушениями в липопротеиновых комплексах. Биохимические исследования показали, что низкие температуры ускоряют распад липопротеидного покрова сперматозоидов, тем самым и их жизнеспособность.

В исследованиях Борончука Г.В. (1978) установлено, что замораживание и оттаивание спермы вызывает выход из сперматозоидов в окружающую среду и целого ряда других ферментов: щелочной фосфатазы, каталазы, гексокиназы, трансаминазы и др.

Важным фактором проявления повреждающего действия при замораживании и оттаивании на мембранные структуры сперматозоидов является развитие в них процессов перекисного окисления липидов (Тарусов В.Д. 1962, Журавлев А.П. 1968, Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. 1974) и отмечают, что в норме свободнорадикальное окисление протекает во всех тканях живых организмов и при низкой интенсивности является одним из типов нормальных обменных процессов. В то же время при действии на клетки ряда повреждающих факторов, в том числе и низких температур, процессы перекисного окисления резко усиливаются, что приводит к нарушению функционирования мембранных структур сперматозоидов.

Сообщения об образовании токсических продуктов в сперме баранов, быков и хряков (в результате развития процессов перекисного окисления липидов) при охлаждении, замораживании и оттаивании спермы были сделаны Jones R., Mann T. (1973), Наук В.А. (1985) и Гуськовым А.М. (1993).

Таким образом, при охлаждении, замораживании и оттаивании сперматозоидов происходит ряд ответных реакций физического, физико-химического и биохимического характера, которые приводят к повреждению мембранных структур сперматозоидов и нарушению их основных биологических функций – подвижности и оплодотворяющей способности.

Луговой В.И., Ханина Л.А. (1997) обобщили материал криозащитных свойств большого числа веществ из различных классов химических соединений и пришли к выводу, что из более чем 200 испытанных веществ эффективными криозащитными свойствами на клетках обладали только 10-12 соединений. При этом оказалось, что активные криопротекторы сосредоточены в основном лишь в нескольких классах органических веществ – полиолах, амидах, оксидах. Общую группу в пределах указанных классов веществ составляли полимерные и олигомерные соединения, непроникающие в клетки.

Признание факта существования проникающих (эндоцеллюлярных) и непроникающих в клетку (экзоцеллюлярных) криопротекторов позволили в общих чертах классифицировать криозащитные средства с точки зрения механизма их взаимодействия с клеткой, а установление принадлежности этих веществ к конкретному кругу химических соединений дало возможность также определить направление поиска новых криопротекторов.

Грищенко В.И., Лучко Н.А. (1997) на основании полученных фундаментальных данных разработали методы криоконсервирования и гипотермического хранения репродуктивных клеток, позволяющие организовать их криобанки для клинических и экспериментальных целей.

В результате исследования действия сверхнизких скоростей охлаждения, а также химических факторов криозащиты на спермии и эмбрион Грищенко В.И. и др. (1993) установили закономерности влияния указанных факторов на сохранность этих клеток при переводе их в состояние глубокого холодового анабиоза.

Следовательно, в вопросах оптимальной скорости снижения температуры спермы при ее криоконсервации и оттаивании и целесообразности применения в том или ином случае медленного или быстрого режима замораживания имеется еще много неясного. В связи с этим представляет большой интерес важное теоретическое и практическое значение проведения исследований по изучению биологических особенностей спермы баранов–производителей при ее криоконсервации, хранении и использовании в условиях хозяйств Республики Молдовы.

В настоящее время для ускоренного преобразования местных пород овец в направлении улучшения племенных, воспроизводительных и продуктивных качеств животных, пригодности их к интенсивным технологиям производства широко используют мировой генофонд зарубежных пород.

В Республике Молдова за последние годы в овцеводстве апробированы и допущены к использованию молдавский тип Цигайской породы и молдавский тип Каракульской породы и другие селекционные достижения (Люцканов П.И. 2009).

1.5. Выводы по первой главе

Таким образом, проведённый обзор и анализ научной литературы по теме диссертации позволяют сформулировать следующие основные вопросы нашей работы.

1. В результате многолетней целенаправленной селекционно-племенной работы выведены два типа овец Цигайской и Каракульской породы овец, которые объединяют генофонд лучших мировых пород.

2. В связи с выводением новых типов пород овец стало актуальным его всестороннее изучение. В частности, имеет важное теоретическое и практическое изучение биологических качеств спермы баранов-производителей и пригодность ее к технологии криоконсервации, хранении и использовании в хозяйствах Республики Молдова.

3. Обзор литературы показал, что в принципе технология криоконсервации спермы баранов решена, однако для широкого практического применения пока еще не пригодна, следовательно, необходимо продолжить научные исследования по совершенствованию технологии низкотемпературного замораживания спермы баранов-производителей местных типов, пород.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ BioR, ZooBioR-1 и ZooBioR-2 НА КРИОКОНСЕРВАЦИЮ СПЕРМЫ БАРАНА

Экспериментальные исследования были проведены в период с 2016 по 2022 годы на базе Научно - Практического Института Биотехнологий в Зоотехнии и Ветеринарной Медицине, лаборатории Биотехнологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов и Института микробиологии и биотехнологии, на Экспериментально - технологической станции «Максимовка».

2.1. Материал, объекты и схема исследования показателей спермопродукции баранов-производителей

Материалом и объектами исследования были препараты природного происхождения на основе экстрактов из биомассы спироулины: BioR, ZooBioR-1 и ZooBioR-2, бараны – производители в возрасте от 2 до 4 лет класса элита Цигайской породы молдавского типа шерстно – мясо – молочного направления продуктивности (Патент на изобретение № 3440), разводимые на экспериментально - технологической станции «Максимовка» с. Максимовка, Ново-Аненского района.

Молдавский тип цигайских овец характеризуется высокими показателями по живой массе, настригу шерсти и длине по сравнению с овцами местной популяции. Бараны-производители имеют живую массу 82,05 кг, настриг шерсти в физическом весе в пределах 7,78 кг. Животные нового типа удачно сочетают высокую шерстную продуктивность с молочной, которая составляет 126,3 кг за 180 дней лактации (Люцканов П. и др. 2019). Условия кормления, ухода и содержания баранов в течение всего периода проведения экспериментальных исследований были одинаковыми и соответствовали зоотехническим нормам. При постановке опытов, баранов подвергали тщательному клиническому обследованию, отбирали пробы крови и сперму.

На протяжении всего опытного периода, баранов содержали и использовали, строго соблюдая распорядок дня. Сперму получали от каждого барана два раза в неделю, вырабатывая у баранов-производителей условный половой рефлекс на искусственную вагину.

Эякулят получали в манеже пункта искусственного осеменения, используя искусственную вагину фирмы IMV, Франция. Проводили оценку спермограммы баранов-производителей согласно схеме опыта №1.

Оценивали сперму баранов-производителей по: объему эякулята, подвижности сперматозоидов, концентрации сперматозоидов в эякуляте, проценту сперматозоидов с прямолинейно - поступательным движением, скорости движения (VAP, VSL, VCL), морфологическими аномалиями и целостности акросомы, а также пригодность эякулята к замораживанию.

Изучали влияние биологически активных препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на количественные и качественные показатели спермы баранов в неслучной сезон. ZooBioR-1 — комплексный природный препарат, состоящий из комбинации экстрактов биологически активных соединений, полученных из цианобактерии *Arthrospira platensis* (спирулины). Препарат содержит свободные аминокислоты и олигопептиды (4,5-10%), белки (45-50%), полисахариды, в том числе сульфатированные (15-20%), цинк (2,5-5мг). ZooBioR-2 – натуральный комплексный препарат, состоящий из комбинации экстрактов биологически активных соединений, полученных из цианобактерии *Arthrospira platensis* (спирулины). Препарат содержит свободные аминокислоты и олигопептиды (4,5-10%), белки (45-50%), полисахариды, в том числе сульфатированные (15-20%), фосфолипиды (до 0,25%), селен (25-50 мкг), согласно схеме опыта № 2.



Рис. 2.1. Схема опыта №1. Показатели спермопродукции баранов-производителей

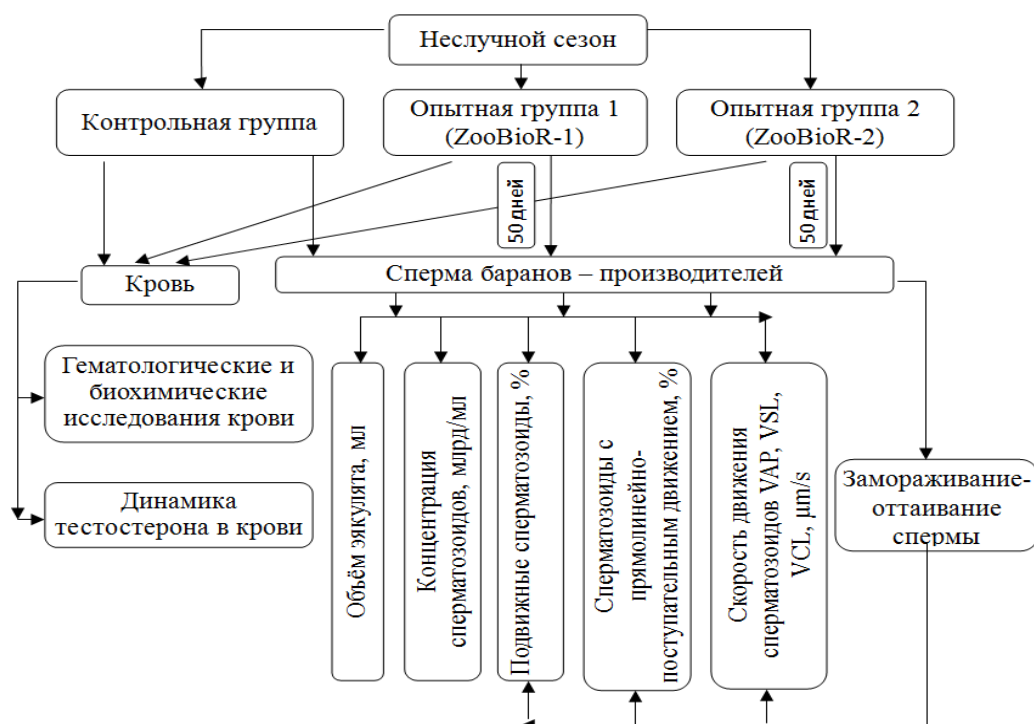


Рис. 2.2. Схема опыта № 2. Влияние препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на коррекцию сперматогенеза баранов-производителей в неслучной сезон

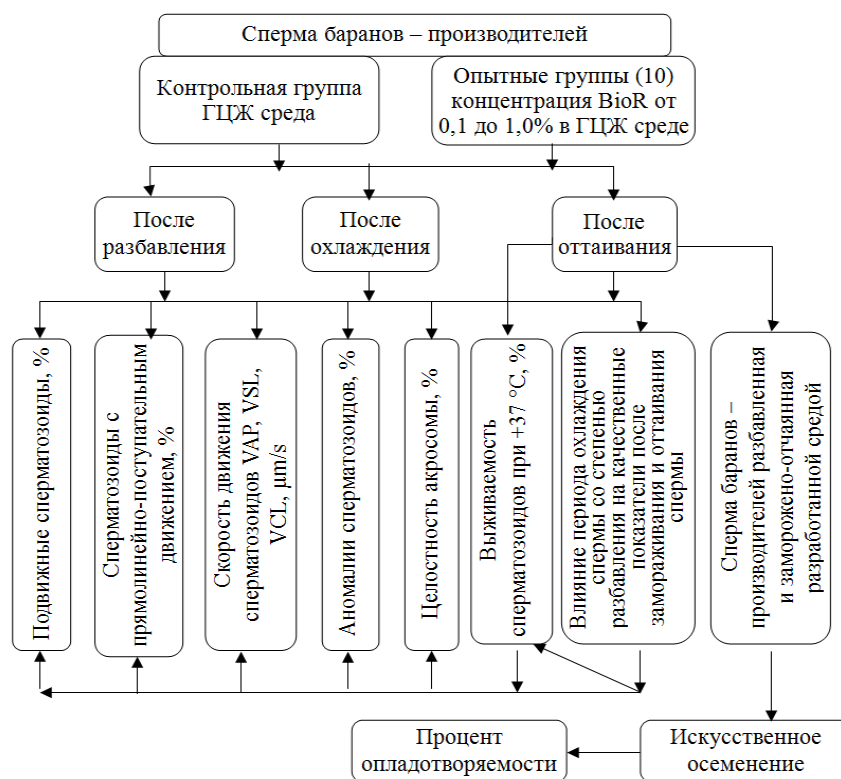


Рис. 2.3. Схема опыта № 3. Влияние препарата BioR на криорезистентность сперматозоидов при замораживании

С целью усовершенствования синтетической среды для замораживания спермы изучали мембранотропный препарат BioR, разработанный в Институте микробиологии и биотехнологии Технического университета согласно схеме № 3.

Краткая характеристика препарата BioR. Раствор 0,5%, светло - желтая, прозрачная жидкость с характерным запахом. Комплексный биологический препарат, полученный из биомассы цианобактерии *Spirulina platensis*. Содержит незаменимые и заменимые аминокислоты, в том числе иммуноактивные аминокислоты (валин, триптофан, треонин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аланин, аргинин, цистеин, глицин, серин, гамма-аминомасляная кислота), сульфатированные полисахариды, полиненасыщенные жирные кислоты, в т.ч. гамма-линоленовая кислота, основные макро- и микроэлементы.

Благодаря такому уникальному составу BioR обладает следующими свойствами: антиоксидантные, цитопротекторные, регенеративные, иммуномодулирующие. BioR способствует стабилизации клеточных и лизосомальных мембран, нормализации и поддержанию на оптимальном уровне баланс между системами перекисного окисления липидов и антиоксидантными системами, повышению антиоксидантного потенциала ферментативных и неферментативных цепей: повышает уровень ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатиона, восстанавливает содержание восстановленного глутатиона, токоферола и др.

В несколько раз снижает вирусную нагрузку в пораженных клетках и тканях. Механизм действия определяется способностью BioR блокировать процесс репликации вируса за счет ингибирования синтеза вирусных нуклеиновых кислот. С другой стороны, BioR активирует противовирусную иммунную защиту организма, индуцируя синтез эндогенных интерферонов первой линии: альфа- и бета-интерферона, и гамма-интерферона.

Биопрепарат BioR был получен в условиях лаборатории научных исследований фитобиотехнологии Института микробиологии и биотехнологии Технического университета Молдовы в соответствии с патентом на изобретение № 545, используя в качестве первичного сырья штаммы микроводорослей *Spirulina platensis*, патент на изобретение № 169 (Rudic V. 1995).

2.2. Методы исследования показателей спермопродукции баранов-производителей

Для изучения качественных показателей спермопродукции баранов-производителей, в зависимости от использования биологически активных препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2, исследования проводили в течение мая до июля, то есть в период, который не считается сезоном размножения овец для данного региона.

Для эксперимента сформировали 3 группы – одна контрольная и две опытные, в которые были подобраны взрослые бараны-производители в возрасте от 2-х до 4-х лет.

Баранам-производителям, к основному рациону, добавляли по 5 г/голову ZooBioR-1 и также по 5 г/голову ZooBioR-2 в течение 50 дней.

Использовали сперму, полученную в начале и в конце опыта. Определяли объем эякулята, оценивали подвижность и концентрацию сперматозоидов в эякуляте. Устойчивость спермы к замораживанию изучали путем определения подвижности сперматозоидов после оттаивания.

Для оценки эффективности препарата BioR его добавляли, как дополнительный компонент в состав глюкозо-цитрато-желточную (ГЦЖ) среду следующего состава: 0,8 г глюкозы, 2,8 г цитрата натрия, 20 мл яичного желтка, 7 мл глицерина и препарат BioR в концентрации от 0,1 до 1,0%, осторожно перемешивали, а затем пипеткой наносили небольшую каплю образца на край предметного стекла. Для анализа спермы использовали стёкла фирмы Leja, которые обеспечивают точность, необходимую для надежного анализа спермы, где сперматозоиды распространяются равномерно по всему стеклу.

Для проведения исследования стекло предварительно нагревали на термостойке, который имеет температуру +37 °С. Подвижность сперматозоидов изучали после разбавления, после эквilibрации и после замораживания-оттаивания спермы. Для изучения защитного влияния BioR при глубоком до -196 °С замораживании спермы баранов использовали эякуляты с подвижностью 70 - 90% и концентрацией сперматозоидов не ниже 2 млрд/мл.

Экспериментальный препарат испытывался при его введении в состав основной среды ГЦЖ в разных концентрациях от 0,1 до 1,0%. Для этого одиннадцать пробирок устанавливали в штативе, предварительно их пронумеровав. Вливали разбавитель ГЦЖ + глицерин по пробиркам, начиная с 10 мл, в следующую 9,9 мл, далее 9,8 мл, 9,7 мл до 9,0 мл. В десять из них, кроме первой (контрольной), вливали при помощи пипетки экспериментальный препарат BioR в каждую пробирку до деления 10 мл. После разбавления, сперму в течение 4 часов подвергали эквilibрации при температуре + 2-4°С.

Разбавленное семя замораживали в парах жидкого азота на фторопластовой пластине, для этого опускали пластину в емкость с жидким азотом и охлаждали до тех пор, пока прекратится кипение азота. Охлажденную пластину приподнимали над поверхностью жидкого азота и при помощи пипетки наносили разбавленную сперму объемом по 0,2 мл в каждую лунку. Спустя 2 минуты после нанесения спермы в последнюю лунку, пластинку с гранулами погружали в жидкий азот. После этого замороженные гранулы собирали в марлевые мешочки и их помещали в тубы с небольшими отверстиями и погружали в жидкий азот в сосуд Дюара на хранение. Качество спермы, разбавленной опытной и контрольной средой проверяли на подвижность, используя программу «CEROS».

Режим охлаждения и замораживания разработан путем выдержки разбавленного семени при разных сроках хранения при эквilibрации.

Замороженную сперму оттаивали в водяной бане типа – ТБ, серия – Г. Оттаивание гранул проводили без использования дополнительного разбавителя. Гранулу помещали во флакон из-под пенициллина, предварительно подогретого в водяной бане до температуры +40 - 42 °С. Флакон с гранулами, не вынимая из воды, осторожно вращали круговыми движениями до полного оттаивания гранулы, после чего вынимали из воды и ставили на стол при комнатной температуре 18 - 20 °С. Время оттаивания гранул - 30 – 40 секунд.

Подготовка вагины к работе включала следующие операции: в цилиндр вагины длиной 20 см и диаметром 4,5 см, вставляется камера длиной 38 см и шириной 6 см, а концы заворачиваются на края цилиндра и зажимаются кольцами фиксаторами. В межстенное пространство вагины заливается вода с температурой 50 – 55 °С. Отверстие патрубка закрывается пробкой с краником. Один конец вагины равномерно смазывается стерильным вазелином, на другой надевали удлиненный спермоприёмник с градуированной пробиркой. Через отверстие в кранике в межстенное пространство нагнетается воздух. При этом стенки резиновой камеры должны сомкнуться. Перед получением спермы, температура в искусственной вагине проверяется термометром, обеззараженным спиртовым тампоном. Температура в искусственной вагине перед получением спермы соответствовала +40-42°С. Полученный эякулят отделяли в градуированную пробирку и, закрыв её стерильной пробкой, проводили разборку, промывку и обработку вагины.

Каждый полученный эякулят предварительно оценивали визуально, определяя, нет ли в сперме примесей крови, мочи, непосредственно после его получения от производителя.

Объем эякулята измеряли посредством градуированного спермоприемника.

Концентрацию сперматозоидов определяли, применяя счетную камеру Горяева. Сперму аккуратно перемешав, набирали в меланжер, который предназначен для эритроцитов, до метки «1». Для разбавления спермы и обездвиживания сперматозоидов в меланжер набирали до метки «101» 3%-ный раствор хлористого натрия (разведение спермы в 100 раз), содержимое тщательно перемешивали, зажимали пальцами оба конца наполненного меланжера и тщательно трясли, переворачивая меланжер влево и вправо.

Первые три-четыре капли удаляли из меланжера, конец меланжера аккуратно обтирали марлевой салфеткой и осторожно одну каплю смеси наносили на крайнюю часть притертого покровного стекла к счетной камере. Смесь заполняет камеру Горяева, затекая под притертое покровное стекло. Сперматозоиды считали при таком увеличении микроскопа, чтобы в поле зрения помещалось 16 малых (один большой) квадратов. Подсчитывали сперматозоиды в пяти больших квадратах, расположенных по диагонали. Положение сперматозоидов внутри или вне квадрата определяли по месту нахождения головки. Головки, расположенные на левой и верхней линиях, относили к тому квадрату, в котором проводили подсчет.

Концентрацию сперматозоидов в сперме (С), млрд/мл, вычисляли по формуле

$$C = \frac{n}{200}, \text{ где:} \quad (2.1)$$

n- количество подсчитанных сперматозоидов в 80 маленьких квадратах;

200 - постоянный коэффициент

(ГОСТ 32277-2013 Средства воспроизводства. Сперма. Методы испытаний физических свойств, биологического, биохимического, морфологического анализов), (Айбазов М.М. 2003).

Патологические формы сперматозоидов определяли с отклонениями в строении головки - круглая, несимметричная, укороченная, заостренная, двойная, без мембраны или жгутика; шейки - изогнутая, удвоенная, нитевидная, с цитоплазматической капелькой и хвостика - изогнутый, двойной, извитой, скрученный, рудиментарный. Ход определения: в эякуляте вначале определяли концентрацию сперматозоидов и затем доводили ее до концентрации 0,2-0,4 млрд/мл, добавляя 0,9%-ный раствор хлористого натрия. Приготавливали мазки спермы на сухих предметных стеклах, предварительно обезжиренных. На край предметного стекла наносили каплю исследуемой спермы. Отшлифованным по бокам покровным стеклом делали тонкий мазок, проводя покровное стекло вдоль предметного. Мазок подсушивали в течение 1-2 мин на воздухе и фиксировали 96% этиловым спиртом в течение 1,5-2,0 мин.

Для окрашивания сперматозоидов применяли 0,1% раствор метиленового синего. При этом перед окрашиванием на мазок ставили полоску фильтровальной бумаги, на которую наносили краситель на 1-2 мин. После, бумагу убирали, раствор краски смывали водой и подсушивали мазок на воздухе. Затем рассматривали под микроскопом при увеличении в 600 раз, подсчитывали 200 сперматозоидов (Zāhan M. 2013).

Целостность акросомы определяли методом Хэнкока, который характеризуется высокой степенью точности (Zāhan M. 2013). Для этого, приготавливали мазки спермы на сухих предметных стеклах, предварительно обезжиренных. Смешивали 1:10 сперму с раствором Хэнкока (раствор Хэнкока содержит 2,9 г дигидрата тринатрийцитрата, 4 мл раствора формалина), затем разбавляли с дистиллированной водой до 100 мл и хранили при + 4 °C.

На край предметного стекла наносили каплю исследуемой спермы. Отшлифованным по бокам покровным стеклом делали тонкий мазок, оставив на 5 минут для фиксации. Сперму анализировали под иммерсией, используя фазово-контрастное устройство для микроскопа с увеличением в 600 раз. В каждом препарате было исследовано 200 сперматозоидов.

Микроскопическую оценку качества спермы на разных этапах исследования проводили при помощи специализированной компьютерной программы «CEROS».

Принцип работы программы основан на обработке видеоизображений. В ходе анализа каждый сперматозоид распознается по заданным параметрам, и проводится их оценка. Программа определяет следующие параметры:

- подвижность сперматозоидов (%) при оценке сперматозоидов по подвижности соблюдали определенный температурный режим, который создается с помощью нагревательного столика. Специальное предметное стекло с ячейками заранее ставили на несколько минут на нагревательный столик, чтобы на нём установилась необходимая температура, а затем наносили образец. Результаты исследований отображались на мониторе;

- сперматозоиды с прямолинейно-поступательными движениями (%);

- скорость движения сперматозоидов:

- VAP – средняя скорость движения сперматозоида по усредненной траектории (velocity average path), мкм/с;

- VSL – усредненная по времени скорость движения спермия вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точкой траектории (velocity straight line), мкм/с;

-VCL – расстояние и скорость перемещения по всей траектории (velocity curve line), мкм/с.

Точность оценки качества спермограм проводили путем повторных анализов одних и тех же образцов до получения аналогичных результатов.

Для проверки оплодотворяющей способности спермы барана, сохраняемой в глубокозамороженном состоянии с применением для разбавления предложенной среды, проводили искусственное осеменение овцематок. Выборку маток в охоте проводили при помощи баранов-пробников с подвязанными фартуками. Овец осеменяли двукратно сразу после выявления в охоте и через 8–10 часов повторно.

Для осеменения спермой, замороженной в гранулах, использовали специальное устройство (геликоид) для искусственного осеменения (Патент на изобретение № 4715) (Darie Gr., Vacevschi S. și al. 2020). Устройство имеет общую длину в 230 мм. Оно состоит из канюли, корпуса, наконечника спиралевидной формы, отличающееся тем, что все части устройства изготовлены из нержавеющей стали, который надевается на одноразовый шприц. Наконечник устройства имеет спиралевидную форму, что позволяет ему атравматично и легко раскрывать шейку матки и вводить сперму за вторую складку и далее, что способствует повышению результативности осеменения. Перед началом работы несколько раз промывали 2,9%-им раствором цитрата натрия, для смывания 70-градусного спирта, в котором обеззараживали. Потом в геликоид набирали сперму из флакона из-под пенициллина. Сперму вводили цервикально за вторую складку в объеме 0,2 мл, в которой содержалось 80-100 млн подвижных сперматозоидов. Перед осеменением следующей овцы геликоид протирали тампоном, смоченным 70-градусным спиртом, не допуская попадание его в отверстие канюли. Отыскивание шейки матки осуществляли с помощью стерильного металлического влагалищного зеркала с осветителем. После каждого осеменения мыли влагалищное зеркало горячим содовым раствором (20-30 г на 1 л воды), споласкивали чистой водой и ставили в стерилизатор с кипящей дистиллированной водой, потом вынимали, и ставили на рабочий столик. Он охлаждается, погружая в стеклянный химический стакан с физиологическим раствором хлористого натрия комнатной температуры. После окончания работы шприц-геликоид тщательно мыли горячим содовым раствором, прополаскивали дистиллированной или кипяченной и профильтрованной водой, дезинфицировали внешнюю поверхность, заполняли 70-градусным спиртом и сохраняли к следующему использованию.

Результативность искусственного осеменения овец определяли по результатам ягнения овец.

Гематологический и биохимический состав проб крови изучали для более точного определения состояния организма подопытных животных (Кононский А.И. 1992).

Кровь для гематологических и биохимических исследований брали до утреннего кормления баранов-производителей. Взятие крови проводили из яремной вены в пластиковые пробирки Эппендорфа, содержащие антикоагулянты.

При гематологических исследованиях определяли количество эритроцитов и лейкоцитов в камере с сеткой Горяева, содержание гемоглобина (гемоглобинцианидным методом), высчитывали цветовой показатель, СОЭ в аппарате Панченкова, лейкограмму выводили на основании процентного соотношения различных форм лейкоцитов в мазке крови (микроскопией мазков, окрашенных по Романовскому-Гимзе) (Конина Н.А 2003, Полозюк О.Н. 2019).

При биохимических исследованиях определяли:

- общий белок (унифицированным способом с биуретовым реактивом с применением ФЭК при зеленом светофильтре 540-560 нм);
- активность щелочной фосфатазы (унифицированным методом по гидролизу фенилфосфата - метод Бессея, Лоури, Брока);
- глюкозу (ферментативно-спектрофотометрическим методом с использованием фильтра 500($\pm$ 20) нм). Метод основан на модифицированном методе Триндера;
- креатинин (кинетический метод Яффе (Method Jaffe with alkaline picrate) применяя спектрофотометр с фильтром 500 $\pm$ 10 нм);
- триглицериды (энзиматическим колориметрическим методом (enzymatic colorimetric method GPO/PAP) с использованием стандартного набора реагентов для установления концентрации триглицеридов);
- мочевины (кинетическо-фотометрическим методом (Фильтр 340(334-365) нм) с использованием стандартного набора реагентов Ure UV-DAC-Lq);
- общий кальций (с орто-кризолфталейном) и неорганический фосфор (с ванадат-молибдатным реактивом);
- АлАТ (Аланин-амино трансферазы) и АсАТ (Аспарат-амино трансферазы) кинетическим УФ методом использованием стандартного набора реагентов ALT-UV-DAC.Lq и AST-UV-DAC.Lq и спектрофотометра с фильтром 340 (334-365) нм;
- амилазу (кинетическим методом С GALG2-CNP с использованием стандартного набора реагентов Amylo D-DAC.Lq и спектрофотометра с фильтром 405($\pm$ 10) нм).

Количество тестостерона в сыворотке крови определяли методом ELISA путем твердофазной тест-системы ИФА для количественного определения тестостерона на

разборных микротитровальных панелях. В начале и в конце опыта от всех баранов были отобраны пробы крови для определения уровня тестостерона.

Получаемые в ходе выполнения исследований данные, подвергали статистической обработке и анализу с применением показателей описательной статистики (вычисление средних арифметических, стандартные отклонения, коэффициент вариации и т.д.).

Среднюю арифметическую, обозначаемую M либо $\bar{X}$ определяли по формуле:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (2.2)$$

Среднее квадратическое (или стандартное) отклонение, которое отражает степень отклонения результатов от среднего значения, обозначается знаком σ (сигма) и вычисляется по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n - 1}}. \quad (2.3)$$

Вычисление стандартной ошибки средней арифметической обозначается символом m (эм малое) и рассчитывается по формуле:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (2.4)$$

Необходимые вычисления статистических показателей проводили, используя программу «Excel» для Windows на компьютере. Степень достоверности разницы средних показателей сравниваемых групп определяли с помощью критерия Стьюдента (Лакин Г.Ф. 1990).

2.3. Выводы по второй главе

- опыты проводили как в лабораторных, так и в производственных условиях (овцеферма Экспериментально - технологической станции «Максимовка»), используя классические, а также современные методы исследования биологических объектов для определения количественных, качественных и морфологических показателей спермы, полученной от высокоценных баранов-производителей;

- согласно методикам, приведенным в данной главе, впервые был испытан мембранно-тропный препарата BioR, разработанный в Институте микробиологии и биотехнологии с целью усовершенствования синтетической среды для замораживания спермы барана, а также испытаны препараты ZooBioR-1 и ZooBioR-2 с целью коррекции сперматогенеза у баранов-производителей вне сезона размножения.

3. ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СПЕРМОПРОДУКЦИЮ

3.1. Результаты оценки свежеполученной спермы баранов-производителей

Известно, что в селекционно-племенной работе большая роль отводится баранам-производителям. Это обусловлено их влиянием на генетический прогресс породы. Особую актуальность это положение приобретает при широком использовании метода искусственного осеменения.

Общий уровень спермопродукции определяется количеством сперматозоидов в одном эякуляте. Этот показатель обусловлен, с одной стороны, объемом эякулята, а с другой – концентрацией сперматозоидов. Сравнительный анализ спермопродукции баранов разных пород показал, что максимальной ее величина была у производителей в случной сезон по сравнению с показателями в неслучной сезон.

Таким образом, больший объем спермы с высокой концентрацией сперматозоидов в эякуляте у баранов позволяет получить от них большее количество спермодоз из одного эякулята при разбавлении и замораживании. Это в свою очередь позволяет максимально использовать высококачественных баранов-производителей и осеменять большее количество овцематок, следовательно, получить большее количество потомков от высокоценного барана в стаде.

Известно, что результаты искусственного осеменения овец во многом зависят от качества спермы. Поэтому, объективная оценка и тщательное исследование спермы является важным условием эффективности искусственного осеменения овец.

При оценке внешнего вида спермы установлено, что у всех баранов, независимо от сезона года, она имела нормальную консистенцию, была светло-кремового цвета и характеризовалась специфическим запахом.

Одним из важных показателей спермы при её оценке является объем эякулята, который означает количество спермы, выделенное производителем за одну садку. В связи с тем, что бараны-производители находились в одинаковых оптимальных условиях содержания, кормления, ухода и режима использования, колебания объема эякулята варьировали среди баранов, но соответствовали ГОСТу 32277-2013.

Известно, что главной составной частью спермы являются сперматозоиды, которые вырабатываются семенниками. Важным качественным показателем спермы является концентрация половых клеток в эякуляте. Концентрация спермы характеризуется числом сперматозоидов в единице объема эякулята. Сперматозоиды являются важнейшей для

оплодотворения составной частью спермы. Степень разбавления спермы зависит, прежде всего, от концентрации половых клеток в эякуляте. При этом, чем выше концентрация, тем выше степень разбавления спермы и, таким образом, большее количество маточного поголовья можно осеменить одним разбавленным эякулятом.

Качественные и количественные показатели спермопродукции баранов-производителей в случной сезон представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1. Показатели спермопродукции баранов-производителей в случной сезон (n=40 эякулятов)

Характеристика эякулята	Ед. измерения	Статистические показатели				
		M±m	σ	Cv%	Vmin	Vmax
Объем	мл	1,25±0,06	0,40	31,99	0,8	2,0
Подвижные сперматозоиды	%	83,1±1,2	7,58	9,13	64,0	98,0
Прямолинейно - поступательные	%	40,5±1,0	6,16	15,22	29,0	55,0
Концентрация сперматозоидов	млрд/мл	2,19±0,07	0,44	20,24	1,15	2,94
Количество сперматозоидов в эякуляте	млрд.	2,74±0,17	1,1	40,17	1,34	5,36
Целостность акросомы	%	97,77±0,33	1,27	1,30	95,5	99,5

Показатели, представленные в таблице 3.1, свидетельствуют, что средний объём эякулята у баранов-производителей в случной сезон составил 1,25±0,06 мл с индивидуальными колебаниями от 0,8 мл до 2,0 мл, где коэффициент вариабельности соответствовал 31,99%.

Предел изменчивости среди баранов в случной сезон по концентрации сперматозоидов составил 1,15-2,94 млрд/мл, со средним показателем 2,19±0,07 млрд/мл, указанные показатели находятся в пределах физиологической нормы. Коэффициент вариабельности был средний и составил 20,24%.

Вероятно, концентрация сперматозоидов в эякуляте у баранов-производителей, связана с их плодовитостью. Так учеными была выявлена положительная взаимосвязь между этими показателями (Семенченко С.В. и др. 2014, Колосов Ю.А. 2020).

Качество спермопродукции и, в конечном итоге, оплодотворяющую способность спермы, во многом определяет подвижность сперматозоидов.

В наших исследованиях подвижность сперматозоидов в случной сезон составила в среднем 83,1±1,2 %, с колебаниями в пределах от 64,0 до 98,0 %, что соответствует стандарту. Коэффициент вариабельности был минимален и составил 9,13%.

Известно, что общий уровень спермопродукции определяется количеством сперматозоидов в одном эякуляте. Этот показатель обусловлен, с одной стороны, объемом эякулята, а с другой – концентрацией сперматозоидов.

Анализ спермопродукции баранов-производителей в случной период показал, что общее количество сперматозоидов в эякуляте составило $2,74 \pm 0,17$ млрд, с колебаниями от 1,34 до 5,36 млрд сперматозоидов. В итоге, большой объем спермы, и более высокая концентрация сперматозоидов в эякуляте у баранов в случной период позволяет получить от них большее количество спермодоз в одном эякуляте при разбавлении, что в свою очередь позволит осеменить большее количество овцематок.

Оценивали целостность акросомы сперматозоидов в случной сезон. Акросома - органоид, расположенный на вершине головки сперматозоида, в котором содержатся гидролитические ферменты, способные растворить оболочку яйцеклетки в момент оплодотворения.

Из данных таблицы 3.1 видно, что при оценке спермы баранов-производителей на целостность акросомы сперматозоидов в темнопольном освещении в случной сезон. У баранов-производителей при взятии спермы в случной сезон целостность акросомы была в пределах $97,77 \pm 0,33$ при колебаниях от 95,5 до 99,5 %. Коэффициент вариабельности был минимален и составил 1,3%.

Процент сперматозоидов с аномальной морфологической структурой определяли путем подсчета под микроскопом, сперматозоидов с патологическими формами строения. К аномальным формам относили сперматозоиды с отклонениями в строении головки (круглая, несимметричная, укороченная, заостренная, двойная, без мембраны или жгутика), шейки (двойная, ломаная, изогнутая, укороченная), хвоста (изогнутый, двойной, извитой, скрученный, с цитоплазматической капелькой, рудиментарный).

Исследования проводили под микроскопом с увеличением в 900 раз (10х90).

Результаты экспериментальных данных по определению сперматозоидов с аномальной морфологией в сперме баранов-производителей в случной сезон представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. Аномалии сперматозоидов в случной сезон (n=22), %

Показатели	Статистические показатели				
	M±m	σ	Cv%	Vmin	Vmax
Головка	1,70±0,19	0,72	42,460	0,5	3,5
Шея	2,77±0,19	0,75	26,978	1,5	4,0
Хвост	3,68±0,23	0,90	24,329	2,0	5,5

Результаты, анализа данных таблицы 3.2 показывают, что наименьшее число сперматозоидов с аномалиями было установлено у головки сперматозоидов 1,70±0,19 с колебаниями от 0,5 до 3,5%, а наибольшее количество сперматозоидов с аномалиями обнаружено в области хвоста 3,68 с колебаниями от 2,0 до 5,5%, в области шейки 2,77 с колебаниями от 1,5 до 4,0%.

Полученные экспериментальные результаты соответствуют требованиям, предусмотренными межгосударственным стандартом (ГОСТ 32200-2013), где указано, что количество сперматозоидов с аномальной морфологией в сперме баранов-производителей не должно превышать 18%.

Изучение скорости движения сперматозоидов в эякулятах баранов-производителей, полученных в случной сезон, приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3. Скорость движения сперматозоидов в случной сезон (n=40), μm/s

Показатели	Статистические показатели				
	M±m	σ	Cv%	Vmin	Vmax
VAP	119,0±2,7	17,33	14,57	90,0	171,7
VSL	95,6±2,52	15,95	16,69	70,3	121,3
VCL	176,4±4,02	25,41	14,41	136,8	229,1

Анализ скорости движения VAP показал, что средняя скорость движения сперматозоидов в свежеполученном эякуляте составил 119,0 с колебаниями от 90,0 до 171,7 μm/s.

В результате измерения показателей движения сперматозоидов VSL установлено, что данный показатель в среднем составил 95,6 с колебаниями от 70,3 до 121,3 μm/s.

Скорость движения сперматозоидов VCL, был равен 176,4 с колебаниями от 136,8 до 229,1 μm/s, а коэффициент вариабельности во всех показателях был средним.

На основе полученных экспериментальных результатов по скорости движения сперматозоидов можно сделать вывод, что компьютерный анализ CEROS имеет большое значение в качестве инструмента научных и практических исследований как в системе воспроизводства животных, так и для клинических исследований. Система также

включает функциональную проверку качественных показателей спермы, которые не просто измеряют параметры данных, а помогают в определении значения абсолютной оплодотворяемости сперматозоидов.

Известно, что преимущество искусственного осеменения заключается в возможности наиболее целесообразного использования особо ценных производителей для быстрого повышения продуктивности животных на племенных и товарных фермах. Для достижения этой цели требуется значительно увеличить количество приплода, получаемого от ценных элитных производителей. Этого можно добиться применением метода длительного хранения спермы, обеспечивающего возможность ее заготовки. Этот способ, как показывают полученные выше экспериментальные данные и их результаты в настоящее время не имеют широкого применения в связи с низким качеством получаемой от элитных баранов-производителей спермы, непригодной к ее криоконсервированию и хранению в генетических банках.

Чтобы создать наиболее благоприятные условия для хранения спермы требуется охладить ее до температуры, при которой протоплазма сперматозоидов затвердевает, а обменные процессы практически прекращаются (ингибируются).

Литературные научные данные показывают, что методика замораживания спермы барана нуждается в дальнейшем совершенствовании. Исследования в этой области должны идти как по пути эффективного использования баранов-производителей в течение круглого года, так и в направлении изыскания более совершенных синтетических сред для разбавления и режимов охлаждения.

Исследованиями отечественных и зарубежных ученых показано, что от баранов-производителей можно получать сперму высокого качества не только в осенние месяцы, но и в другие сезоны года. Это позволяет значительно повысить интенсивность использования высокоценных производителей в течение года за счет заготовки замороженной спермы вне сезона естественного размножения данного вида сельскохозяйственных животных.

Сперматогенез у баранов зависит как от фенотипических, так и от генетических факторов.

Результаты исследований влияния случного сезона на качество заморожено-оттаянной спермы, полученной от баранов-производителей Цигайской породы молдавского типа, проиллюстрированы на рисунке 3.1.

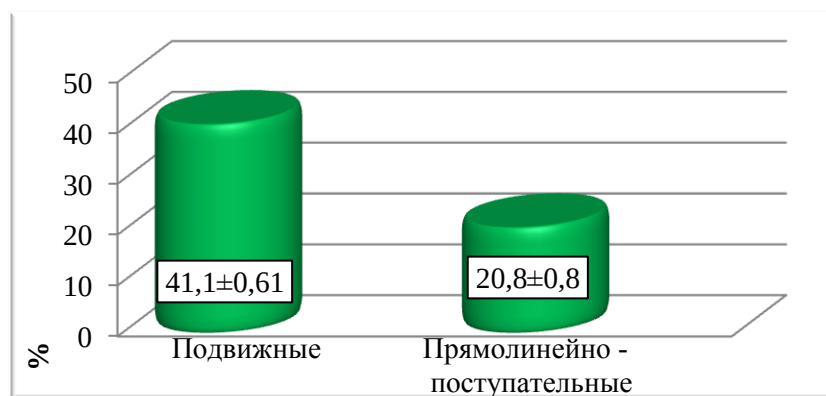


Рис. 3.1. Качественные показатели заморожено-оттаянной спермы (n=40), %

Установлено, что в условиях Республики Молдова бараны-производители Цигайской породы молдавского типа шерстно-мясо-молочного направления проявляют достаточно высокую половую активность. Однако наиболее высокими показателями половой активности она отличается в случной сезон (осенние месяцы).

При исследовании заморожено-оттаянной спермы получены сравнительно хорошие результаты качества оттаянной спермы. Подвижность сперматозоидов составила 41,1%, а число сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением 20,5%.

3.2. Круглогодичное использование высокопродуктивных баранов-производителей

Разработка метода длительного сохранения спермы барана в замороженном виде открывает перспективу круглогодичного накопления биологически полноценной спермы баранов-производителей с тем, чтобы во время сезонного проявления овцами половых рефлексов располагать нужными запасами спермы высокоценных баранов-улучшателей как для углубления селекционно-племенной работы, так и для массового повышения продуктивности в стадах. Поскольку длительная половая эксплуатация баранов на протяжении года вносит определенные коррективы в осуществление репродуктивной функции, стало необходимым, во-первых, исследовать возможность накопления замороженной спермы баранов-производителей вне сезона размножения, во-вторых, разработать для этого оптимальный режим использования баранов, и, в-третьих, изучить влияние этих факторов на биологическую полноценность спермы, заготовленной в неслучной сезон года.

В этих целях проводили исследования по разработке метода использования высокоценных баранов-производителей вне сезона размножения для накопления от них

замороженной спермы и изучению ее биологической полноценности. Для этого исследовали уровень спермопродукции баранов в зависимости от сезона размножения, устойчивости спермы к замораживанию и её биологическую полноценность при замораживании в неслучной сезон. На основании изучения этих вопросов предполагалось разработать оптимальную технологию использования баранов-производителей при их длительной эксплуатации на протяжении года.

Эксперимент, проведенный в течение 4-х лет на взрослых племенных баранах Цигайской породы Молдавского типа шерстно–мясо–молочного направления (Патент на изобретение № 3440), показал, что в условиях Республики Молдова бараны проявляют высокую половую активность не только в осенний (случной) сезон, но и в неслучной сезон года. Данные по характеристике нативной спермы представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4. Характеристика спермы в неслучной сезон (n=25)

Характеристика эякулята	Ед. измерения	Статистические показатели			
		M±m	Cv%	Vmin	Vmax
Объем	мл	1,23±0,33	27,09	0,6	1,5
Подвижные сперматозоиды	%	66,24±19,2	19,9	50,0	85,0
Концентрация сперматозоидов	млрд/мл	1,33±0,54	35,85	0,630	1,65
Количество сперматозоидов в эякуляте	млрд.	1,64±0,3	14,53	0,720	2,01

В проведенных опытах было установлено, что в неслучной сезон подвижность сперматозоидов в среднем была 66,24±19,2%. Концентрация сперматозоидов составила 1,33±0,54 млрд/мл. Объем полученных эякулятов составил в среднем 1,23±0,33 мл с диапазоном колебаний от 0,6 до 1,5 мл. Общее количество сперматозоидов в эякуляте составило 1,64 млрд. с колебаниями от 0,72 до 2,01 млрд.

В другой серии опытов, которые проводили в случной сезон, изучали уровень спермопродукции баранов-производителей в их естественный период размножения. Данные по характеристике нативной спермы представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5. Характеристика спермы в случной сезон (n=25)

Характеристика эякулята	Ед. измерения	Статистические показатели			
		M±m	Cv%	Vmin	Vmax
Объем	мл	1,38±0,40	18,01	0,9	1,52
Подвижные сперматозоиды	%	81,17±1,60	18,31	73,0	98,0
Концентрация сперматозоидов	млрд/мл	1,47±0,10	32,81	0,683	2,313
Количество сперматозоидов в эякуляте	млрд.	2,03±0,09	25,97	0,769	2,035

Полученные экспериментальные данные показали, что объем эякулята у баранов в случной сезон составил в среднем $1,38 \pm 0,40$ мл с колебаниями от 0,9 до 1,52 мл. Этот показатель выше на 0,15 мл по сравнению с объемом эякулята в неслучной сезон. Подвижность сперматозоидов составила в среднем $81,17 \pm 1,60\%$ с колебаниями от 73,0 до 98,0%, что на 14,53% выше показателя в неслучной сезон. Концентрация сперматозоидов в эякуляте была выше на 0,14 млрд/мл, а общее количество сперматозоидов в эякуляте составило $2,03 \pm 0,09$ млрд, или на 0,39 млрд больше, чем аналогичный показатель в неслучной сезон. Таким образом, результаты четырёхлетних экспериментов свидетельствуют о том, что качественные и количественные показатели спермы, такие как подвижность, объем, концентрация, несмотря на определенную тенденцию к снижению в неслучной сезон, остаются на достаточно высоком уровне и отвечают минимальным требованиям.

Для суждения о качественных показателях спермы, полученной от баранов-производителей в зависимости от сезона размножения, была изучена скорость движения сперматозоидов.

Качественные характеристики спермы - скорость движения сперматозоидов, в зависимости от сезона размножения, представлены на рисунке 3.2.

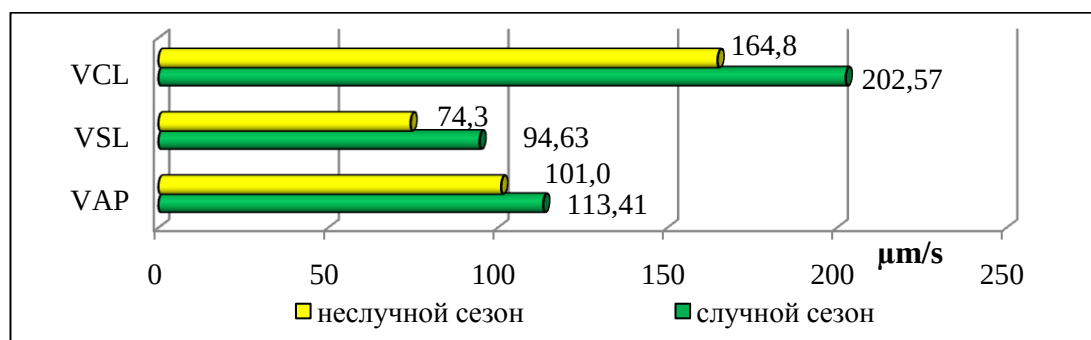


Рис. 3.2. Скорости движения сперматозоидов (n=25), μm/s

Согласно данным представленным на рисунке 3.2, установлено, что средняя скорость движения сперматозоидов -VAP была равен 101,0 $\mu\text{m/s}$, тогда как в случайной сезон этот показатель был равен 113,41 $\mu\text{m/s}$ или на 12,41 $\mu\text{m/s}$ больше.

При измерении VSL - усредненная по времени скорость движения сперматозоидов вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точкой траектории установлено, что в неслучной сезон этот показатель был равен 74,3 $\mu\text{m/s}$ или на 20,33 $\mu\text{m/s}$ меньше, чем в случайной сезон.

Измеряя пройденный путь сперматозоидов VCL - расстояние и скорость перемещения по всей траектории, установили, что этот показатель был равен 101,0 $\mu\text{m/s}$, меньше на 37,7 $\mu\text{m/s}$ в неслучной сезон по-сравнению со случайным сезоном.

В специальных опытах изучали уровень повреждений акросомы сперматозоидов в разные периоды. Экспериментальные данные и их результаты представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6. Процент сохранности акросомы в неслучной сезон (n=25)

Показатели, %	Статистические показатели			
	M $\pm$ m	Cv%	Vmin	Vmax
Случной сезон	2,3 $\pm$ 0,3	55,33	1,0	5,0
Неслучной сезон	2,8 $\pm$ 0,4	59,15	1,0	7,0

В результате изучения биологической полноценности спермы баранов-производителей в зависимости от сезона установлено, что в неслучной сезон процент сперматозоидов с поврежденной акросомой составил 2,8 $\pm$ 0,4%. Известно, что содержащиеся в акросоме ферменты освобождаются и способствуют перфорации лучистого венца яйцеклеток, благодаря чему в нее проникает сперматозоид (Бекиш В.Я. 2020). Этот показатель играет важную роль в эффективности искусственного осеменения овец.

Собственные исследования и анализ литературных источников по данной проблеме выявил заметное расхождение между показателями процента аномальных сперматозоидов в неслучной и случайной сезоны размножения. Полученные нами данные представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7. Аномалии сперматозоидов в зависимости от сезона размножения (n=25)

Показатели, %	случной сезон	неслучной сезон.
Головка	4,2±0,3	5,4±0,3
Шея	4,2±0,4	4,4±0,2
Хвост	4,0±0,3	4,0±0,2
Всего	12,4	13,8

Представленные в таблице 3.7 данные показывают, что в неслучной сезон количество сперматозоидов с аномалиями находилось в пределах 13,8%. Самый высокий процент сперматозоидов с аномалиями был установлен на уровне головки сперматозоида в неслучной сезон 5,4±0,3%.

Первостепенной задачей в области криобиологии спермы барана является разработка практических способов длительного хранения спермы, полученной от баранов-производителей вне зависимости от сезона размножения, при высокой сохранности ее биологической полноценности.

Результаты многолетних данных по изучению параметров качества оттаянных сперматозоидов в зависимости от сезона размножения представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8. Качественные показатели спермы после замораживания-оттаивания в зависимости от сезона размножения (n=17)

Параметры		Неслучной сезон	Случной сезон
Подвижные, %		36,8±1,7	48,8±1,5***
Прогрессивные, %		14,7±1,1	24,2±1,2***
Скорость движения, $\mu\text{m/s}$	VAP	78,1±3,2	84,4±4,3
	VSL	65,7±3,4	69,1±2,5
	VCL	112,1±3,0	125,5±5,4*

*P≤0,05; ***P≤0,001

Установлено, что в неслучной сезон, подвижность сперматозоидов после криоконсервации была ниже на 6% по сравнению со случайным сезоном (P≤0,001). Также были установлены различия в количестве живых сперматозоидов с прямолинейно-поступательными движениями, именно те сперматозоиды, которые непосредственно участвуют в оплодотворении яйцеклетки. Их количество в случайной сезон, после замораживания-оттаивания спермы составило 24,2 ± 1,2%, тогда как в неслучной сезон этот показатель был на уровне 14,7 ± 1,1 или на 9,5% меньше (P≤0,001).

В опытах мы исходили из классического принципа, что скорость движения сперматозоидов имеет большое значение по времени их достижения места, где происходит оплодотворение яйцеклетки, т.е. верхней трети яйцевода самки.

Установлено, что скорость движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL) в случайной сезон выше, по сравнению с такими же показателями неслучного сезона.

Согласно литературным источникам известно, что пригодной к использованию считается оттаянная сперма с подвижностью 40% и выше, а время выживаемости при +37 °С не менее 5 часов. Полученные в наших исследованиях результаты по динамике количества подвижных сперматозоидов после замораживания-оттаивания приведены на рисунке 3.3.

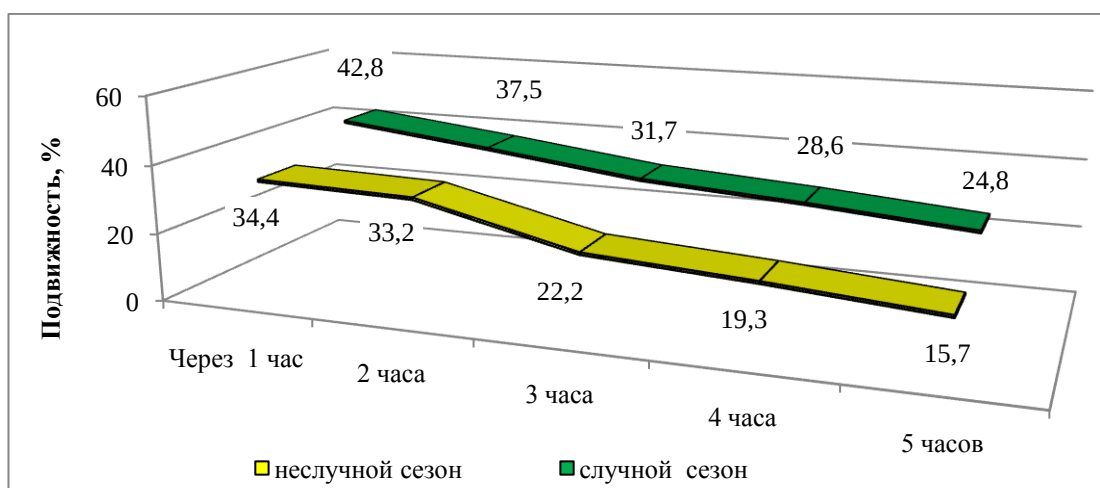


Рис. 3.3. Динамика количества подвижных сперматозоидов после замораживания-оттаивания (n=17), %

В результате изучения подвижности сперматозоидов после замораживания-оттаивания спермы, в зависимости от сезона размножения, установлено, что процент подвижности сперматозоидов в период сохранения их при +37 °С постепенно снижается. После 5 часов хранения при температуре +37 °С, сперма, замороженная от баранов в случайной сезон, имела 24,8% живых сперматозоидов, а качество заморожено-оттаянной спермы в неслучной сезон, соответствовало 15,7% живых сперматозоидов или на 9,1% ниже.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что жизнедеятельность сперматозоидов является функцией ее морфологической организации, в связи с чем информация о биологической деятельности элементов сперматозоидов является обязательной для разработки методов их консервации на основании использования феномена анабиоза. В активных клетках этот закон выполняется благодаря деятельности цитоплазматической мембраны, являющейся активным органоидом клетки,

обеспечивающим поддержание в ее протоплазме строго определенного электролитного состава.

Доказано, что при своей работе мембрана затрачивает определенную энергию, поставляемую за счет внутриклеточных обменных процессов. Перевод клетки в активное состояние, например, при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, усиливает процесс метаболизма, что влечет за собой потребление имеющегося энергетического запаса. Поэтому в сперматозоидах, полученных от баранов-производителей в случной сезон, этот резерв энергетических веществ больше, чем у сперматозоидов, полученных от баранов в неслучной сезон, когда процессы сперматогенеза протекают менее интенсивно и в итоге в сперматозоидах накапливается меньшее количество энергетических веществ.

В настоящее время достаточно широко развернуты исследования и имеются собственные достижения в области теории глубокого замораживания спермы. Разработаны, улучшены и освоены ряд отечественных и зарубежных технологий криоконсервирования спермы баранов при температуре -196°C . Следовательно, период научно-производственного и технического изучения метода замораживания спермы барана достиг определенных положительных результатов, за ним должен наступить период организации использования метода искусственного осеменения овец, по его прямому назначению.

Кроме основного назначения, метод искусственного осеменения имеет ряд основных требований к качеству заморожено-оттаянной спермы и, особенно, к количеству сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением, которые непосредственно участвуют в процессе оплодотворения яйцеклеток.

Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после оттаивания при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, представлены на рисунке 3.4.

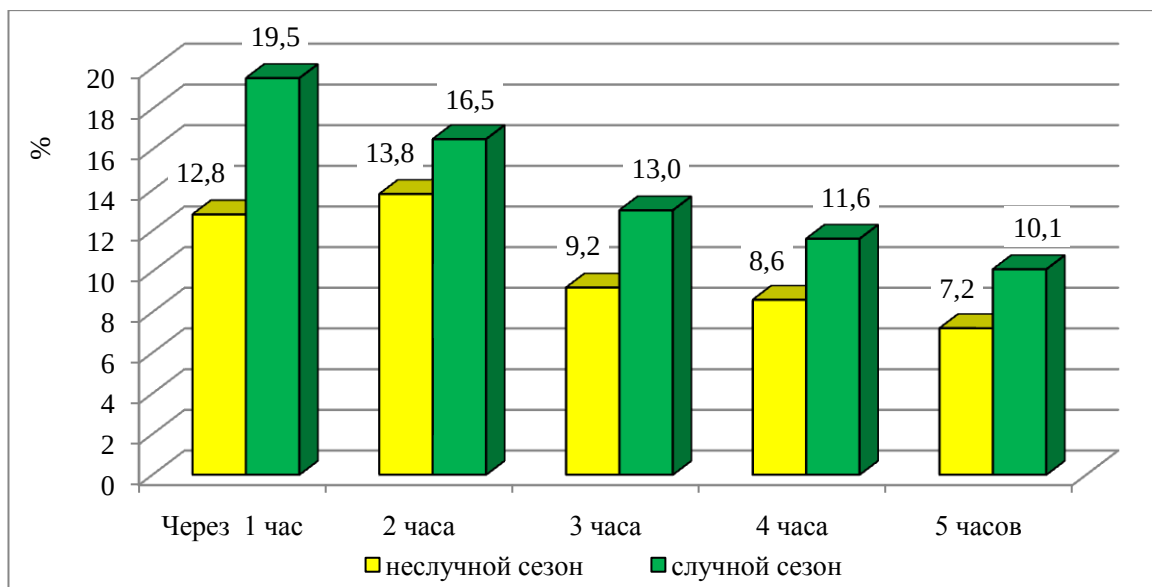


Рис. 3.4. Динамика количества сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после замораживания-оттаивания (n=17), %

Данные рисунка 3.4 показывают, что сохранение семени баранов после замораживания-оттаивания при +37 °C в течении 5 часов приводит к резкому уменьшению количества сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением, и что еще немаловажно этот показатель зависит от сезона года. Процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в случайной сезон составил 19,5%, тогда как в неслучной этот показатель был равен 12,8% или на 6,7 процентных пункта меньше. Показатель выживаемости сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением при температуре +37 °C в течении 5 часов был в пределах 10,1% в случайной сезон, а в неслучной сезон этот показатель был на уровне 7,2%. Благодаря полученным результатам по качеству заморожено-оттаянной спермы, а также количества сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением исследования были направлены на выяснения причин резкого снижения процента выживаемости сперматозоидов в зависимости от сезона размножения.

На протяжении нескольких лет была изучена скорость движения сперматозоидов с разными формами движения и в зависимости от сезона. При помощи компьютерной программы „CEROS” была изучена скорость движения сперматозоидов после замораживания-оттаивания - VAP, VSL, VCL.

Результаты многолетних данных по изучению показателя VAP, который измеряет среднюю скорость движения головки по усредненной траектории, представлены на рисунке 3.5.

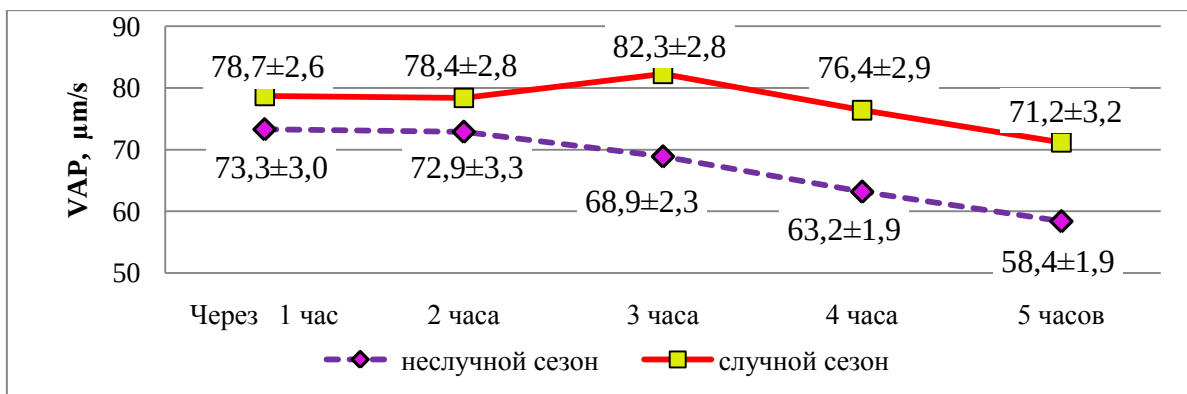


Рис. 3.5. Средняя скорость движения сперматозоидов по усредненной траектории после замораживания-оттаивания - VAP (n=17), $\mu\text{m/s}$

Анализируя экспериментальные данные, приходим к заключению, что скорость движения сперматозоидов, полученных в случайной сезон была выше, чем скорость движения сперматозоидов в неслучной сезон.

Скорость движения показателя VAP сперматозоидов, полученных в случайной сезон, после замораживания-оттаивания и хранившиеся при температуре $+37^\circ\text{C}$ в течении 5 часов составила $71,2 \mu\text{m/s}$, тогда как у сперматозоидов, полученных в неслучной сезон, за такой же период времени, этот показатель был на уровне $58,4 \mu\text{m/s}$ или на $12,8 \mu\text{m/s}$ меньше чем в случайной сезон.

В другой серии опытов нами была изучена усредненная скорость движения сперматозоидов по времени, вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точкой траектории - VSL, которая представляет собой самую низкую величину при измерениях. Экспериментальные данные по изучению показателя VSL представлены на рисунке 3.6.

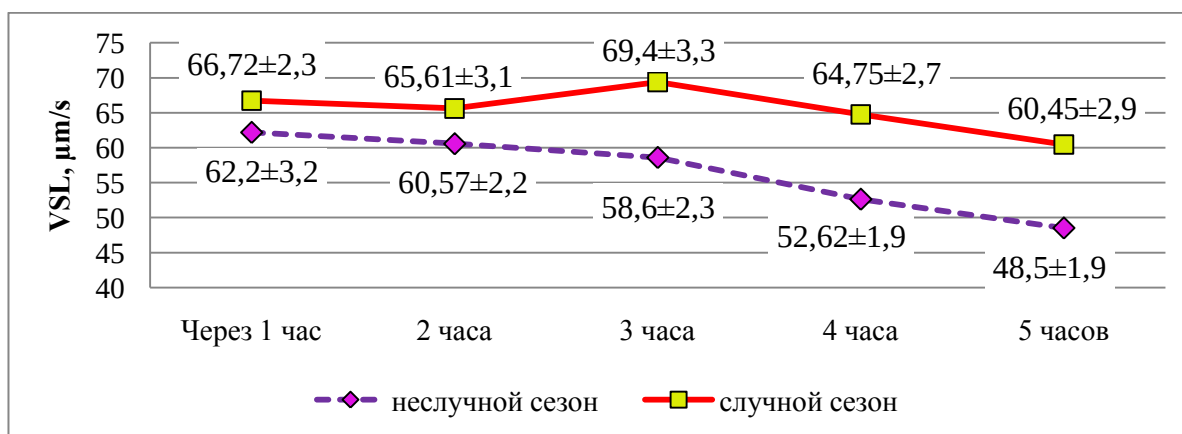


Рис. 3.6. Прямолинейная скорость движения сперматозоидов после замораживания-оттаивания - VSL (n=17), $\mu\text{m/s}$

Данные представленные на рисунке 3.6 показывают, что сперматозоиды в случайный сезон имеют более высокую скорость движения после 5-часовой выдержки при температуре +37 °С (60,45 $\mu\text{m/s}$), в сравнении со сперматозоидами, полученными в неслучайный сезон. Следовательно, полученные данные позволили сделать вывод, о целесообразности проведения более фундаментальных кинетических исследований и на основе этого усовершенствовать метод круглогодичного использования высокоценных баранов-производителей с целью повышения процента оплодотворяемости овцематок путем использования для искусственного осеменения замороженной спермы, накопленной в течение года.

Кроме этого были проведены исследования по изучению скорости движения сперматозоидов VCL. Данный показатель измеряет общий путь, пройденный головкой сперматозоида в период наблюдения и имеет самые высокие цифровые показатели. Полученные экспериментальные данные и их результаты представлены на рисунке 3.7.

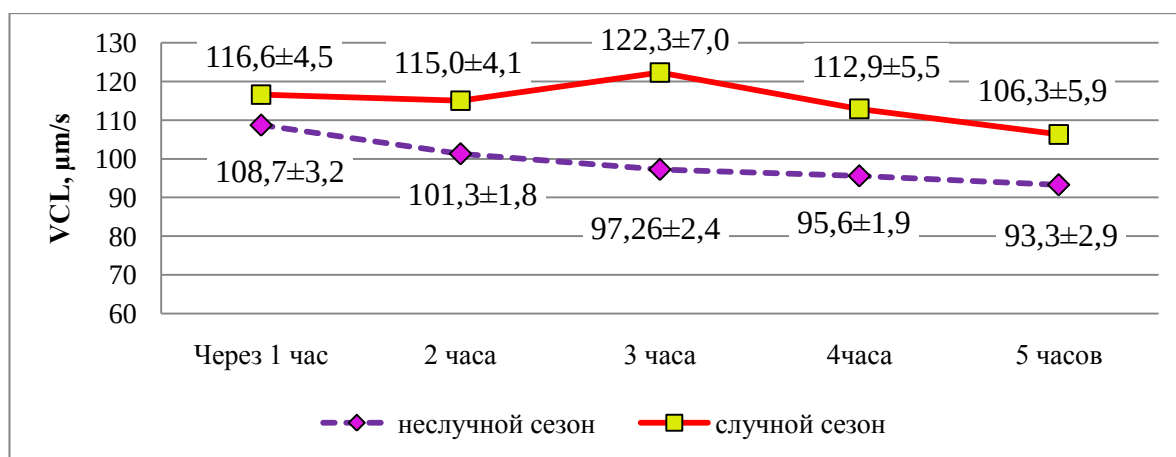


Рис. 3.7. Криволинейная скорость движения сперматозоидов после замораживания-оттаивания - VCL (n=17), $\mu\text{m/s}$

Анализируя полученные результаты, следует, что период получения спермы влияет на показатели VCL. К примеру, в случайный сезон VCL после 5 часов содержания оттаянной спермы при температуре +37 °С составил 106,3 $\mu\text{m/s}$, тогда как у сперматозоидов, содержащихся в тех же условиях в неслучайный сезон - 93,3 $\mu\text{m/s}$, или ниже на 13,0 $\mu\text{m/s}$.

Полученные экспериментальные результаты, свидетельствующие об эффективности круглогодичного использования высокоценных баранов-производителей, позволили научно обосновать, усовершенствовать и разработать более совершенные приемы эффективного использования генофонда баранов-производителей для ускорения

темпов улучшения племенных и продуктивных качеств овец, разводимых в Республике Молдова.

3.3. Влияние ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на воспроизводительные качества баранов-производителей

Увеличение темпов роста поголовья овец возможно только с использованием достижений современной науки. Одним из резервов увеличения поголовья и повышения экономической эффективности производства овцеводческой продукции является улучшение репродуктивных качеств баранов-производителей. У цигайских овец данная проблема до конца не изучена.

Основной целью наших исследований являлось изучение влияния стимуляции сперматогенеза у баранов-производителей экзогенным введением в рацион биологически активных препаратов. Литературные данные, в этой области, доказывают большое значение биологически активных препаратов в стимуляции и регуляции физиологических функций (Rotari D. 2020, Карапиря А. 2021). Поэтому возникла необходимость в изучении препаратов, стимулирующих репродуктивную функцию баранов-производителей в определенных физиологических и экологических условиях, что позволит обеспечение рентабельности содержания и использования их в особенности в неслучной сезон.

Из огромного количества продуктов растительного происхождения, которые проявляют защитное, лечебное, а также биопродуктивное действие, надо отметить биомассу цианобактерий и микроводорослей. При помощи современных биотехнологий из данных микроорганизмов получают ряд биоактивных средств (Rudic V. 2007, Zinicovscaia I. 2017).

Одной из целей при выполнении данной работы являлось определение эффекта препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2 (разработанного Институтом Микробиологии и Биотехнологии) на репродуктивную функцию баранов-производителей вне сезона размножения.

Определяли в свежеполученных эякулятах: объем, подвижность и концентрацию сперматозоидов по общепринятым методикам. Устойчивость спермы к замораживанию изучали путем определения подвижности сперматозоидов после оттаивания. Сперму считали пригодной для дальнейшего хранения и использования при наличии в ней не менее 40% сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением.

Результаты по изучению влияния ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на количественные показатели спермы баранов-производителей в начале и в конце опыта показаны на рисунке 3.8.

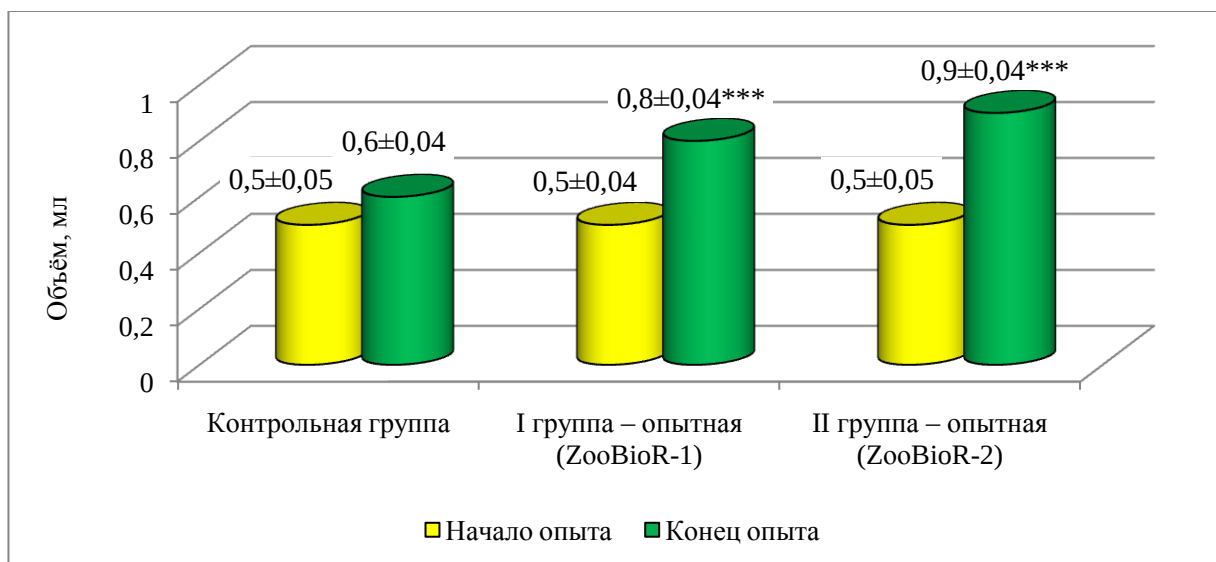


Рис 3.8. Объем эякулята баранов-производителей в начале и в конце опыта (n=24), мл

Объем эякулята в контрольной и опытных группах в начале опыта был одинаковым ($0,5 \pm 0,05$ мл). После 50 дней опыта объем эякулята в контрольной группе стал выше на ($0,1$ мл), что не является статистически достоверной разницей. В первой опытной группе, где баранам на протяжении 50 дней к основному рациону добавляли по 5 г ZooBioR-1, объем эякулята в неслучной сезон составил $0,8 \pm 0,04$ ($P \leq 0,001$), а во второй опытной группе, где бараны-производители получали дополнительно к основному рациону также по 5 грамм ZooBioR-2, объем эякулята повысился в конце опыта на достоверную разницу ($P \leq 0,001$), и составил $0,9 \pm 0,04$ мл ($P \leq 0,001$) (рис. 3.8).

Одновременно с изучением объема эякулята, за период проведения опыта была изучена подвижность сперматозоидов. Данные по изучению динамики изменения подвижности сперматозоидов в неслучной сезон в зависимости от применения биологически активных препаратов (ZooBioR-1 и ZooBioR-2) представлены на рисунке 3.9.

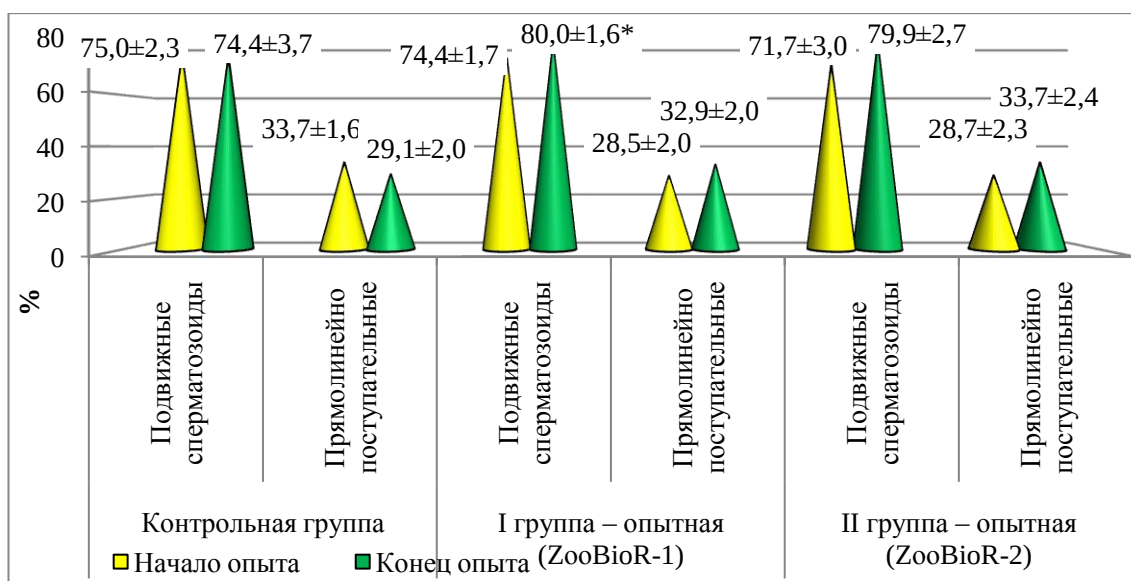


Рис. 3.9. Процент подвижных и прямолинейно-поступательных сперматозоидов в начале и в конце опыта (n=24), %

Исходя из полученных результатов, минимальное значение активности подвижных сперматозоидов в начале проведения опыта составляло $71,7 \pm 3,0\%$ - у баранов второй опытной группы, а сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением $28,5 \pm 2,0\%$ - у баранов первой опытной группы. Разница между контрольной и опытными группами статистически недостоверна.

Средний процент активности сперматозоидов баранов-производителей в конце опыта в первой опытной группе увеличился до $80,0 \pm 1,6\%$, разница статистически достоверна, $79,9 \pm 2,7\%$ во второй опытной группе, разница статистически недостоверна, тогда как в контрольной группе активность сперматозоидов практически не изменилась за период проведения опыта.

Экспериментальные данные по изучению изменения концентрации сперматозоидов в эякуляте баранов-производителей в период проведения опыта приведены на рисунке 3.10.

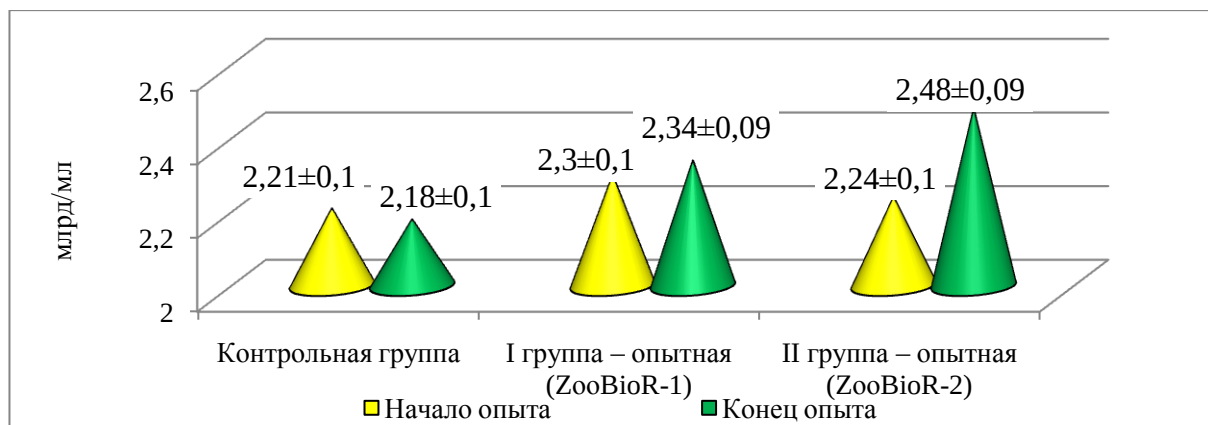


Рис. 3.10. Концентрация сперматозоидов в эякуляте в начале и в конце опыта (n=24), млрд/мл

Из анализа показателей, представленных на рисунке 3.10, следует, что среднее значение концентрации сперматозоидов в эякуляте баранов-производителей опытных групп при применении ZooBioR-1 и ZooBioR-2, составило $2,34 \pm 0,09$ в первой опытной группе и 2,48 млрд/мл во второй опытной группе через 50 дней кормления препаратом. В контрольной группе концентрация сперматозоидов в эякуляте осталась практически неизменной.

Исходя из полученных результатов, можно отметить, что применение препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2 оказывает положительное влияние на качество спермопродукции, получаемой от баранов-производителей в неслучной сезон.

Данное исследование послужило основанием для подачи заявки на патентное изобретение. Впоследствии был получен патент № 1460 (Darie G., Rotari D. și al. 2020).

Для оценки общего клинического состояния животных и контроля эффективности применения препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2 проведены гематологические и биохимические исследования крови подопытных и контрольных животных.

Важность исследования состава крови заключается, прежде всего, в ее большой и незаменимой роли посредника между внешней средой и организмом. Развитие живого организма неразрывно связано с постоянным обменом веществ и энергии между ним и окружающей средой. Реакции обмена веществ, протекающие в организме, характеризуются высокой степенью согласованности. Помимо того, что кровь, являясь внутренней средой организма, находясь в постоянном контакте со всеми органами и тканями, отражает те изменения, которые происходят в организме в процессе его жизнедеятельности, она, также, является удобной, доступной системой для исследования.

Результаты, полученных и статистически обработанных гематологических и биохимических показателей крови представлены в таблице 3.9.

Согласно полученным результатам, гематологические и биохимические показатели крови баранов-производителей находились в пределах физиологических норм на протяжении всего времени эксперимента. Данные исследования проб крови указывают на тот факт, что животные на начало и на протяжении всего проведения эксперимента, были клинически здоровы.

Таблица 3.9. Гематологические и биохимические показатели крови

Показатели	Контрольная группа		I группа – опытная (ZooBioR-1)		II группа – опытная (ZooBioR-2)	
	Начало опыта	Конец опыта	Начало опыта	Конец опыта	Начало опыта	Конец опыта
Эритроциты, ($\times 10^{12}/L$)	10,7 $\pm$ 1,1	6,3 $\pm$ 0,6*	10,1 $\pm$ 0,7	7,9 $\pm$ 0,4	9,9 $\pm$ 1,1	8,7 $\pm$ 0,8
Лейкоциты, ($\times 10^9/L$)	6,4 $\pm$ 1,1	8,0 $\pm$ 1,0	8,6 $\pm$ 1,1	10,1 $\pm$ 0,9	12,4 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,5**
Hb, г/л	91,7 $\pm$ 6,0	118,3 $\pm$ 4,4*	108,0 $\pm$ 4,2	101,7 $\pm$ 4,4	108,3 $\pm$ 1,7	106,7 $\pm$ 3,3
СОЭ, мм/час	1,7 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,3*	4,0 $\pm$ 1,4	2,3 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 1,2	5,7 $\pm$ 0,3
Эозинофилы, %	13,0 $\pm$ 4,2	11,3 $\pm$ 1,8	12,0 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 1,8	15,0 $\pm$ 4,6	11,3 $\pm$ 1,5
Сегментоядерные нейтрофилы, %	10,7 $\pm$ 3,2	11,0 $\pm$ 2,5	10,3 $\pm$ 2,6	7,7 $\pm$ 2,0	8,3 $\pm$ 0,9	14,0 $\pm$ 2,0
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,7 $\pm$ 1,8	16,3 $\pm$ 4,2	6,3 $\pm$ 2,3	13,7 $\pm$ 5,4	6,7 $\pm$ 2,9	10,7 $\pm$ 3,9
Лимфоциты, %	72,7 $\pm$ 8,3	61,3 $\pm$ 5,5	71,3 $\pm$ 4,7	65,0 $\pm$ 3,8	70,0 $\pm$ 4,9	64,0 $\pm$ 3,8
Альбумины, г/л	18,3 $\pm$ 0,8	17,2 $\pm$ 1,1	21,6 $\pm$ 1,7	25,7 $\pm$ 0,8	21,4 $\pm$ 1,0	21,4 $\pm$ 0,4
Протеин, г/л	40,5 $\pm$ 1,2	25,6 $\pm$ 4,3	37,4 $\pm$ 7,0	35,6 $\pm$ 4,3	43,6 $\pm$ 2,6	31,9 $\pm$ 4,1
Креатинин, мкмоль/л	77,1 $\pm$ 33,7	98,5 $\pm$ 47,1	56,6 $\pm$ 18,5	162,0 $\pm$ 58,3	62,5 $\pm$ 27,3	47,1 $\pm$ 21,2
Триглицериды, ммоль/л	1,5 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,04	1,5 $\pm$ 0,05	0,5 $\pm$ 0,03
Железо, мкмоль/л	0,5 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 7,2	0,5 $\pm$ 0,1	10,5 $\pm$ 5,4	0,5 $\pm$ 0,2	11,5 $\pm$ 6,2
Магний, ммоль/л	0,8 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,004	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2
Фосфор, ммоль/л	1,5 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1
Кальций, ммоль/л	12,8 $\pm$ 1,7	37,6 $\pm$ 12,3	13,3 $\pm$ 5,0	39,9 $\pm$ 12,6	18,3 $\pm$ 1,9	43,5 $\pm$ 25,5
Мочевина, моль/л	1,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 1,0	1,9 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,3
Холестерол, ммоль/л	59,9 $\pm$ 16,4	249,3 $\pm$ 9,6	85,3 $\pm$ 16,9	227,9 $\pm$ 1,0	67,2 $\pm$ 20,1	244,9 $\pm$ 6,4
Амилаза, U/E	35,4 $\pm$ 11,1	9,2 $\pm$ 1,5	15,1 $\pm$ 8,3	3,4 $\pm$ 0,6	99,7 $\pm$ 3,7	10,3 $\pm$ 4,5
Щелочная фосфатаза, U/E	47,7 $\pm$ 12,3	77,0 $\pm$ 36,9	63,1 $\pm$ 4,9	18,0 $\pm$ 0,9	125,9 $\pm$ 8,6	55,5 $\pm$ 40,3
Глюкоза, ммоль/л	4,1 $\pm$ 0,8	4,2 $\pm$ 1,5	4,3 $\pm$ 1,1	5,9 $\pm$ 1,8	4,7 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 2,7

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Известно, что половая активность у баранов-производителей может наблюдаться в течение всего года, но лучше всего она выражена во время случного сезона. В летние месяцы половая активность баранов снижается, тогда, как осенью она повышается. Сезонное изменение половой активности у баранов-производителей осуществляется под

контролем симпатической нервной системы. На половую активность также оказывает влияние продолжительность светового дня и рацион кормления.

В естественных условиях развитие сперматогенеза происходит под влиянием мужских половых гормонов – андрогенов, основным из которых является тестостерон и продукты его трансформации. Существует мнение, что андрогены играют пусковую роль в формировании сперматозоидов, а с наступлением половой зрелости изменяется реактивность к гормонам тех тканей, которые связаны с установлением половых рефлексов. По-видимому, свою роль в формировании половых рефлексов и поддержании их на определенном уровне играют и эстрогены в небольшом количестве, образующиеся в организме самцов. Исходя из этого, появилась гипотеза, что эстрогены являются одним из факторов, ответственных за проявление половых рефлексов у самцов.

Также было изучено влияние введенного в состав основного рациона препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на уровень тестостерона в крови баранов-производителей.

Материалы, отражающие результаты исследований по динамике тестостерона в крови приведены в таблице 3.10.

Таблица 3.10. Количество тестостерона в крови баранов-производителей опытных групп

Показатели	Контрольная группа		I группа – опытная (ZooBioR-1)		II группа – опытная (ZooBioR-2)	
	Начало	Конец	Начало	Конец	Начало	Конец
Тестостерон (ng/ml)	4,2±0,2	4,2±0,3	4,0±0,1	5,2±0,4*	4,3±0,4	6,0±0,1*

*P≤0,05

Полученные результаты исследований демонстрируют наличие у подопытных баранов-производителей ответных реакций гипофиза, четкой и относительно стабильной реакции семенников на скормливание препаратов ZooBioR-1 и ZooBioR-2.

Концентрация тестостерона в крови, за период проведения опыта от начала к концу эксперимента, возросла и составила в среднем в первой опытной группе 5,2±0,4 ng/ml, во второй - 6,0±0,1 ng/ml. Общее количество тестостерона в крови баранов-производителей контрольной группы было в среднем 4,2±0,3 ng/ml.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод, что применение препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2 для стимуляции сперматогенеза баранов-производителей в неслучной сезон ведет к достоверному повышению показателей спермопродукции.

Эффективность селекционно-племенной работы и результаты искусственного осеменения зависят не только от племенной ценности, но и от воспроизводительной способности производителя (Понуровский А. А. 2014, Самусенко Л.Д. 2019).

В задачу наших собственных исследований входило повышение эффективности использования племенных баранов-производителей на протяжении всего года путем накопления и хранения спермы в замороженном состоянии ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

В результате исследований экспериментальным путем выявлено влияние биологически активных препаратов (ZooBioR-1 и ZooBioR-2) на качественные показатели спермы и пригодность ее к замораживанию. На рисунке 3.11 представлены данные количества подвижных сперматозоидов в образцах замороженной спермы. Оттаивание проводили при $+42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

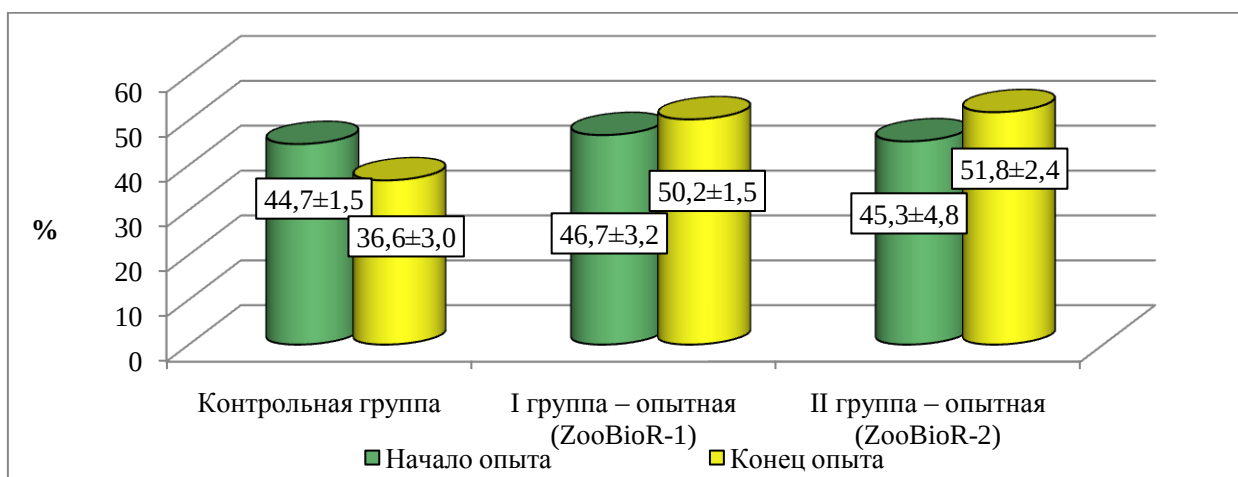


Рис. 3.11. Процент подвижных сперматозоидов после оттаивания в начале и в конце опыта (n=24), %

Согласно полученным результатам, приведенным на рисунке 3.11, процент живых сперматозоидов в пробах размороженной спермы при $+40-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ в первой группе животных возрос на 3,5 пункта за период проведения опыта по сравнению с предшествующим периодом (46,7±3,2% против 50,2±1,5%).

Во второй опытной группе процент живых сперматозоидов вырос на 6,5% процентных пункта за период проведения опыта по сравнению с предшествующим периодом, т. е. с 45,3±4,8% до 51,8±2,4%.

В контрольной группе подвижность сперматозоидов за период опыта снизилась на 8,1% или с 44,7±1,5 до 36,6±3,0%.

На рисунке 3.12 представлены показатели сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в образцах заморожено-оттаянной спермы. Оттаивание проводили при + 42 °С.

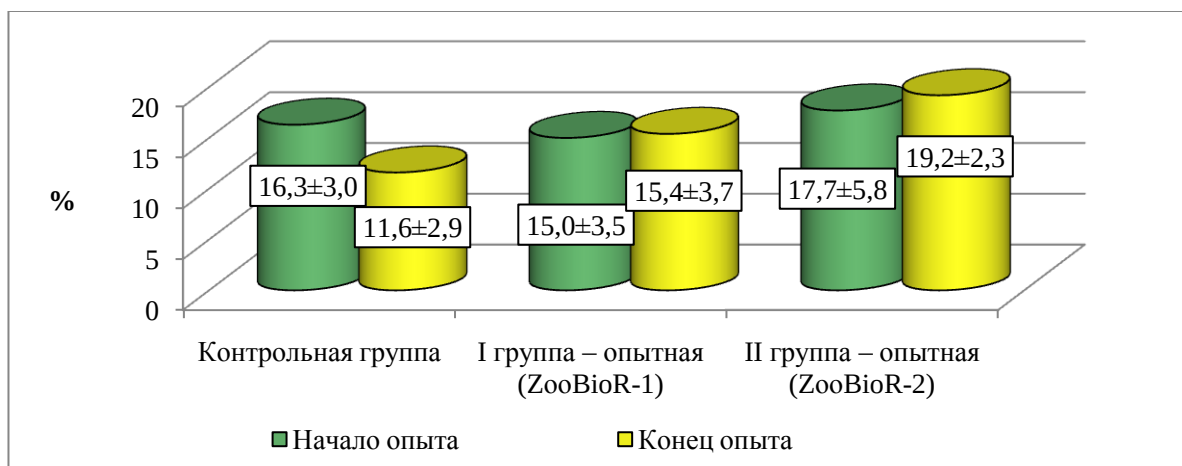


Рис. 3.12. Процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после оттаивания в начале и в конце опыта (n=24), %

Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в неслучной сезон в начале опыта составило 15,0±3,5% в первой опытной группе и 17,7±5,8% во второй опытной группе. В контрольной группе этот показатель был равен 16,3±3,0%.

За период проведения опыта процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением во второй опытной группе вырос с 17,7±5,8 до 19,2±2,3. В первой опытной группе этот показатель практически остался на том же уровне, а в контрольной группе он снизился с 16,3±3,0 до 11,6±2,9%.

В период проведения опыта было изучено влияние препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на показатели скорости движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL).

Экспериментальные данные по изучению влияния препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на скорость движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL) в начале и конце опыта представлены на рисунках 3.13 и 3.14.

Согласно результатам, приведенным на рисунке 3.13 в период, предшествующий проведению эксперимента, средняя скорость движения (VAP) сперматозоидов баранов-производителей в исследуемых пробах первой экспериментальной группы была на 0,3µm/s ниже, чем в контрольной группе, VSL на 1,2 µm/s и VCL на 15,6 µm/s. ниже показателей контрольной группы.

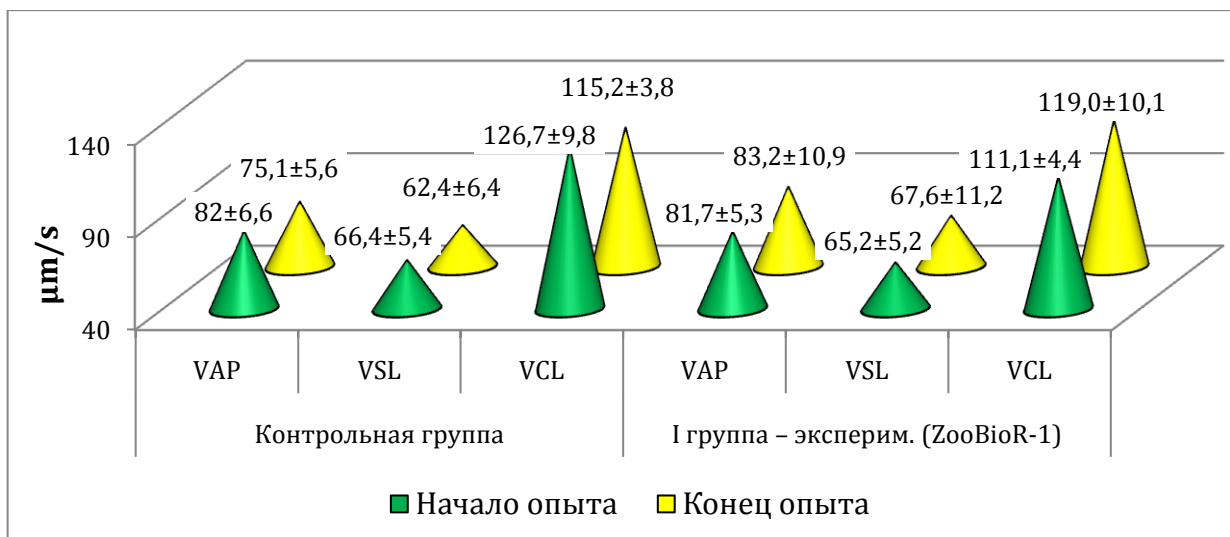


Рис. 3.13. Скорость движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL) после оттаивания (ZooBioR-1), (n=17), µm/s.

В период проведения эксперимента значение показателей скорости сперматозоида (VAP) в группе, где проводилось скормливание препарата ZooBioR-1 составило $83,2 \pm 10,9$ µm/s, что на $8,1$ µm/s выше, чем в контрольной группе, VSL выше на $5,2$ µm/s и VCL на $3,8$ µm/s, в сравнении с контрольной группой.

Данные скорости движения сперматозоидов во второй опытной группы VAP, VSL, VCL в конце эксперимента представлены на рисунке 3.14.

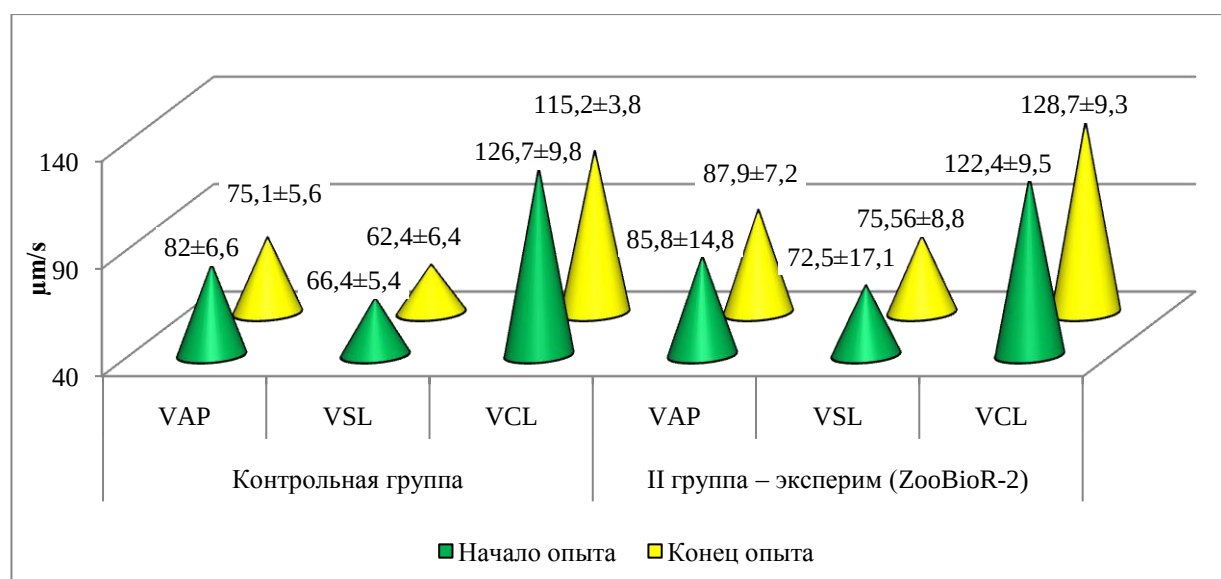


Рис. 3.14. Скорость движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL) после оттаивания (ZooBioR-2), (n=17), µm/s

Согласно результатам, представленным на рисунке 3.14 при анализе скорости движения сперматозоидов (VAP) получены следующие результаты: VAP в опытной группе была равна $85,8 \pm 14,8 \text{ } \mu\text{m/s}$, что на $3,8 \text{ } \mu\text{m/s}$ выше, чем в контрольной группе в начале эксперимента, VSL на $6,1 \text{ } \mu\text{m/s}$ выше и VCL на $4,3 \text{ } \mu\text{m/s}$ ниже показателей контрольной группы.

В период проведения эксперимента, после 50 дней кормления баранов-производителей ZooBioR-2 по 5 г на голову в сутки, значение показателей скорости сперматозоидов VAP составило $87,9 \pm 7,2 \text{ } \mu\text{m/s}$, что на $12,8 \text{ } \mu\text{m/s}$ выше, чем было в контрольной группе животных. Скорость движения сперматозоидов VSL в опытной группе была на уровне $75,56 \pm 8,8 \text{ } \mu\text{m/s}$, что на $13,2 \text{ } \mu\text{m/s}$ превышает показатели контрольной группы, а показатель VCL составил $128,7 \pm 9,3 \text{ } \mu\text{m/s}$, что на $13,5 \text{ } \mu\text{m/s}$ выше контроля.

Данные положительных изменений скорости движения сперматозоидов в конце эксперимента указывают на благотворное влияние ZooBioR-1 и ZooBioR-2 на организм животных.

4. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ И ИХ ОПЛОДОТВОРЯЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ

4.1. Разработка метода длительного хранения спермы барана в замороженном виде

Результаты первых опытов по длительному хранению спермы барана в замороженном виде побудили ученых заняться выяснением конкретных причин резкого снижения выживаемости и оплодотворяющей способности сперматозоидов и разработкой более совершенного способа замораживания спермы данного вида животных.

Главное внимание в исследованиях Милованова В.К. (1962), Попетко М.И. (1971), Озтерклер Йи. (2017), Saha A. (2022) уделялось изначально наилучшим разбавителям и определению оптимального режима охлаждения в различных температурных диапазонах. Часть работ была посвящена изучению биохимии и физиологии замороженного семени, а также выяснению причин гибели сперматозоидов в процессе глубокого охлаждения. Авторы также изучали выживаемость замороженного семени вне организма и в половом тракте овец, определяли его оплодотворяющую способность при цервикальном и внутритрубно осеменении, выясняли жизнеспособность развивающихся зародышей и полученного в результате оплодотворения приплода.

Результаты проведенных экспериментов показали, что снижение выживаемости и оплодотворяющей способности замороженного семени происходит из-за разрушения ферментных систем, обеспечивающих нормальное осуществление метаболических процессов. Особенно красноречивыми оказались результаты биологической проверки замороженного семени барана. В одних опытах оплодотворяемость овец, осемененных замороженной спермой, даже при трехкратном его введении на протяжении охоты не превышала 30% и колебалась, как правило, в пределах 12-18%. В то же время, по данным других исследователей, этот показатель и при обычном двукратном осеменении достигал 62-67% (Айбазов М.М. 2017).

Для увеличения сроков выживаемости сперматозоидов и сохранения их оплодотворяющей способности требуется снижение метаболических процессов сперматозоидов во время их хранения.

С этой целью в наших опытах испытывали среду ГЦЖ (глюкозо-цитратно-желточную), предохраняющую сперматозоиды от преждевременного повреждения внешними факторами или разрушения их в ходе интенсивного метаболизма.

В ходе предварительной оценки испытываемой среды выяснилось ее отрицательное действие на физиологическое состояние сперматозоидов. После эквilibрации разбавленной спермы произошло незначительное снижение ее жизнеспособности (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Подвижность сперматозоидов на разных этапах технологической обработки, %

Показатели	Статистические параметры, n=46				
	M±m	σ	Cv%	Vmin	Vmax
Свежеразбавленная	83,2±1,02	6,93	8,33	68	97
После охлаждения	81,0±0,94	6,38	7,88	64	93
После оттаивания	36,8±0,98	6,66	18,11	13	48

Из представленных в таблице 4.1 результатов следует, что подвижность сперматозоидов в свежеразбавленном эякуляте с использованием ГЦЖ среды соответствовала 83,2±1,02%, с колебаниями от 68 до 97%, после охлаждения - 81,0±0,94%, с колебаниями от 64 до 93%. После замораживания-оттаивания спермы баранов-производителей, подвижность сперматозоидов составила в среднем 36,8±0,98% с колебаниями от 13 до 48%, где коэффициент вариабельности был средний и составил 18,11%.

Результаты данных опыта по изучению процента сперматозоидов с прямолинейно-поступательными движениями после замораживания-оттаивания спермы баранов-производителей, разбавленной ГЦЖ средой отражены в таблице 4.2.

Таблица 4.2. Сперматозоиды с прямолинейно-поступательным движением на разных этапах технологической обработки, %

Показатели	Статистические параметры, n=46				
	M±m	σ	Cv%	Vmin	Vmax
Свежеразбавленная	40,8±0,88	5,95	14,59	29	56
После охлаждения	38,6±0,83	5,60	14,51	25	51
После оттаивания	17,8±0,90	6,31	35,49	10	36

Из данных таблицы видно, что в процессе технологической обработки семени баранов-производителей, разбавленного ГЦЖ средой, процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением снижается с 40,8±0,88%, в свежеразбавленном семени - до 17,8 ± 0,9% в оттаянном семени или на 23%. Это приводит к снижению количества биологически полноценных сперматозоидов, которые участвуют в процессе оплодотворения яйцеклеток и в итоге, влияет на снижение эффективности искусственного осеменения овец.

Определяли показатели скорости движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL), которые показывают уровень энергетических ресурсов сперматозоидов и позволяют условно определить насколько быстро сперматозоид может приблизиться к месту оплодотворения яйцеклетки.

Результаты изучения средней скорости движения головки по усредненной траектории (VAP) представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3. Скорость движения сперматозоидов VAP на разных этапах технологической обработки, μm/s

Показатели	Статистические параметры, n=46				
	M±m	σ	Cv%	Vmin	Vmax
Свежеразбавленная	119,8±2,57	17,43	14,56	91,1	183,7
После охлаждения	111,1±2,48	16,84	15,16	79,1	170,3
После оттаивания	82,5±3,0	20,42	24,74	57,2	139,9

Данные исследований, представленные в таблице 4.3, показывают, что VAP в процессе технологической обработки, разбавленной ГЦЖ средой, после разбавления семени, составила 119,8±2,57 μm/s с колебаниями от 91,1 до 183,7 μm/s. После

замораживания-оттаивания спермы, данный показатель снизился и достиг значения $82,5 \pm 3,0 \text{ } \mu\text{m/s}$ с колебаниями от $57,2 \text{ } \mu\text{m/s}$ до $139,9 \text{ } \mu\text{m/s}$.

Снижение скорости движения сперматозоидов (VAP) в процессе технологической обработки спермы может быть связано со снижением энергетических ресурсов сперматозоидов, что приводит к снижению метаболизма. Поэтому, в следующих опытах, при технологической обработке эякулята, исследовали усредненную по времени скорость движения сперматозоидов вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точкой траектории (VSL). Результаты эксперимента представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4. Скорость движения сперматозоидов VSL на разных этапах технологической обработки, $\mu\text{m/s}$

Показатели	Статистические параметры, n=46				
	M $\pm$ m	σ	Cv%	Vmin	Vmax
Свежеразбавленная	96,7 $\pm$ 2,33	15,80	16,34	71,1	149,2
После охлаждения	85,6 $\pm$ 1,82	12,33	14,40	60,1	118,3
После оттаивания	68,5 $\pm$ 2,60	17,82	26,02	42,6	105,5

Приведенные в таблице 4.4 результаты свидетельствуют о том, что в свежеразбавленном семени сперматозоиды имели скорость движения $96,7 \pm 2,33 \text{ } \mu\text{m/s}$ с колебанием от $71,1 \text{ } \mu\text{m/s}$ до $149,2 \text{ } \mu\text{m/s}$. После замораживания-оттаивания скорость движения сперматозоидов VSL снизилась и составила в среднем $68,5 \pm 2,6 \text{ } \mu\text{m/s}$ с колебанием от $42,6 \text{ } \mu\text{m/s}$ до $105,5 \text{ } \mu\text{m/s}$. Этот показатель может влиять на оплодотворяемость овцематок при искусственном осеменении заморожено-оттаянной спермой.

Одновременно, изучали и скорость движения сперматозоидов VCL расстояние и скорость перемещения по всей траектории движения. Экспериментальные данные проведенных исследований представлены в таблице 4.5.

Таблица 4.5. Скорость движения сперматозоидов VCL на разных этапах технологической обработки, $\mu\text{m/s}$

Показатели	Статистические параметры, n=46				
	M $\pm$ m	σ	Cv%	Vmin	Vmax
Свежеразбавленная	179,6 $\pm$ 3,66	24,84	13,83	131,1	230,4
После охлаждения	163,4 $\pm$ 3,26	22,11	13,53	102,5	215,4
После оттаивания	122,0 $\pm$ 4,30	29,08	23,84	86,8	209,8

Скорость движения сперматозоидов (VCL) в свежеразбавленном семени составила $179,6 \pm 3,66 \text{ } \mu\text{m/s}$, а после оттаивания она снизилась и достигла $122,0 \pm 4,3 \text{ } \mu\text{m/s}$. Разница в скорости движения сперматозоидов между свежеразбавленной и оттаянной спермой составила $57,6 \text{ } \mu\text{m/s}$ (таблица 4.5).

Однако, за период технологической обработки (разбавление, охлаждение, замораживание и оттаивание) спермы более заметно снижение скорости движения VCL сперматозоидов по сравнению с VAP и VSL формами движения сперматозоидов. Значительное снижение скорости движения сперматозоидов проходило только после замораживания-оттаивания спермы, что отчетливо видно из данных представленных в таблице 3.5.

Резкое снижение скорости движения сперматозоидов после замораживания-оттаивания является показателем низкого качества среды, применяемой для замораживания спермы баранов-производителей.

4.2. Изучение защитного влияния препарата BioR в составе среды для разбавления и замораживания спермы баранов

В последние годы проводятся интенсивные исследования по совершенствованию синтетических сред для длительного хранения спермы баранов-производителей с целью повышения ее биологической полноценности и оплодотворяющей способности. Поэтому, в задачу наших исследований входило усовершенствование среды для замораживания спермы баранов-производителей с применением различных соединений.

Было исследовано защитное влияние препарата BioR, синтезированного в Институте микробиологии и биотехнологии, в целях совершенствования синтетических сред для замораживания-оттаивания спермы баранов-производителей. В соответствии с характеристиками, данный препарат (BioR) обладает антиоксидантным действием, стабилизирует клеточные и лизосомные мембраны путем нормализации обмена глутатиона (Rudic V. 1995). В наших опытах, препарат вводили в состав синтетической среды ГЦЖ, как дополнительный компонент от 0,1 до 1,0 %/V. Из анализа литературных данных становится очевидным, что проявленные эффекты BioR многогранны, поэтому, вполне обоснован интерес к его изучению в области криоконсервирования спермы баранов-производителей.

Динамика подвижности сперматозоидов в процессе технологической обработки спермы с применением для разбавления среды ГЦЖ, в состав которой был введен препарат BioR, представлены в таблице 4.6 (Bradu N. 2019).

**Таблица 4.6. Влияние препарата BioR на показатели подвижности сперматозоидов
(n=12), %**

Параметры			После разбавления	После охлаждения	После оттаивания	
Контроль ГЦЖ			88,7±2,8	83,0±3,5	30,5±4,5	
Опытные группы	1	Концентрация BioR (%) в среде ГЦЖ	0,1	85,3±5,2	81,3±9,3	47,0±15,0
	2		0,2	88,0±1,7	85,3±5,2	49,0±5,5
	3		0,3	84,0±9,5	84,3±6,8	36,3±9,1
	4		0,4	92,3±1,9	87,7±4,5	41,0±5,0
	5		0,5	83,7±6,4	84,3±7,2	48,0±7,0
	6		0,6	88,7±3,7	84,3±7,2	62,0±2,9**
	7		0,7	91,0±1,7	89,7±1,8	55,0±8,0
	8		0,8	85,0±5,6	85,7±5,9	53,3±4,5*
	9		0,9	90,7±1,8	87,0±4,5	57,0±8,0
	10		1,0	87,3±8.2	83.0±6.0	60.0±2.6*

*P≤0,05; **P≤0,01 (по сравнению с контролем)

Представленные в таблице 4.6 результаты свидетельствуют, что после разбавления спермы средой ГЦЖ, в состав которой дополнительно вводили препарат BioR в концентрации от 0,1 до 1,0 %/V, подвижность сперматозоидов как в контрольной группе, так и в опытных группах была практически одинакова от 83,7±6,4 до 92,3 ±1,9. Разница в подвижности сперматозоидов между контрольной группой и опытной статистически недостоверна. Полученные результаты соответствуют показателям нормы, разбавленная сперма характеризуется как сперма высокого качества, а препарат BioR не является токсичным для сперматозоидов в пределах испытываемых концентраций.

Самые высокие показатели подвижности сперматозоидов после замораживания-оттаивания получены в опытной группе, где сперму разбавляли ГЦЖ-средой в состав которой дополнительно вводили 0,6% BioR - 62,0±2,9 (P≤0,01 по сравнению с контролем), а также достоверная разница (P≤0,05) была получена после замораживания-оттаивания в 8 и 10-ой опытных группах.

Процент живых сперматозоидов во всех вариантах опыта, где сперму разбавляли ГЦЖ-средой, в состав которой в качестве дополнительного компонента, вводился препарат BioR от 0,1 до 1,0 %/V, остается довольно высоким после разбавления спермы (таблица 4.7).

Анализ данных таблицы показал, что разница в подвижности сперматозоидов после разбавления спермы между опытными группами и контрольной группой статистически недостоверна.

Таблица 4.7. Влияние препарата BioR на процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (n=12), %

Параметры			После разбавления	После охлаждения	После оттаивания	
Контроль ГЦЖ			46,7±5,5	39,3±4,4	10,0±2,0	
Опытные группы	1	Концентрация BioR (%) в среде ГЦЖ	0,1	56,7±8,1	45,0±6,5	21,0±11,0
	2		0,2	42,7±7,8	36,7±3,0	20,0±3,1
	3		0,3	45,7±8,4	40,3±6,8	16,7±7,2
	4		0,4	52,7±7,6	48,7±2,7	14,3±5,0
	5		0,5	43,3±1,2	42,0±4,0	20,5±3,5
	6		0,6	46,7±6,1	42,0±4,0	34,0±5,0*
	7		0,7	48,0±5,5	41,7±1,9	26,0±1,0**
	8		0,8	47,7±8,3	39,0±4,0	23,0±2,5*
	9		0,9	50,3±0,9	46,3±10,4	22,0±2,0*
	10		1,0	45,3±9,7	42,0±3,5	30,0±6,0

*P≤0,05; **P≤0,01 (по сравнению с контролем)

Подвижность сперматозоидов в зависимости от количества вводимого в среду препарата BioR варьировала от 43,3±1,2 до 56,7±8,1% в опытных группах, тогда как в контроле этот показатель в среднем составил 46,7±5,5%.

В процессе эквilibрации спермы при +2 - +4 °С происходило снижение процента живых сперматозоидов с прямолинейно-поступательным и движениями. Однако, между процентом живых сперматозоидов с прямолинейно-поступательными движениями в опытных группах, по сравнению с контрольной группой, разница статистически недостоверна.

После замораживания-оттаивания как в опытных группах, так и в контроле произошло дальнейшее снижение процента сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением. Наивысший процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением был получен в 6, 7 и 8-ой опытных группах – 34,0±5,0%, 26,0±1,0%, 23,0±2,5% соответственно (P≤0,05) по сравнению с контрольной группой, где данный показатель составил всего 10,0±2,0%

В следующей серии опытов было изучено влияние препарата BioR, вводимого как дополнительный компонент в среду ГЦЖ, на подвижность сперматозоидов после оттаивания при +37 °С. Экспериментальные данные и полученные результаты представлены в таблице 4.8.

**Таблица 4.8. Влияние препарата BioR на динамику подвижности сперматозоидов
после оттаивания (n=12), %**

Параметры			После оттаивания	Подвижность через:					
				1 час	2 часа	3 часа	4 часа	5 часов	
Контроль ГЦЖ			30,5±4,5	29,0±3,2	25,5±1,3	24,7±2,6	118,0±1,5	15,3±1,9	
Опытные группы	1	Концентрация BioR (%) в среде ГЦЖ	0,1	47,0±15,0	38,5±6,8	42,0±4,7	36,0±4,5	20,7±4,8	20,0±4,5
	2		0,2	49,0±5,5	42,8±2,8	40,8±2,3	40,0±3,0	26,0±3,1	19,3±1,8
	3		0,3	36,3±9,1	33,0±3,1	33,3±3,0	33,0±4,5	32,7±4,2	29,0±3,1
	4		0,4	41,0±5,0	39,5±3,9	38,5±3,4	37,0±6,9	33,0±6,0	29,7±4,3
	5		0,5	48,0±7,0	40,5±3,9	39,8±4,1	36,7±0,9*	34,3±2,0*	25,3±2,7
	6		0,6	62,0±2,9**	51,0±2,6*	48,8±2,1*	45,0±2,1*	41,7±2,7*	31,3±3,0*
	7		0,7	55,0±8,0	48,5±2,6*	46,3±3,4*	46,0±6,1	40,7±5,4	28,0±1,5*
	8		0,8	53,3±4,5*	48,3±3,1	46,5±3,0*	45,7±5,2	38,0±4,5	27,0±4,2
	9		0,9	57,0±8,0	50,0±4,9*	48,0±2,9*	41,3±0,7*	28,3±2,7	25,3±2,9
	10		1,0	60,0±2,6*	53,3±1,4*	47,3±2,6*	40,7±1,2*	39,7±7,9	28,7±7,9

*P≤0,5; **P≤0,01 (по сравнению с контролем)

Полученные результаты исследований свидетельствуют, что при сохранение оттаянной спермы при температуре +37 °С происходит постепенное снижение ее активности. Так, после 5 часов хранения при температуре +37 °С в 6 и 7 вариантах опыта подвижность сперматозоидов сохранилась выше на достоверную разницу (P≤0,5) по сравнению с контролем. Добавление в состав основной среды ГЦЖ препарата BioR в количестве 0,6-0,7%/V, защищает сперматозоиды от перекисного окисления липидов мембран под действием свободных радикалов, которые “рождаются” в клеточных митохондриях. Свободные радикалы представляют собой аномальные атомы, которые имеют как минимум один непарный электрон, что обуславливает их свойства вызывать окислительные процессы, которые приводят к накоплению отходов жизнедеятельности клеток и становятся вредными для сперматозоидов. Эти отходы, по всей вероятности, способны на молекулярном уровне серьезно повреждать клетки за счет своих окислительных свойств.

Результаты изучения динамики изменения процента сперматозоидов с прямолинейно-поступательными движениями после оттаивания при использовании в составе ГЦЖ среды препарата BioR представлены в таблице 4.9.

Таблица 4.9. Влияние препарата BioR на динамику подвижности сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после замораживания-оттаивания (n=12), %

BioR			После оттаивания	Подвижность через:				
				1 час	2 часа	3 часа	4 часа	5 часов
Контроль ГЦЖ			10,0±2,0	10,0±1,1	9,5±1,0	9,0±0,6	7,3±1,2	6,3±0,9
Опытные группы	1	0,1	21,0±11,0	13,3±2,9	12,8±2,5	11,7±1,5	9,3±1,2	8,7±0,9
	2	0,2	20,0±3,1	16,8±1,8	16,5±3,6	10,7±0,3	9,0±1,0	8,3±0,9
	3	0,3	16,7±7,2	14,0±2,0	12,0±1,8	10,7±2,2	10,0±1,5	9,0±0,6
	4	0,4	14,3±5,0	14,0±2,9	14,0±2,5	13,0±5,2	13,3±1,9	10,7±2,2
	5	0,5	20,5±3,5	18,3±0,9*	16,3±1,6	13,7±1,2	11,0±0,6	10,3±0,3
	6	0,6	34,0±5,0*	24,8±2,5*	22,0±0,8*	19,7±0,9*	19,3±1,2*	13,7±2,3
	7	0,7	26,0±1,0*	20,5±1,3	21,0±1,9*	18,3±2,8	18,3±3,3	13,0±1,5
	8	0,8	23,0±2,5*	18,8±0,8*	20,0±2,3	17,7±3,2	16,0±3,2	13,3±3,5
	9	0,9	22,0±2,0*	19,8±1,8*	18,0±2,1	17,7±1,3*	13,7±3,8	9,7±3,9
	10	1,0	30,0±6,0	20,0±2,4	16,8±1,7	14,3±0,9*	16,7±5,2	9,0±1,0

*P≤0,05

Приведенные в таблице 4.9 результаты исследований свидетельствуют о том, что процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после разбавления и замораживания-оттаивания в опытных группах при разбавлении средой с добавлением препарата BioR показал положительное влияние препарата на выживаемость сперматозоидов, сохраненных при +37 °С. Лучшие результаты, были получены, когда в состав среды ГЦЖ вводили препарат BioR в количестве 0,6; 0,7 и 0,8%/V. После 5 часов хранения оттаянной спермы при +37 °С, подвижность сперматозоидов составила: наивысший процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательными движениями был выявлен в 6 - 7 и 8 - ой группах опыта, где в состав среды вводили 0,6; 0,7 и 0,8%/V препарата BioR – 13,7±2,3; 13,0±1,5 и 13,3±3,5 соответственно. Разница по сравнению с контрольной группой составила 7,4; 6,7 и 7,0 процентных пункта соответственно.

Используя метод оценки акросомы, выявлено, что в оттаянной сперме значительное число сперматозоидов имеют различные степени структурных повреждений, характеризующихся набуханием, отслоением и разрывами поверхностных мембран, особенно в области акросомы (Ramalho-Santos J. 2002). Экспериментальные данные по влиянию сохранности целостности акросомы в процессе технологической обработки семени приведены на рисунке 4.1.

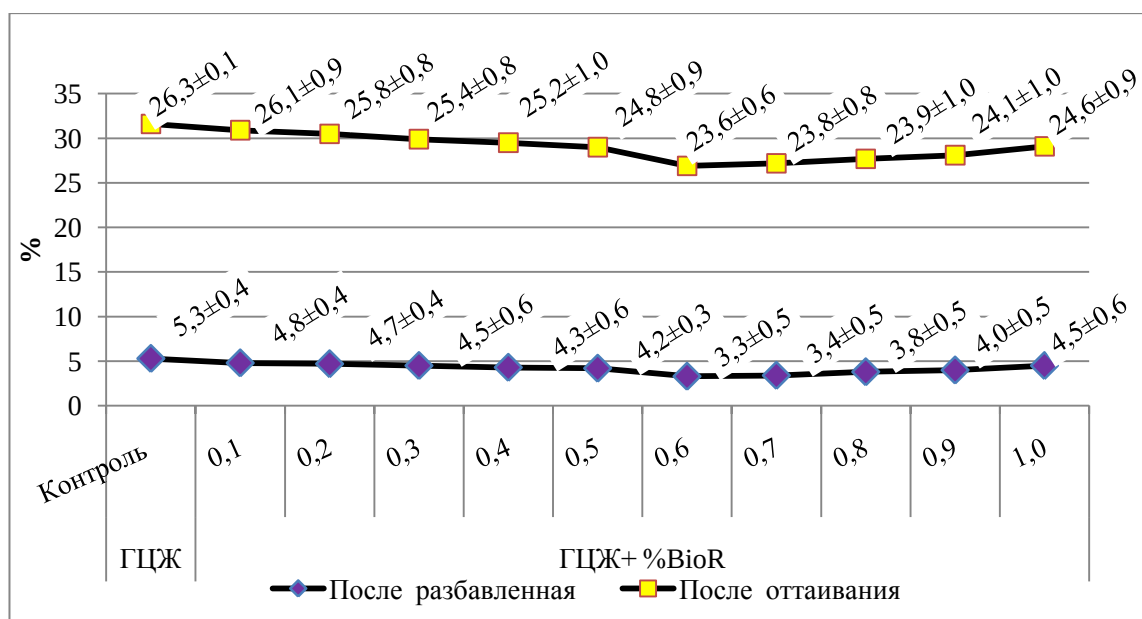


Рис. 4.1. Влияние BioR на динамику сохранности акросомы (n=12), %

Полученные результаты доказывают, что существенные структурные повреждения в сперматозоидах наступают уже в процессе технологической обработки, то есть перед замораживанием. Так, если в свежеразбавленной сперме лишь до 5% сперматозоидов имели те или иные нарушения биомембраны, то после разбавления этот показатель несколько увеличился. После замораживания-оттаивания увеличился до 24-26% сперматозоидов, в то время как подвижность сперматозоидов после эквilibрации практически не уступила подвижности после разбавления. В еще большей степени структурные повреждения акросомы сперматозоидов проявились после замораживания-оттаивания, так как выявлено, что в оттаянной сперме лишь от 23% до 26% сперматозоидов имели видимые структурные повреждения биомембраны. Это свидетельствует о том, что морфологические изменения акросомы имели место не только в опытных вариантах, где сперму разбавляли синтетической средой ГЦЖ, в состав которой включали как дополнительный компонент препарат BioR, но и в контрольном варианте, где препарат BioR не применялся. Однако следует отметить, что относительно лучше сохранялась целостность акросомы на ранних этапах технологической обработки спермы, когда в состав ГЦЖ среды вводили дополнительно 0,6-0,7% препарата BioR (23,6±0,6 - 23,8±0,8% соответственно).

Криоконсервация семенного материала и искусственное осеменение являются важнейшими элементами вспомогательных репродуктивных технологий. Создание криобанка биоматериала, полученного от высокоценных производителей, может

обеспечить получение максимально-возможного количества потомков. Эта технология позволяет более эффективно использовать имеющийся генетический материал, сохранять и восстанавливать численность редких и исчезающих видов, пород животных (Назаров М.В. 2018).

Сперматозоиды служат наиболее распространенным биоматериалом, используемым в программах по сохранению и восстановлению генетических ресурсов домашних животных, что связано с доступностью и легкостью получения спермы. Одна из причин низкой эффективности использования заморожено-оттаянного семени, полученного от баранов-производителей, является гибель значительной части сперматозоидов после замораживания-оттаивания нарушения, а также повреждение их отдельных сегментов. Эти нарушения в процессе технологической обработки спермы баранов-производителей остаются малоизученными.

Целью наших исследований была оценка влияния препарата BioR в процессе замораживания и оттаивания спермы на морфологические параметры сперматозоидов баранов-производителей. Экспериментальные данные и их результаты представлены в таблице 4.10.

Таблица 4.10. Влияние препарата BioR на морфологические показатели сперматозоидов (n=12), %

Показатели			После разбавления:			После оттаивания:			
			Головка	Шея	Хвост	Головка	Шея	Хвост	
Контроль ГЦЖ			4,6±0,29	4,9±0,37	5,7±0,37	5,0±0,45	9,7±0,2	10,5±0,71	
Опытные группы	1	Концентрация BioR (%) в среде ГЦЖ	0,1	3,6±0,29	4,0±0,27	5,1±0,9	4,3±0,25	9,3±0,25	10,2±0,72
	2		0,2	3,5±0,39	4,0±0,39	4,4±0,29	4,0±0,32	8,7±0,34	11,9±1,6
	3		0,3	3,4±0,4	4,1±0,33	4,7±0,34	3,9±0,19	8,9±0,19*	9,8±0,34
	4		0,4	3,3±0,44	4,0±0,27	4,2±0,34*	3,4±0,19*	8,6±0,19*	9,2±0,25
	5		0,5	3,0±0,35*	4,0±0,16	4,5±0,22*	3,2±0,25*	8,3±0,2*	8,9±0,29
	6		0,6	2,6±0,29**	4,0±0,22	4,1±0,29*	2,8±0,2*	7,9±0,24**	8,3±0,25*
	7		0,7	2,6±0,19**	4,0±0,16	4,5±0,16*	2,8±0,2*	8,0±0,16**	8,4±0,33
	8		0,8	2,8±0,25**	4,1±0,29	4,6±0,48	3,0±0,16*	8,1±0,29**	8,5±0,32
	9		0,9	3,0±0,16**	4,2±0,25	4,8±0,3	3,3±0,34*	8,6±0,19*	9,1±0,24
	10		1,0	3,1±0,19*	4,3±0,37	5,0±0,35	3,4±0,37	9,0±0,16	9,4±0,33

*P≤0,05; **P≤0,01 (по сравнению с контролем)

Полученные данные свидетельствуют, что в процессе замораживания и оттаивания семени происходит увеличение процента сперматозоидов с различными морфологическими изменениями.

При разбавлении спермы средой, в состав которой вводили препарат BioR в

концентрации от 0,1 до 1,0%, процент сперматозоидов с аномалиями головки был ниже на достоверную разницу ($P \leq 0,01$) в 6, 7, 8 и 9 опытных пробах по сравнению с контрольной группой. На достоверную разницу ($P \leq 0,05$) уменьшилось количество сперматозоидов с морфологическими аномалиями головки после оттаивания спермы в 4, 5, 6, 7, 8 и 9 опытных группах по сравнению с контролем. Аналогичные изменения произошли и в хвостовом сегменте сперматозоидов.

После разбавления семени средами, в состав которых был введен как дополнительный компонент препарат BioR, установлено снижение на достоверную разницу ($P \leq 0,05$) процента сперматозоидов с аномалиями хвостового сегмента сперматозоидов в 4, 5, 6 и 7 опытных группах по сравнению с контрольной группой. В сегменте шеи сперматозоида отмечалось нивелирование различий между опытной и контрольной группой.

После замораживания-оттаивания спермы в шейном отделе сперматозоида процент сперматозоидов с аномалиями уменьшился на достоверную разницу ($P \leq 0,01$) в 3-й, 4-й, 5-й и 8-й опытных группах и на более высокую достоверность ($P \leq 0,01$) в 6-й; 7-й и 8-й опытных группах по сравнению с контролем. В сегменте хвоста сперматозоидов после замораживания-оттаивания спермы отмечалось нивелирование между опытными группами опыта и контрольной группой по этим показателям.

Стабилизация биологической полноценности заморожено-оттаянной спермы должна выражаться в разработке защитных сред, которые являются при этом определяющим, хотя и не единственным фактором. Замораживание и оттаивание приводят к снижению скорости разных форм движения сперматозоидов. Скорость движения сперматозоидов в процессе технологической обработки спермы остается малоизученной. В связи с этим были проведены опыты по изучению скорости движения сперматозоидов (VAP, VSL, VCL) под влиянием препарата BioR в процессе разбавления, охлаждения и замораживания-оттаивания спермы баранов-производителей.

Экспериментальные данные, по изучению средней скорости движения головки сперматозоидов по усредненной траектории - VAP представлены в таблице 4.11.

Таблица 4.11. Влияние препарата BioR на скорость движения сперматозоидов VAP (n=12), $\mu\text{m/s}$

Параметры			После разбавления	После охлаждения	После оттаивания
Опытные группы	Контроль ГЦЖ		159,5 $\pm$ 5,5	80,6 $\pm$ 5,1	82,7 $\pm$ 12,3
	1	0,1	134,3 $\pm$ 12,3	107,9 $\pm$ 3,9	89,8 $\pm$ 5,9
	2	0,2	156,4 $\pm$ 23,2	108,1 $\pm$ 4,7	93,9 $\pm$ 8,4
	3	0,3	166,2 $\pm$ 2,5	100,0 $\pm$ 5,8	86,2 $\pm$ 9,5
	4	0,4	154,3 $\pm$ 10,6	92,2 $\pm$ 4,9	88,3 $\pm$ 10,2
	5	0,5	116,2 $\pm$ 7,3	115,6 $\pm$ 5,4	91,7 $\pm$ 0,4
	6	0,6	146,9 $\pm$ 14,4	114,4 $\pm$ 7,9	113,5 $\pm$ 5,6
	7	0,7	109,4 $\pm$ 4,9	108,6 $\pm$ 5,0	91,9 $\pm$ 3,4
	8	0,8	148,8 $\pm$ 10,4	98,9 $\pm$ 5,5	93,7 $\pm$ 8,0
	9	0,9	167,8 $\pm$ 5,0	112,2 $\pm$ 4,0	89,4 $\pm$ 3,0
	10	1,0	138,9 $\pm$ 15,0	107,4 $\pm$ 4,5	105,3 $\pm$ 16,3

Приведенные данные (таблица 4.11) свидетельствуют о том, что препарат BioR оказывает положительное влияние на скорость движения сперматозоидов - VAP в процессе технологической обработки спермы по сравнению с контрольной группой. После разбавления данный показатель в контрольной группе составил 159,5 $\pm$ 5,5 $\mu\text{m/s}$, тогда как в опытных группах скорость движения сперматозоидов колебалась от 166,2 $\pm$ 2,5 до 109,4 $\pm$ 4,9 $\mu\text{m/s}$. После эквilibрации семени при +2- +4 °C скорость движения сперматозоидов по усредненной траектории - VAP снизилась в контрольной группе с 159,5 $\pm$ 5,5 до 80,6 $\pm$ 5,1 $\mu\text{m/s}$ или на 78,9 $\mu\text{m/s}$. В опытных группах также замечено снижение скорости движения сперматозоидов.

Самые большие изменения произошли в 4-й опытной группе, где концентрация BioR в составе ГЦЖ среды составила 0,4 %/V на 62,1 $\mu\text{m/s}$. Наилучшие показатели получены в 5-й опытной группе, где количество препарата BioR в составе ГЦЖ среды было 0,5 %/V и скорость движения -VAP практически не изменилась.

После замораживания-оттаивания спермы произошло дальнейшее снижение показателей VAP, что свидетельствует о снижении энергетических запасов сперматозоидов в результате разрушения целостности мембран.

Усредненная по времени скорость движения сперматозоидов вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точкой траектории - VSL в период проведения эксперимента представлена в таблице 4.12.

Таблица 4.12. Влияние препарата BioR на скорость движения сперматозоидов VSL (n=12), $\mu\text{m/s}$

Параметры			После разбавления	После охлаждения	После оттаивания	
Контроль ГЦЖ			133,2±2,6	61,9±6,6	74,1±15,8	
Опытные группы	1	Концентрация BioR (%) в среде ГЦЖ	0,1	112,6±11,7	87,5±3,5	75,4±6,1
	2		0,2	126,7±19,0	89,7±5,1	78,7±8,4
	3		0,3	139,1±4,9	80,0±5,8	71,8±8,7
	4		0,4	129,5±8,1	76,0±5,7	71,7±12,1
	5		0,5	96,0±4,1	100,2±3,8	78,7±0,3
	6		0,6	123,9±12,3	97,0±6,4	100,4±5,8
	7		0,7	89,1±5,0	87,0±5,0	77,9±4,0
	8		0,8	125,4±9,0	80,0±4,0	80,5±7,6
	9		0,9	140,7±5,0	83,5±5,0	75,7±2,9
	10		1,0	114,2±13,4	89,6±2,9	92,5±17,3

Согласно данным, представленным в таблице 4.12, в период технологической обработки спермы средняя скорость перемещения сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после замораживания-оттаивания была выше в опытных группах по сравнению с контрольной группой. Однако, полученные данные статистически не достоверны.

Были проведены опыты по изучению влияния препарата BioR, вводимого в состав ГЦЖ среды, на показатель скорости движения сперматозоидов VCL – расстояние и скорость перемещения по всей траектории. Экспериментальные данные и их результаты показаны в таблице 4.13.

Таблица 4.13. Влияние препарата BioR на скорость движения сперматозоидов VCL (n=12), $\mu\text{m/s}$

Параметры			После разбавления	После охлаждения	После оттаивания
Контроль ГЦЖ			191,8±6,5	123,2±7,8	123,7±19,4
Опытные группы	1	Концентрация BioR (%) в среде ГЦЖ	0,1	184,9±14,6	157,6±4,5
	2		0,2	208,1±25,7	152,1±2,5
	3		0,3	212,3±9,8	146,4±6,0
	4		0,4	204,5±17,4	141,3±7,7
	5		0,5	166,1±3,1	156,2±8,8
	6		0,6	202,1±22,7	160,9±8,8
	7		0,7	161,4±10,0	155,8±10,0
	8		0,8	200,0±16,4	143,1±7,8
	9		0,9	224,1±9,9	151,9±5,0
	10		1,0	192,2±19,7	151,0±8,5
					138,9±13,6

В период проведения эксперимента, согласно данным, представленным в таблице 4.13 скорость движения сперматозоидов VCL в пробах разбавленной и замороженной в

средах с BioR спермой была выше, чем в пробах спермы, разбавленной и замороженной в ГЦЖ среде без добавления препарата BioR.

После замораживания-оттаивания спермы при анализе скорости движения сперматозоидов VCL были получены следующие результаты: в опытной группе $145,5 \pm 7,2 \mu\text{m/s}$, что на $21,8 \mu\text{m/s}$ выше, чем в контрольной группе. Данное отклонение не является достоверным, так как равняется среднему отклонению значения скорости в данной группе.

Перемена условий окружающей среды постоянно приводит к регуляторным изменениям реакции обмена веществ, задачей которых считается приспособление живых организмов к этим переменам. Эта регуляция обеспечивается благодаря наличию совершенной системы молекулярных механизмов криозащиты клеточных структур, а нарушение работы любого отдела приводит к сбою основного назначения сперматозоидов - оплодотворения яйцеклеток.

За последние 15 лет главное внимание в исследованиях уделялось изысканию наилучших разбавителей и определению оптимального решения режима охлаждения в различных температурных диапазонах. Часть работ была посвящена изучению биологии и физиологии замороженного семени и выявлению причины гибели сперматозоидов в процессе охлаждения. Отдельные авторы изучали вне организма и в половом тракте овец выживаемость замороженного семени, определяли его оплодотворяющую способность при цервикальном и внутритрубно осеменении, а также выясняли жизнеспособность развивающегося зародыша и полученного молодняка. Результаты исследований показали, что снижение выживаемости и оплодотворяющей способности замороженного семени происходит из-за плохой подготовки семени к замораживанию, что приводит к разрушению ферментных систем, обеспечивающих нормальное осуществление метаболических процессов, что в свою очередь, приводит к утрате способности к ресинтезу аденозинполифосфатов при дыхании и гликолизе семенных клеток.

Особенно разноречивыми оказались результаты биологической проверки замороженного семени барана.

Все вышеизложенное показало, что методика замораживания семени барана нуждается в дальнейшем совершенствовании.

С учетом вышеизложенного, был проведен опыт, в котором выявляли влияние периода охлаждения семени при $+2$ - $+4$ °C на качественные показатели после замораживания и оттаивания спермы. Экспериментальные данные по изучению продолжительности периода эквilibрации семени, разбавленного средой ГЦЖ с

препаратом BioR в разных концентрациях и при разных сочетаниях разбавления, представлены на рисунке 4.2 (Браду Н.Г. 2023).

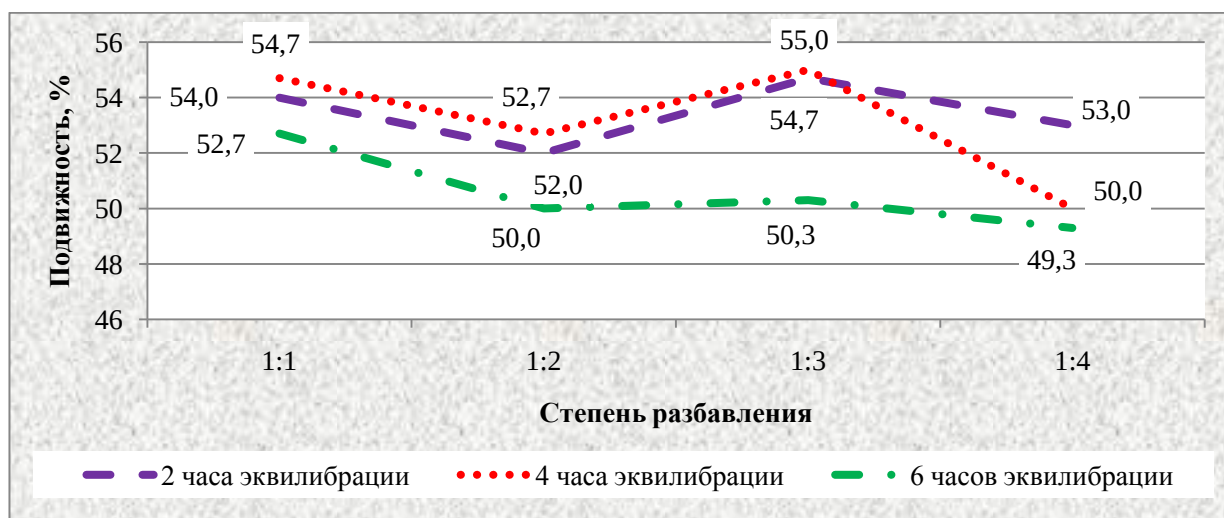


Рис. 4.2. Подвижность сперматозоидов после замораживания-оттаивания в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации (n=12), %

Представленные на рисунке 4.2 результаты свидетельствуют о том, что при охлаждении спермы в течение 6 часов перед замораживанием были получены самые низкие показатели подвижности сперматозоидов после замораживания-оттаивания, независимо от степени разбавления спермы, по сравнению с охлаждением спермы в течение 2-х и 4-х часов перед замораживанием. Так, при степени разбавления спермы 1:1 и периодом охлаждения в течение 6-и часов количество подвижных сперматозоидов после замораживания-оттаивания составило 52,7%, при разбавлении 1:2 составило - 50,0%, при разбавлении 1:3 – 50,3% и при разбавлении 1:4 – 49,3%.

Самые высокие показатели подвижности сперматозоидов после замораживания-оттаивания были получены при степени разбавления 1:3 и периодом охлаждения перед замораживанием в 4 и 2 часа, они составили 54,7% и 55,0% соответственно. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что период эквilibрации спермы, разбавленной ГЦЖ средой, в состав которой как дополнительный компонент добавлен препарат BioR в количестве 6-7%, можно сократить до 2-х часов без потери процента подвижности сперматозоидов по сравнению с классической технологией замораживания спермы, где период охлаждения длится 6 часов.

Данные по изучению динамики процента сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением, которые непосредственно участвуют в оплодотворении яйцеклетки, представлены на рисунке 4.3 (Браду Н.Г. 2023).

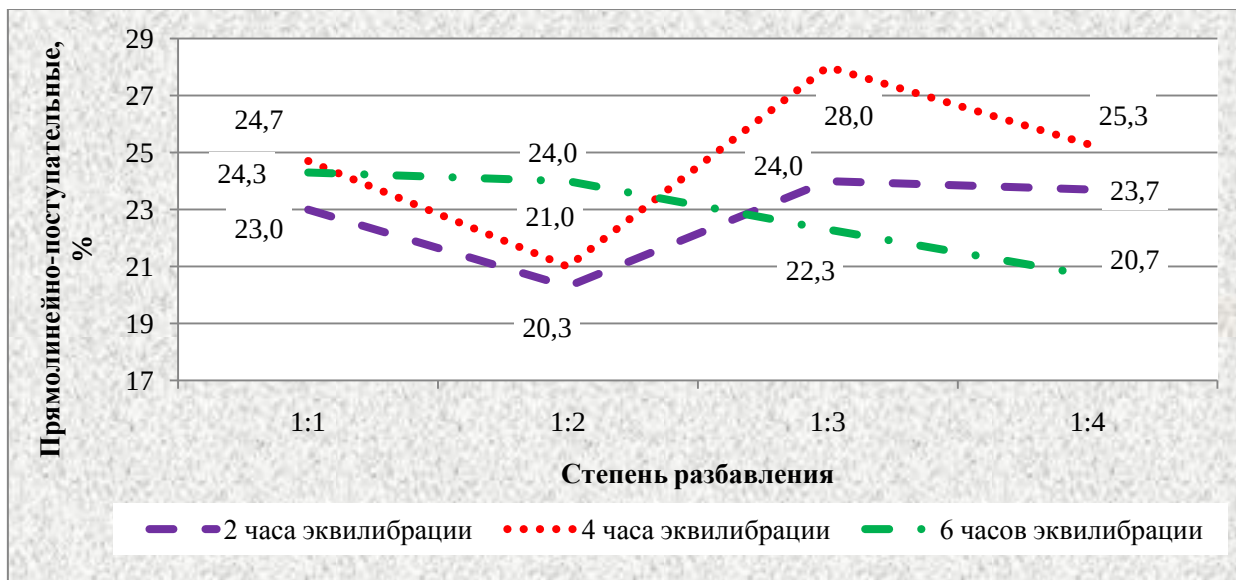


Рис. 4.3. Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после замораживания-оттаивания в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации (n=12), %

Анализируя данные, представленные на рисунке 4.3, можно заключить, что независимо от применяемой среды для разбавления спермы и продолжительности её охлаждения при +2-+4 °C перед замораживанием, степень разбавления влияет на процент сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после замораживания и оттаивания спермы.

Сравнительно лучшие результаты получены при степени разбавления спермы 1:3 и 4-х часах охлаждения перед замораживанием. Однако, полученные экспериментальные данные статистически недостоверны.

Нами также, проведены опыты по изучению скорости движения сперматозоидов – VAP, VSL и VCL, в зависимости от степени разбавления и продолжительности охлаждения разбавленной спермы при +2-+4 °C, после замораживания и оттаивания семени.

Экспериментальные данные по изучению средней скорости движения сперматозоидов по усредненной траектории - VAP после замораживания-оттаивания, представлены на рисунке 4.4.

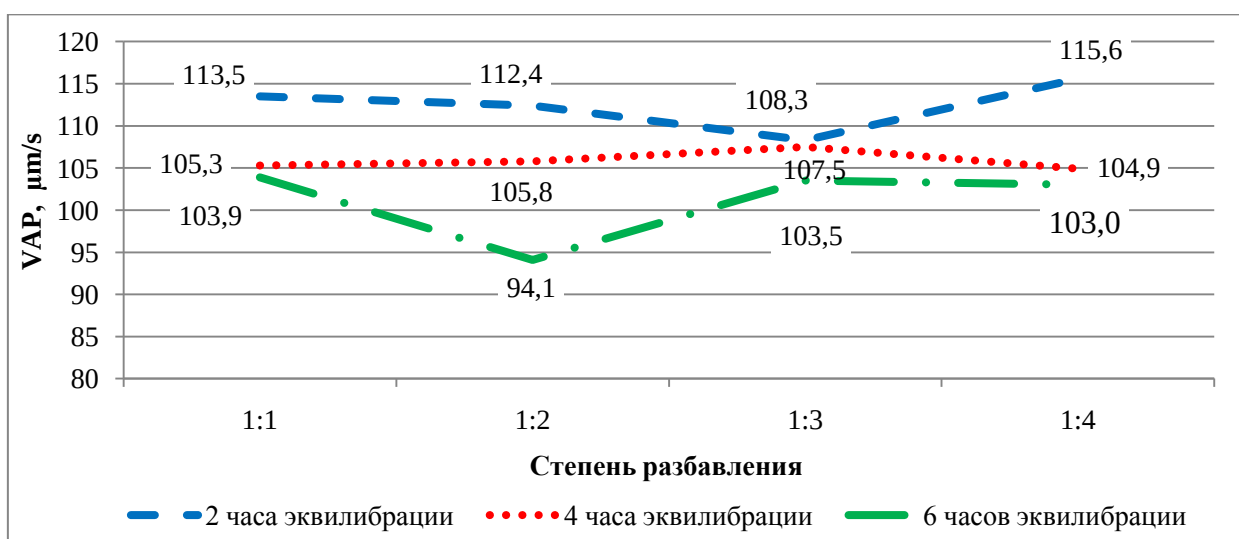


Рис. 4.4. Скорость движения сперматозоидов VAP после замораживания-оттаивания в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации (n=12), μm/s

Полученные экспериментальные данные (рис. 4.4) свидетельствуют о том, что наименьшая общая скорость движения сперматозоидов после замораживания-оттаивания получена при степени разбавления спермы 1:3, независимо от продолжительности охлаждения семени 2, 4 и 6 часов перед замораживанием. Наилучшие результаты получены при разных степенях разбавления и в диапазонах температур охлаждения +2-+4°C. Во всех проведенных опытах VAP оказался практически на одном и том же уровне, за исключением степени разбавления спермы 1:3, где указанный показатель составил 108,3 μm/s, ниже на 5,2 μm/s, 4,6 μm/s и 7,3 μm/s, при степени разбавления спермы 1:1, 1:2 и 1:4 соответственно.

Данные по изучению VSL - усредненной по времени скорости движения сперматозоидов вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точкой траектории, представлены на рисунке 4.5.

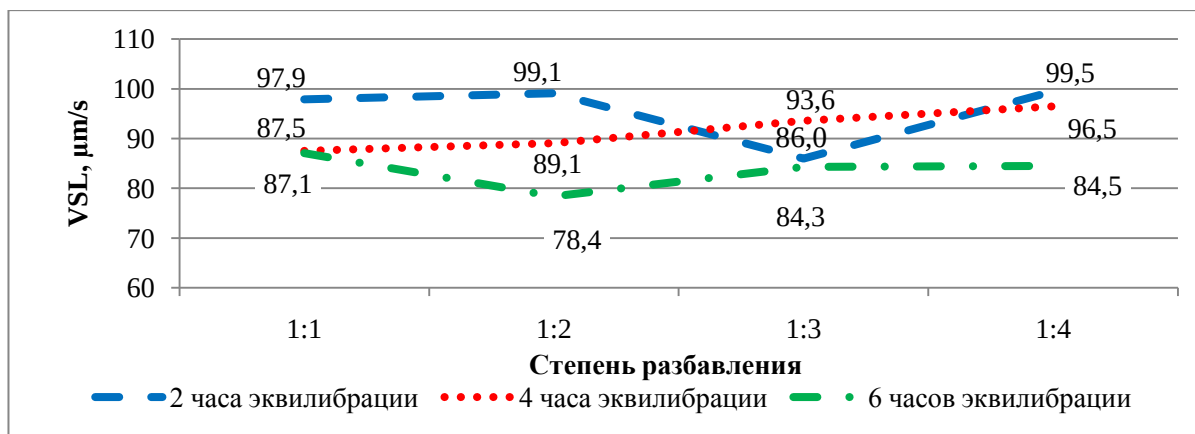


Рис. 4.5. Скорость движения сперматозоидов VSL в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации (n= 12), μm/s

Полученные данные (рисунок 4.5) свидетельствуют о том, что на скорость движения сперматозоидов VSL влияет как степень разбавления спермы, так и время охлаждения спермы перед замораживанием. Установлено, что при степени разбавления спермы 1:3 как при 2-х часовом охлаждении, так и при 4-х часовом охлаждении перед замораживанием в жидком азоте (-196 °C) скорость движения сперматозоидов (VSL) была самой низкой и составила 84,3 μm/s и 86,0 μm/s, соответственно. При 4-х часовом охлаждении разбавленной спермы (разбавление 1:3) скорость движения сперматозоидов составила 93,6 μm/s или на 9,3 μm/s выше чем при 2-х часовом охлаждении при +2-4 °C и на 7,6 μm/s, чем при 6 часовой эквilibрации.

Скорость движения сперматозоидов VCL - расстояние и скорость перемещения по всей траектории, представлена на рисунке 4.6.

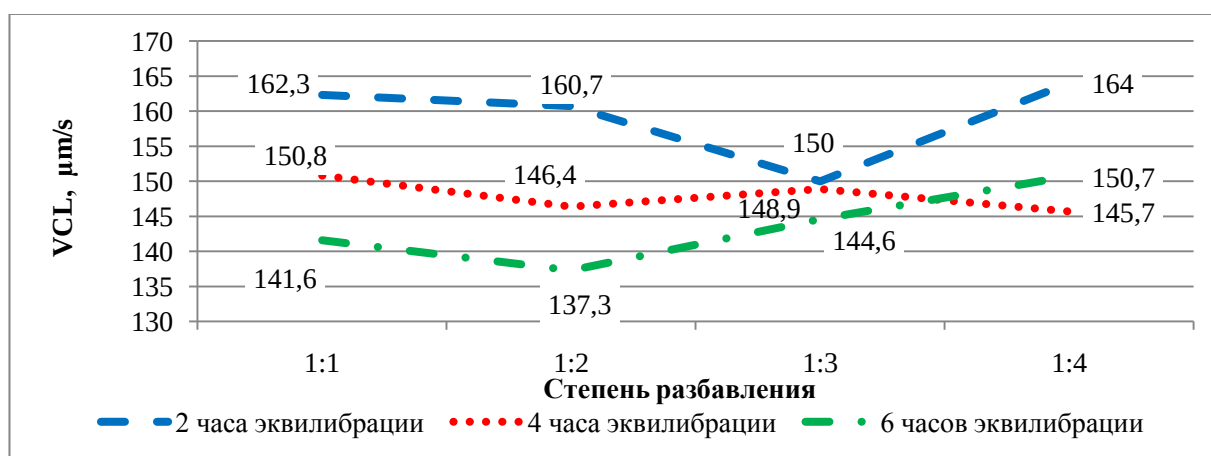


Рис. 4.6. Скорость движения сперматозоидов VCL в зависимости от степени разбавления и времени эквilibрации, (n=12), μm/s

Полученные нами экспериментальные данные (рисунок 4.6) показывают, что самые низкие показатели VCL сперматозоидов после замораживания и оттаивания спермы получены при разбавлении спермы 1:3, независимо от продолжительности охлаждения разбавленной спермы при +2-+4 °С. Аналогичные тенденции были получены при изучении скорости движения сперматозоидов после замораживания - оттаивания спермы VAP и VSL. Это свидетельствует о том, что при разбавлении спермы синтетической средой ГЦЖ, в состав которой как дополнительный компонент был введен препарат BioR, и при разбавлении спермы 1:3, происходит снижение скорости движения сперматозоидов, что помогает сохранению энергетических ресурсов сперматозоидов, и на итог будет способствовать более энергичному продвижению сперматозоидов в половых путях самки и более быстрому достижению места оплодотворения яйцеклеток, тем самым повышая оплодотворяющую способность при искусственном осеменении овцематок.

Кроме того, проведены исследования по выживаемости сперматозоидов после замораживания-оттаивания спермы при +37 °С в зависимости от степени разбавления (1:1, 1:2, 1:3 и 1:4) и времени охлаждения разбавленной спермы перед замораживанием – 2, 4 и 6 часов.

Экспериментальные данные по изучению изменения процента подвижности сперматозоидов при 2-х часовом охлаждении разбавленной спермы (+2-4 °С) и при степени разбавления 1:1, 1:2, 1:3 и 1:4 представлены в таблице 4.14.

Таблица 4.14. Подвижность сперматозоидов после оттаивания, с периодом охлаждения перед замораживанием в течение 2-х часов (n=12), %

Показатели	Степень разбавления			
	1:1	1:2	1:3	1:4
После оттаивания	54,0±7,0	52,0±4,0	54,7±5,2	53,0±4,5
Через: 1 час	53,3±3,9	51,3±5,0	53,7±5,0	50,3±4,4
2 часа	49,0±3,6	48,7±4,1	50,3±3,5	47,3±3,2
3 часа	43,0±2,0	41,3±4,3	40,3±4,2	40,7±2,3
4 часа	38,7±2,9	37,3±3,2	36,7±3,3	36,3±3,9
5 часов	28,3±2,7	32,3±4,6	31,3±4,9	31,3±3,5

Из приведенных в таблице 4.14 данных следует, что разбавление спермы баранов ГЦЖ средой в которую как дополнительный компонент вводили препарат BioR и выдерживали в течении 2-х часов при температуре +2-4 °С и при разных степенях разбавления - 1:1, 1:2, 1:3 и 1:4, после замораживания-оттаивания и сохранения при +37 °С в течении 5 часов привело к снижению подвижности сперматозоидов. Количество подвижных сперматозоидов после оттаивания во всех вариантах разбавления спермы

составило в среднем $54,0 \pm 7,0$ при разбавлении 1:1 - $52,0 \pm 4,0$, при 1:2 – $54,7 \pm 5,2$, при разбавлении 1:3 – $53,0 \pm 4,5$ и при разбавлении 1:4, т.е. во всех вариантах опыта они были приблизительно одинаковыми. Однако, после 5 часов сохранения оттаянной спермы при $+37^\circ\text{C}$ процент подвижных сперматозоидов снизился и составил в среднем: при разбавлении 1:1 – $28,3 \pm 2,7\%$; при разбавлении 1:2 – $32,3 \pm 4,6\%$; при разбавлении 1:3 – $31,3 \pm 4,9\%$ и при разбавлении 1:4 – $31,3 \pm 3,5\%$, т. е. снизился примерно на 50% во всех экспериментальных группах. Полученные данные соответствуют требованиям ГОСТа 32200-2013, в котором указывается что после 5 часов инкубации спермы при $+37^\circ\text{C}$ процент подвижности сперматозоидов должен соответствовать не менее 1% сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением.

В следующей серии опытов были проведены исследования по изучению изменения процента подвижности сперматозоидов при 4-х часовом охлаждении разбавленной спермы ($+2-4^\circ\text{C}$) и при степени разбавления 1:1, 1:2, 1:3 и 1:4. Полученные экспериментальные данные, представлены в таблице 4.15.

Таблица 4.15. Подвижность сперматозоидов после оттаивания, с периодом охлаждения перед замораживанием в течение 4-х часов (n=12), %

Показатели	Степень разбавления			
	1:1	1:2	1:3	1:4
После оттаивания	$54,7 \pm 9,0$	$52,7 \pm 7,1$	$55,0 \pm 7,8$	$50,0 \pm 5,3$
Через: 1 час	$48,7 \pm 2,6$	$47,7 \pm 2,4$	$58,0 \pm 6,8$	$47,7 \pm 2,9$
2 часа	$47,0 \pm 1,0$	$46,7 \pm 0,3$	$46,0 \pm 2,6$	$44,7 \pm 2,3$
3 часа	$42,0 \pm 1,5$	$42,0 \pm 1,2$	$43,0 \pm 1,2$	$41,7 \pm 2,2$
4 часа	$36,0 \pm 3,5$	$35,3 \pm 1,9$	$35,7 \pm 3,7$	$35,7 \pm 3,3$
5 часов	$30,7 \pm 4,3$	$30,7 \pm 2,9$	$33,3 \pm 3,9$	$30,3 \pm 4,9$

Как видно из данных таблицы 4.15 процент подвижных сперматозоидов после оттаивания во всех вариантах находится практически на одинаковом уровне, так как разница между группами опыта не достоверна. Однако наивысший процент подвижных сперматозоидов был в группе опыта, где сперма была разбавлена 1:3 – $55,0 \pm 7,8\%$, а самый низкий при разбавлении спермы 1:4 – $50,0 \pm 5,3\%$. После 5 часов инкубации спермы при 37°C самый высокий процент живых сперматозоидов также был при разбавлении 1:3 – $33,3 \pm 3,9\%$, в остальных группах он составил в пределах 30%, т.е. ниже на 3%.

Следует отметить, что активность сперматозоидов после 5 часовой инкубации при $+37^\circ\text{C}$ во всех опытных группах оставалась стабильно высокой. Данные результаты свидетельствуют о значительном улучшении качественных показателей спермы после разбавления ГЦЖ средой, в состав которой, как дополнительный компонент, вводили

препарат BioR. Полученные данные соответствуют нормативным значениям. Таким образом, охлаждение разбавленной спермы ГЦЖ средой, с добавлением в его состав препарата BioR, в течение 4-х часов при +2-4 °C и разбавлении 1:3 положительно влияет на качество заморожено-оттаянной спермы баранов-производителей.

Процент живых сперматозоидов оставался высоким и при охлаждении спермы перед замораживанием при +2-4 °C в течение 6 часов, используя ранее испытанные степени разбавления (таблица 4.16).

Таблица 4.16. Подвижность сперматозоидов после оттаивания, с периодом охлаждения перед замораживанием 6 часов (n=12), %

Показатели	Степень разбавления			
	1:1	1:2	1:3	1:4
После оттаивания	52,7±4,7	50,0±3,6	50,3±2,0	49,3±2,6
Через: 1 час	52,3±5,5	49,0±4,0	48,7±3,9	49,0±2,9
2 часа	46,3±2,4	44,0±2,6	43,0±2,1	43,7±1,2
3 часа	39,7±1,5	36,7±2,6	35,7±1,2	38,3±2,8
4 часа	34,0±2,8	35,0±1,2	32,3±1,5	34,3±1,9
5 часов	30,3±4,3	29,7±1,5*	27,7±2,7*	28,3±1,9*

*P≤0,05

Процент живых сперматозоидов в пробах спермы баранов после замораживания-оттаивания составлял 52,7±4,7% при разбавлении спермы 1:1; 50,0±3,6% при 1:2; 50,3±2,0% при разбавлении 1:3 и 49,3±2,6% при разбавлении спермы в соотношении 1:4. В конце исследований, при инкубации спермы при +37 °C в течение 5 часов данный показатель снизился на 20% и составил в среднем при разбавлении спермы 1:1 – 30,3±4,3%, при разбавлении 1:2 – 29,7±1,5% (P≤0,05), при разбавлении 1:3 – 27,7±2,7% (P≤0,05) и при разбавлении 1:4 – 28,3±1,9% (P≤0,05).

Данные показатели соответствуют нормам для оттаянной спермы баранов-производителей. На основании полученных положительных результатов научных исследований по совершенствованию технологии криоконсервации спермы баранов-производителей, была разработана новая синтетическая среда для разбавления и замораживания спермы баранов-производителей, на которую была подана заявка в Агентстве по Защите Интеллектуальной Собственности и получен патент на изобретение № 4513 (Darie Gr., Harea V. și al. 2017).

Состав синтетической среды

Глюкоза	0,8 г
Цитрат натрия	2,8 г
Желток куриного яйца	20 %/V
Глицерин	7 %/V
Антибиотики (Спермосан-3)	50 тыс. ед.
BioR (5 мг/мл)	0,6 %/V
Вода дистиллированная	до 100 мл

За период 2016 – 2022 гг. данной синтетической средой было заморожено и передано на хранение в генетический банк 2403 дозы спермы, полученных от ценных баранов-производителей, пригодных для искусственного осеменения овец.

Производственные опыты по проверке оплодотворяющей способности спермы баранов-производителей, замороженной в ГЦЖ среде, с добавлением дополнительного компонента BioR, проводили на экспериментально - технологической станции «Максимовка» с. Максимовка Ново-Аненского района в 2017 году. Учет результатов оплодотворяющей способности овец вели по количеству ягнений от искусственного осеменения овец (таб. 4.17) (Браду Н.Г. 2023).

Таблица 4.17. Результаты искусственного осеменения овец заморожено-оттаянной спермой

Было осеменено		Наблюдалась повторная охота		Плодотворно осеменено	
п	%	п	%	п	%
67	100	35	52,2	32	47,8

п-количество животных

Из таблицы следует, что добавление в состав ГЦЖ среды, как дополнительного компонента BioR в дозе 0,6%/V позволило получить 47,8% ягнений от искусственного осеменения заморожено-оттаянной спермой.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально установлено, что повреждения сперматозоидов увеличиваются по мере прохождения технологических этапов криоконсервации: разбавление, эквilibрация, замораживание и оттаивание, что приводит к значительным структурным повреждениям акросомы, наружной плазматической оболочки сперматозоидов и снижению оплодотворяющей способности замороженной спермы.

2. При разбавлении спермы разработанной нами средой, в состав которой в качестве дополнительного компонента вводился препарат BioR в концентрации 0,6% (патент на изобретение № 4513) получены наилучшие показатели подвижности сперматозоидов, после замораживания-оттаивания- $62,0 \pm 2,9\%$ ($P \leq 0,01$) по сравнению с контролем.

3. При разбавлении и замораживании спермы разработанной средой, процент сперматозоидов с аномалиями головки был ниже на достоверную разницу ($P \leq 0,01$). Установлено снижение на достоверную разницу ($P \leq 0,05$) и процента сперматозоидов с аномалиями хвостовой части сперматозоидов по сравнению с контрольной. В шейном сегменте сперматозоида отмечалось нивелирование различий между опытной и контрольной группой.

4. Применение препарата ZooBioR-1 и ZooBioR-2 оказывает положительное влияние на качество спермопродукции получаемой от баранов-производителей в неслучной сезон. Объем эякулята составил $0,8 \pm 0,04$ мл ($P \leq 0,001$), активность сперматозоидов увеличилась до $80,0 \pm 1,6\%$, концентрация сперматозоидов в эякуляте увеличилась до $2,34 \pm 0,09$ млрд/мл, концентрация тестостерона в крови увеличилась до $6,0 \pm 0,1$ ng/ml, что соответствует существующим требованиям, предъявленные к эякулятам, допущенным к замораживанию (патент на изобретение № 1460).

5. Разработанная нами среда для разбавления спермы баранов-производителей в большей степени, чем предлагаемые до сих пор, предохраняет сперматозоиды от повреждений акросомных структур и биологических мембран, способствует лучшей сохранности функциональной полноценности сперматозоидов. Оплодотворяемость овец, осемененных спермой, замороженной в разработанном разбавителе, составила 47%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для улучшения результативности метода искусственного осеменения в овцеводстве рекомендуем создать генетический банк замороженной спермы получаемой от баранов-производителей проверенных по качеству потомства в течение всего года. Это позволит ускорить темпы улучшения продуктивных и породных качеств овец разводимых в Республике Молдова.

2. Результаты проведённых научных исследований подтверждают эффективность использования разработанной синтетической среды, в состав которой в качестве дополнительного компонента вводился препарат BioR, для разбавления и замораживания спермы баранов-производителей, однако необходимо проводить более фундаментальные исследования для повышения криоустойчивости сперматозоидов в процессе их замораживания-оттаивания.

3. Для коррекции сперматогенеза у баранов-производителей в неслучной сезон рекомендуем использовать ZooBioR-1 и ZooBioR-2, которые позволяют получить высококачественную сперму, пригодную для разбавления и замораживания при -196°C и создать генетический банк спермы элитных баранов отечественных, импортных и исчезающих пород, а также рационального использования генетического материала.

Персональное участие. Научные исследования были реализованы автором под руководством научного руководителя и научного консультанта. Полученные научные результаты, их анализ и выводы полностью принадлежат автору.

ЛІТЕРАТУРА

1. ALLAI, L., MOULA, A. B. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*. 2018, T. 192. p. 6-17. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.03.019
2. AMIDI, F., PAZHOHAN, A., SHABANI NASHTAEI, M., KHODARAHMIAN, M., NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: A review. *Cell and Tissue Banking*. 2016, 17(4), 745–756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
3. ASTURIANO, J.G., CABRITA, E., HORVATH, A. Progress challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*. 2017, № 245, pp. 69-76
4. BAILEY, R. Revival of Spermatozoa after Dehydration and Vitriification at Low Temperatures. *Embryo Project Encyclopedia*. 2017. ISSN: 1940-5030 <http://embryo.asu.edu/handle/10776/12991>
5. BESHLIU, Alina, CHISELITSA, Natalia, CHISELITSA, Oleg, EFREMOVA, Nadejda, TOFAN, Elena, DARIE, Grigore, LOZAN (SPRINCEAN), Ana, ROTARI, Doina. New processes for obtaining mannoproteins from beer yeast sediments and their biochemical properties. In: *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2022, nr. 1(23), pp. 41-48. ISSN 1582-540X
6. BORONCIUC, Gh., BALAN, I., CAZACOVA, Iu., ROȘCA, N., BUCARCIUC, M., BUZAN, V., MEREUȚA, I., DUBALARI, A., FIODOROV, N., BLÎNDU, I. Metodă de stimulare a spermatogenezei la iepuri. Brevet de invenție de scurtă durată 1343 MD Nr. depozit: s20190005, data depozit: 2019. 01. 29, eliberat BOPI, nr.1, 2020, primit 04.02.2020.
7. **BRADU, N.** The technology of freezing rams sperm. In: *Zhivotnov'dni Nauki. Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, Bulgaria, 2019, Vol.56 No.5, pp.47-50 ref.6. ISSN-L: 0514-7441, SSN 2534-9856. Disponibil: https://animalscience-bg.org/page/bg/details.php?article_id=532
8. BUCAK, M.N, TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research* 73, 2007, pp. 103–108.
9. CHISELIȚA, N., CHISELIȚA, O., BEȘLIU, A., EFREMOVA, N., TOFAN, E., SPRINCEAN, A., DANILIȘ, M., ROTARI, D., ROTARU, A. Biochemical composition and antioxidant activity of different preparations from microbial waste of the beer industry. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*. 2022, №6, 139-146.

10. CIBOTARU, E., CHISELIȚĂ, O., MATVIENCO, N., SAVCA, D., DJENJERA, I. Influența biopreparatelor cianobacteriene asupra spermatogenezei la vieri. In: *Biotehnologii moderne - soluții pentru provocările lumii contemporane, 20-21 mai 2021, Chișinău*. Chișinău, Republica Moldova: Tipografia "Artpoligraf", 2021, pp. 111-115. ISBN 978-9975-3498-7-1. DOI: 10.52757/imb21.067
11. CIBOTARU, E., DARIE, G., PÂRLOG, A., PLEȘCA, D., Rolul antioxidantilor în conservarea spermei de vier. *Simpozionul științific internațional: „Modern Animal Husbandry–Food Safety And Durable development,,* Iași, 2019, p.30.
12. CIBOTARU, E., DARIE, G., PÎRLOG, A., PLEȘCA, D. The role of antioxidants in boar semen preservation. *Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*. Vol. 73(25). Editura „Ion Ionescu de la Brad” Iași 2020. pp. 9-12. Print –ISSN: 1454-7368, electronic –ISSN: 2067-2330.
13. CIBOTARU, E.; DARIE, G.; ROTARI, D. Researches regarding the cryopreservation of the sperm of the boar. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi. *Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*, vol. 71(24). Editura „Ion Ionescu de la Brad,, Iași 2019. pp. 30-33. Print ISSN: 1454-7368.(B+ CNCSIS)
14. CURRY, M.R., CLEINHANS, E.W., WATSON, P.F. Measurement of the Water Permeability of the Membranes of Boar, Ram, and Rabbit Spermatozoa Using Concentration-Dependent Self-Quenching of an Entrapped Fluorophore. *Cryobiology*, 2000, 41 (2), pp. 167-173. DOI: 10.1006/cryo.2000.2277.
15. DARIE, G., HAREA, V., CIBOTARU, E., **BRADU, N.**, DJENJERA, I., RUDIC, V., CHISELIȚA, O., CHIRIAC, T., DJUR, S. *Mediu de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci*. Brevet de invenție 4513 B1, Institutul Științifico-Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară. MD; Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, MD; Nr.depozit a 2016 0126. Data depozit 2016.11.21. Publicat 2017.09.30. In: BOPI. 2017, nr. 9, p. 31. Disponibil: https://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_09_2017.pdf
16. DARIE, G., ROTARI, D., MAȘNER, O., **BRADU, N.**, RUDIC, V., DJUR, S., CHIRIAC, T., CHISELIȚA, O. *Procedeu de stimulare a spermatogenezei la berbeci în extrasezon*. Brevet de invenție 1460.Y Institutul Științifico-practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară, MD; Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, MD. Nr.depozit s 2019 0037. Data depozit 2019.03.26. Publicat 31.10.2020. In: BOPI. 2020, nr. 10, p. 53. Disponibil: https://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_10_2020.pdf

17. DARIE, G., VACEVSCHI, S., **BRADU, N.**, DJENJERA, I., OSIPCIUC, G., MAȘNER, O. *Dispozitiv pentru însămânțarea artificială a ovinelor și caprinelor*. Brevet de invenție 4715 B1. Institutul Științifico-Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară. Nr.depozit a 2018 0060. Data depozit 2018.08.06. Publicat 31.10.2020. In: BOPI. 2020, nr.10, p. 45. Disponibil: https://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_10_2020.pdf
18. DARIE, Gr., MAȘNER, O., CIBOTARU, E., PÎRLOG, A. ROTARI, D., **BRADU, N.**, OSIPCIUC, G., DJENJERA, I. Însămânțarea artificială la ovine. Recomandări. Maximovca: S. n., 2020, 56 p. ISBN 978-9975-56-819-7
19. DARRIN-BENNET, A., POULOS, F., WHITE, J.G. The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. *Austral. J. Biol. Sci.*, 1973. 26. 6. pp. 1409-1420.
20. EIMERS, J.M. et al. Physical complaints and emotional stress related to routine diagnostic procedures of the fertility investigation. *J Psychosom Obst Gynaecol*. 1997, March. № 18(1). pp. 31-33. Disponibil: DOI: 10.3109/01674829709085566
21. GALARZA, D. A., LADRÓN DE GUEVARA, M., BELTRÁN-BREÑA, P., SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J., RIZOS, D., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., & SANTIAGO-MORENO, J. Influence of sperm filtration and the addition of glycerol to UHT skimmed milk- and TEST-based extenders on the quality and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Theriogenology*. 2019, №133, 29–37.
22. HARRISON, R.A., HANCOCK, D.D., CONRAD, H.R. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cows., *J. Dairy Sci.*, 1984. V. 67. pp. 123-132.
23. HOLT, W.V., NORTH, R.D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 1994. V. 51 (3), pp. 414-424
24. HRYMAK, K. Cryopreservation of ram-sires semen and its qualitative changes under the influence of low temperatures. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural Sciences*, 2020, 22(93), pp. 102-112. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9318>
25. JÄKEL, H., SCHEINPFLUG, K., MÜHLDORFER, K., GIANLUPPI, R., SCHARDONG, L. M., GONÇALVES, M. A. P., PANDOLFO BORTOLOZZO, F., & WABERSKI, D. In vitro performance and in vivo fertility of antibiotic-free preserved boar semen stored at 5°C. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, nr.12, 9. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00530-6>

26. JOHNSON, L.A., PURSEL, V.G. Phospholipid and fatty acid changes in boar spermatozoa after cold shock and freezing. 7 th Intern. Congr. Animal Reprod. A.I.Munchen, 1972. v.2. pp. 1633-1637.
27. JONES, R., MANN, T. Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1973. V. 184. pp. 103-107
28. JONES, R., MANN, T. Lipid peroxidation in spermatozoa: formation, role of plasmalogen and physiological significance. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1976. V. 193. pp.317-333.
29. LARBI, A., ANASS, B., MARCIANE DA SILVA, M., BOUBKER, N., & BOUCHRA EL, A. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 2018, nr. 192, 6–17.
30. LARBI, A., XAVIER, D., MEHMET, Ö., ANASS, B., BOUBKER, N., & BOUCHRA EL, A. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 2016, nr.175, 1-9.
31. LEVITT, J. A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants *J. Theoret. Biol.*, 1962. №3. 183 p.
32. LOVELOCK, J.E., BISHOP, M.W Prevention of freezing damage of living cells by dimethylsulphoxide. *Nature*, 1959. V. 183. pp.1394-1395
33. LUYET, B.J., GEHENIO, P.M. Life and death at low temperatures. *Biodynamics*. Normandy. MO. USA, 1940. 341 p.
34. LUYET, M.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodinamica*, 1937. V.1. N29. pp. 1-14.
35. MANN, T. The biochemistry of semen and the male reproductive tract. London, 1964. 493 p.
36. MAZUR, P. Theoretical and experimental effects cooling and warming velocity in the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*, 1966. №4, pp.181-182
37. NAGASE, H., NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. *V-th Intern. Congr. Anim. Reprod.-Trento*, 1964. №4. pp. 410-415
38. PATIST, A., ZOERB, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2005. №40. pp. 107–113.
39. PEGG, D.E. The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.* 2002. V. 20. pp. 5-13.
40. POLGE, C., ROWSON, L.E. Fertilization capacity of bull spermatozoa after freezing -79°C. *Nature*, 1952. N169, pp.626-627

41. PURSEL, V. G., JOHNSON, L.A., Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 1975, V 40(1), pp. 99-102
42. RAMALHO-SANTOS, J., SCHATTEN, G., MORENO, R. D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*. 2002. 67(4), 1043-1051. Disponibil: <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1043>
43. REVELL, S.G. Diluent for longer semen storage. *Pig International*. 1990, V. 30, pp. 73-75.
44. ROTARI, D. Preservation of rams sperm at +2 - +4C in region of Moldova. In: *Scientific Papers, Seria D. Animal Science*. București, 2019, vol. 62 Nr.1, pp.157-161. ISSN: 2285-5750
45. ROTARI, D. Research of the influence of antioxidants on the rams spermogram. In: *Scientific Papers. Series D. Animal Science*. București 2020, vol. LXIII, Issue 1, pp-74-82. ISSN 2285-5750.
46. ROTARI, D., DARIE, G., CHISELITA, O. Preservation of ram semen by refrigeration. In: *Scientific Papers. Series D. Animal Science*. București 2021, vol. LXIV, No. 1. pp. 87-93. ISSN-L 2285-5750. Disponibil: DOI: 10.17930, ISI Web of Science.
47. ROTARI, D., DARIE, G., MAȘNER, O., IURCU, I., DJENJERA, I., BEȘLIU, A., CHISELIȚA, N., CHISELIȚA, O., EFREMOVA, N., TOFAN, E. *Mediu de protecție pentru conservarea prin refrigerare a spermei de berbeci*. Brevet de invenție MD 4804. Data depozit.: 2021.04.29. Publicat 31.05.2022. In: BOPI. 2022, nr.5, p. 55. ISSN 2345-1815.
48. ROTARI, I., DARIE, G., RUDIC, V., MASHNER, O., **BRADU, N.**, DJUR, S., CHIRIAC, T., CHISELITA, O., CHISELITSA, N. Procedures for stimulating spermatogenesis in rams and boars. In: *Cercetări și inovații în viziunea tinerilor cercetători: "Cadet INOVA'20", 26-28 martie 2020, Sibiu*. Sibiu, România: Editura Academiei Forțelor Terestre „Nicolae Bălcescu”, 2020, Nr.5, pp. 368-370. ISSN 2501-3157, ISSN-L 2501-3157.
49. RUDIC, V. *BioR: Studii biomedicale și clinice*. Ch.: 2007, 376 p. ISBN 978-9975-9548-8-4.
50. RUDIC, V., CODREANU, S., CEPOI, L., MISCU, V. File din istoria Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei*. In: *Științele vieții*. 2016, Nr. 1(328), P. 101-123.
51. RUDIC, V., DJUR, S., CEPOI, L., CHIRIAC, T., RUDI, L., ȘOVA, S. *Cianobacteria Spirulina platensis – matrice pentru producerea compușilor organici selenocomponeți*. In: *Academos* 2014, nr. 1(32), pp. 83-88.

52. RUDIC, V., GUDUMAC, V., POPOVICI, M. Fotobiotehnologie – realizări noi în biomedicină. Chișinău: Cuant, 1995, 208 p.
53. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., CEPOI, L., MISCU, V., DJUR (Maxacova), S., CODREANU, S., DUMBRĂVEANU, V., SADOVNIC, D., CHELBET, V., CHELMENCIUC, V., DONI, V. Rolul protector al β -caratinului la spirulină pe durata ciclului de cultivare în dependență de iluminare. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. In: *Științele vieții*. 2016, Nr. 3(330), P. 134-142.
54. RUDIC, V., RUDI, L., CHIRIAC, T., CEPOI, L., MISCU, V., DJUR (Maxacova), S., CODREANU, S., DUMBRĂVEANU, V., SADOVNIC, D., CHELBET, V., CHELMENCIUC, V., DONI, V. Relevanța testului TBARS în determinarea stresului oxidativ la *Spirulina platensis* pe durata ciclului de cultivare. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. In: *Științele vieții*. 2016, Nr. 3(330), pp. 143-149.
55. SAACKE, R.G., AMANN, R.R., MARSHALL, C.T. Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls, *J. Anim. Sci.*, 1968. V. 27. N.5, 1391 p.
56. SAHA A., ASADUZZAMAN M., BARI F.Y. Cryopreservation techniques for ram sperm. *Vet Med Int.* 2022 Apr. 30, 2022: 7378379. Doi: 10.1155/2022/7378379.
57. THOMSON, J.G., CUMMINS, J.M. The effect of washing and protein supplementation on the acrosome reaction of ram spermatozoa in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 1985. V. 9. № 1, pp. 75-78.
58. TOKER, M. B., ALCAY, S., GOKCE, E., & USTUNER, B. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology*, 2016, nr.72 (3), 205-209.
59. TUCKER, M.J., LIEBERMANN, J. Vitriification in art. London: Informa UK, 2007, 322 p.
60. TVRDÁ, E., BUCKO, O., ROJKOVÁ, K., DURACKA, M., KUNOVÁ, S., KOVÁČ, J., BENKO, F., & KACÁNIOVÁ, M. The efficiency of selected extenders against bacterial contamination of boar semen in a swine breeding facility in western Slovakia. *Animals*, 2021, nr.11 (11), 3320. <https://doi.org/10.3390/ani11113320>
61. UPRETI, G.C., OLIVER, J.E., DUGANZICH, D.M. Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1). *Animal Reproduction Sci.* 1995. v. 37. pp. 143-157.
62. VARO-GHIURU, F., MICLEA, I., HETTIG, A., LADOȘI, I., MICLEA, VASILE., EGERSZEGI, I., ZĂHAN M., Lutein, Trolox, ascorbic acid and combination of

Trolox with ascorbic acid can improve boar semen quality during cryopreservation. *Cryo Letters*, 2015, 36(1), p. 1-7

63. VERSIUNEA 12.3. HTM-CEROS autorizată pe 20 martie 2008. WebPage: www.hamiltonhorne.com

64. VISSER, D., SALAMON, S. Effect of composition of teis-based diluent on survival of boar spermatozoa following deep freezing. *Austral. J. Biol. Sci.*, 1974, 27. 5. pp. 485-497.

65. VOSHINO, J., T. KOSIMA, M. SHIMIZU, T. TOMIZUKA, Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification, 30, 1993. pp.413-422

66. VOSSEN, A.M., FOOT, R.H. Sodium and potassium content of bull spermatozoa during processing prior to freezing, *J. Anim. Sci.*, 1967. pp. 26–30.

67. WABERSKI, D., WEITZE, K.F., RATH, D. e.a. Wirkung von bovinem Serumalbumin und Zweitterionenpuffer auf flüssigkonservierung Ebersamen. *Zuchthygiene*. 1989. v. 24. pp. 128-133.

68. WATSON, P.F. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000. V. 60, pp. 481-492. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00099-3.

69. WATSON, P.F., ANDERSON, W.J. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Repr.Fert.*, 1983. V. 69, pp. 229-235.

70. WATSON, P.F., PLUMMER, J.M. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *Proc. Intern. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen*, August. 25-27, Uppsala, 1985, pp. 113-127.

71. WATSON, P.F., The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: *Effects of Low Temperature on Biological Membranes*. Eds. Morris, G.J., Clarke A., Academic Press, London, 1981. pp. 189- 219

72. WOLF D.E. et al. Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanning calorimetry. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1990. V. 87. №17, pp. 6893-6896.

73. ZĂHAN, M., HETRIG, A., MICLEA, I., ORLOVSKI, D., MICLEA, V. Vitrification of immature and in vitro matured swine oocytes by sops. *Reprod. Dom. Anim.* (Suppl.1), 2013. V. 48, 105 p.

74. ZĂHAN, M. Conservarea resurselor genetice în zootehnie. Editura Accent, Cluj-Napoca, 2017. ISBN 978-606-561-171-9.

75. ZINICOVSCAIA, I., CHIRIAC, T., CEPOL, L., RUDI, L., CULICOV, O., FRONTASYEVA, M., RUDIK, V. Selenium uptake and assessment of the biochemical in *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass during the synthesis of selenium nanoparticles. *Canadian Journal of Microbiology*. 2017. Vol. 63 (1). pp. 27-34.
76. АБИЛОВ, А.И., НИКРАСОВА, Н.А., АБИЛОВА С.Ф. Рост, развитие, воспроизводительная способность и молочная продуктивность первотелок в зависимости от их физиологического состояния в молозивный период. *Киев.- Научный вестник*, 2011. №2, с. 194-198.
77. АВАНОВ, Н.Я. Достижения в криоконсервировании спермы баранов. *Зоотехния*, 1990. № 2, 23 с.
78. АЙБАЗОВ, А.М., ШЕВЧЕНКО, А.Н., СЕЛИОНОВА, М.И., МАМОНТОВА, Т.В. Сравнительная характеристика спермы барана, замороженной в разных экстендерах. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2021, №4, с. 63-78. Доступно: <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2021-4-63-78>
79. АЙБАЗОВ, М.М. Теоретические основы, разработка и совершенствование биотехнологических методов воспроизводства овец: автореф. дис. д-ра. сельхоз. наук, Ставрополь, 2003. 52 с.
80. АЙБАЗОВ, М.М., МАМОНТОВА, Т.В. Качественные показатели спермы барана, криоконсервированной при разных технологиях. *Сельскохозяйственный журнал*. 2020. №2 (13). с. 39-45
81. АЙБАЗОВ, М.М., МАМОНТОВА, Т.В., СЕИТОВ, М.С. Повышение результативности осеменения овец криоконсервированной спермой. *Сельскохозяйственный журнал*. 2017. №10. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/povyshenie-rezultativnosti-osemeneniya-ovets-kriokonservirovannoy-spermoy>
82. АНТОНЮК, В.С. Биотехнические способы повышения эффективности оплодотворения сельскохозяйственных животных. Минск: "Урожай". 1988, 198 с.
83. АНТОНЮК, В.С. Взаимосвязь физиологических функций и биохимических свойств спермы хряков. Автореферат дисс. докт.биол.наук. Харьков, 1984. 45 с.
84. АНТОНЮК, В.С. Изменение содержания липидов в сперме хряка в процессе глубокого замораживания. Доклады ВАСХНИЛ, 1982. №4. с. 31-34
85. БАГИРОВ, В.А., ИОЛЧИЕВ, Б.С., ВОЛКОВА, Н.А., ЗИНОВЬЕВА, Н.А. Влияние криоконсервации на биологические параметры семени у гибридов романовской

породы и архара. Сельскохозяйственная биология. 2017. №52(2). С. 268-273 doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.268rus

86. БАЛАН, И., БОРОНЧУК, Г., РОШКА, Н. и др. Структурные компоненты мембран гамет при криоконсервации. In: *Știința zootehnică - factor important pentru o agricultură de tip European: simp. ști. intern. 29 sept. - 1 oct. 2015*. Maximovca, 2016, pp. 313-318. ISBN 978-9975-56-367-3.

87. БАРЫШНИКОВА, А.В., БАБКИНА, Т.Н. Влияние генотипа на показатели спермапродукции быков-производителей. *Известия Оренбургского государственного университета*. 2016, №13, с. 105-106.

88. БЕЗУГЛОВА, О.С., ЗИНЧЕНКО, В.Е. Применение гуминовых препаратов в животноводстве (обзор). *Достижения науки и техники АПК*. 2016. №2., с. 89-93.

89. БЕКИШ В.Я., БЕКИШ В.В. Медицинская биология и общая генетика Учебник, 2-е изд., Витебск: Издательство ВГМУ, 2020, 400 с. ISBN 978-985-580-012-6

90. БЕЛОУС, А.М. и др. Структурно-функциональные изменения мембран клеток при действии низких температур. Сб. работ Института цитологии АН. СССР, 1977. Вып.17. 133 с.

91. БЕЛОУС, А.М., БОНДАРЕНКО, В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев: “Наукова Димка”, 1982. 256 с.

92. БЕЛОУС, А.М., БОНДАРЕНКО, В.А., БОНДАРЕНКО, Т.П. Молекулярные механизмы повреждения биомембраны при воздействии низких температур. Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев, 1977, с. 3-8.

93. БЕЛОУС, А.М., ГОРДИЕНКО, Е.А., РОЗАНОВ, Л.Ф. Замораживание и криопротекция. М.: Высшая школа, 1987, с.27-30.

94. БОРОНЧУК, Г.В. Эффективность использования различных криопротекторов при замораживании семени быка и барана. Усовершенствование методов воспроизводства сельскохозяйственных животных. Кишинев. Штиинца, 1979, с. 37-47.

95. БОРОНЧУК, Г.В., БАЛАН, И.В. Криомембранология. К.: Типогр. А.Н. Респ. Молдова, 2003. 336 с.

96. БОРОНЧУК, Г.В., БАЛАН, И.В. Структурно-функциональные и биохимические изменения в биологических системах при криоконсервации. К.: Типогр. А.Н. Респ. Молдова, 2008, 632 с. ISBN 978-9975-62-243-1

97. БРАДУ, Н.Г. Влияние периода эквilibрации на показатели качества спермы баранов-производителей. *Инновационные технологии в науке: управление качеством, метрологическое обеспечение, подходы и цифровизация производства в сфере*

АПК. I Всероссийская (национальная) научно-практическая конференция с международным участием. 28 апреля 2023. Саратов. 2023. În ediție.

98. БУГРОВ, А.Д., ОЛЕКСЕНКО, Т.И. Критические зоны при оттаивании спермы быков и их влияние на выживаемость спермиев. *Сельскохозяйственная биология*, 1977. Т.В. №3, с. 368-370.

99. ВАРНАВСКИЙ, А.Н., ВАРНАВСКАЯ, В.А., ЗАЙЦЕВ, В.В. Новые среды для замораживания спермы баранов. *Зоотехния*. 1989. №9. с. 46- 49.

100. ВИНОГРАДОВ, И.В., ЖИВУЛЬКО, А.Р., ВИНОГРАДОВА, Л.М., КОРОЛЕВ, С.В. Докозагексаеновая кислота в лечении мужского бесплодия. *Андрология и генитальная хирургия*. 2018, № 4, с. 80-83.

101. ВЛАДИМИРОВ, Ю.А., АРЧАКОВ, А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. с. 252.

102. ГЕРАСИМОВА, Л.В. О воспроизводстве пушных зверей. Сборник научных трудов. Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. 2018, № 22, с. 127.

103. ГОЛДОВСКИЙ, А.М. Анабиоз и общая проблема жизни. *Журнал общей биологии*, 1963. т.24, №2. 18-29 с.

104. ГОРБУНОВ, Л.В. Контроль температуры и скорость её изменения в среде, содержащей биообъём. *Проблемы криобиологии*, 2002, №1, с. 32-38

105. ГОСТ 32277-2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы испытаний физических свойств, биологического, биохимического, морфологического анализов. Москва: ФГУП «Стандартинформ», 2014. с.4

106. ГРАЕВСКИЙ, Э.Я. Стеклообразное состояние протоплазмы в условиях глубокого охлаждения. *Успехи современной биологии*, 1948. т. XXV. вып. 2. 18 - 22 с.

107. ГРИЩЕНКО В.И., КАЛУГИН Ю.В., ЛУЧКО Н.А. Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии. *Проблемы в криобиологии*, 1993, №3, с.3-13.

108. ГРИЩЕНКО, В.И., ЛУЧКО, Н.А. Новые подходы к проблеме низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток животных и человека. *Проблемы криобиологии*, 1997 №1-2, с. 61-67

109. ГУСЬКОВ, А.М., ДАРИЙ, Г.Е., ПУЗЫНА, Г.И. Использование антиоксидантов в качестве ингредиентов криозащитных сред. *IV конференция «Биоантиоксидант»*. Москва, 1993. Т.1, с. 203-204

110. ГУСЬКОВ, А.М. Физиолого-биохимические технологические аспекты повышения способности животных. *Автореферат дисс. доктор биол. наук*, Дубровицы, 1993. с. 38.
111. ГУСЬКОВ, А.М., ДИМИТРИЕНКО, Н.Г., БУКАРЧУК, М.Г. Особенности криогенных изменений липидов плазматических мембран и функционального состояния гамет быка и хряка. *Доклад ВАСХНИЛ*, 1989. 2, с. 26-28
112. ДАНОВ, Д.Т., КОВАЧЕВ, К.Д., ПОПОВ, Д.В. Исследования вверху ультраструктурные изменения на сперматозоидите на коча при криоконсервация. *Криобиология на половите клетки*. София, 1983, с. 155-179
113. ДАРИЙ, Г.Е. Адаптивный потенциал и воспроизводительная функция животных. *Автореферат дисс. доктора биол. наук*. Дубровицы, 1993. 49 с.
114. ДАРИЙ, Г.Е. Действие неэлектролитов и электролитов на физиологическую полноценность семени быков при замораживании. *Автореферат дисс. канд. биол. наук*. Дубровицы, 1977. 26 с.
115. ДЕРЯЖЕНЦЕВ, В. И., ЕПИШИНА, Т. М. Новый криопротектор синтетической среды для разбавления и криоконсервации спермы баранов. *Ветеринарная патология*, 2008. № 3. 36-38 с.
116. ДЕРЯЖЕНЦЕВ, В.И., ЕПИШИНА, Т.М. Новый криопротектор для разбавления и криоконсервации спермы баранов. *Ветеринарная патология*. 2007, №2. с. 38-39.
117. ДУВАКИНА Е.В. Сравнение естественного и искусственного осеменения крупного рогатого скота в условиях молочно-товарной фермы. *Молодежь и наука*. 2019, №9, 31 с. eISSN: 2308-0426.
118. ЕПИШИНА, Т.М. Действие поверхностно активных веществ на криоустойчивость спермы баранов. *ВНИИТЭИ. Агропром*. М, 1998. № 17398. 5с.
119. ЕПИШИНА, Т.М. Изучение защитного действия антиоксидантов, эфиров глицерина и комплексонатов металлов при замораживании спермы баранов. *Автореферат канд. дис. ВНИИплем*. 1996, 26 с.
120. ЕПИШИНА, Т.М. Повышение репродуктивных качеств свиней и овец. Москва, 2009, 163 с.
121. ЕРОХИН, А.С. Селен и репродуктивная функция животных. Москва. 2008, 141 с.
122. ЕРОХИН, А.С. Физиологические аспекты криорезистентности спермы баранов и быков. *Автореферат дисс, докт. биол. наук*. Дубровицы, 1994. 39 с.

123. ЕРОХИН, А.С., ДЕРЯЖЕНЦЕВ, В.И. Перекисное окисление липидов в сперме баранов. *Овцеводство*, 1991. № 3. с. 17-19.
124. ЕРОХИН, А.С., ЕПИШИНА, Т.М., НИКИФОРОВ, А.Г. Криозащитное действие новых синтетических антиоксидантов при криоконсервации спермы баранов. *Сельскохозяйственная биология*. М., 1996. № 6. с.19-21.
125. ЕРОХИН, А.С., ЕПИШИНА, Т.М., ЧЕРНОВА, И.Е. Проблемы криоконсервации семени баранов. *Современные аспекты селекции, биотехнологии, информатизации в племенном животноводстве*. М, 1997. с. 233-248
126. ЕРОХИН, А.С., ПЕТРОВА, Т.М., ТКАЧЕВА, Н.А., ЕРОХИНА, О.П. Использование яичного порошка в средах для замораживания спермы. *Зоотехния*. 1989. №8. с. 65-67.
127. ЕРОХИН, А.С., ПРИДАНОВА, И.Е. Улучшение оплодотворяемости коз замороженной спермой при введении в разбавитель антиоксиданта. *Зоотехния*. - 2017. - № 2. - С. 28-31.
128. ЕРОХИН, А.С., ФОМИЧЕВ, Ю.П., ФЕДИНА, Н.И., ЕПИШИНА, Г.М. Изучение защитного влияния хитозана при криоконсервации семени быков и баранов. *Научно-производственный журнал. Аграрная Россия*, 2004, 17-20 с.
129. ЖЕЛТОБРЮХ, Н.А., ИВАХНЕНКО, В.К., АЙБАЗОВ, М.М. Замораживание спермы барана в средах с препаратами декстрана. Разведение овец и коз. *Шерстоведение*, *Сб.науч.трудов*, Ставрополь, 1981. с.56-60.
130. ЖЕЛТОБРЮХ, Н.А., ИВАХНЕНКО, В.К., АЙБАЗОВ, М.М. Криозащитное действие препаратов поливинилпирролидона в синтетических средах для замораживания спермы баранов. Разработка и применение методов увеличения продуктивности овец и коз и улучшение качества их продукции. Ставрополь, 1989. с. 97-101
131. ЖУРАВЛЕВ А.И., ПАНТЮШЕНКО В.Т. Свободно-радикальная патология и методы ее профилактики биоантиокислителями. *Сельскохозяйственная биология. Сер. Биология животных*, 1989. № 2, с. 17- 24
132. ЖУРАВЛЕВ, А.И. Биоантиокислители и их роль в регуляции окислительных процессов. *Физико-химические основы авторегуляции в клетках*. М: Наука, 1968. с. 7-14.
133. ЗВЕРЕВА, А.П., ПУШКАРЬ, К.И. Оттаивание замороженной спермы хряков. Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов. Тез. Докл. Всесоюзн. Конференция. 1984, т. 2, 227 с.

134. ИЛЬИНСКАЯ, Т.П., КАЗАНЦЕВА, Г.М. О прогнозировании хладостойкости спермы хряка по биохимическим показателям. VII Международный конгресс по размножению и искусственному осеменению животных. Мюнхен. 1972, т. 2, с. 1664-1668.
135. КАЗАКОВА, Ю., БОРОНЧУК, Г., БАЛАН, И., БУЗАН, В., МЕРЕУЦА, И., РОШКА, Н., БУКАРЧУК, М. Действие антиоксидантов в составе синтетических сред для криоконсервации спермы человека. Chişinău, Print Caro, 2020, pp. 399-400. ISBN 978-9925-56-808-0
136. КАРАПИРЯ, А. Воспроизводительная функция и продуктивность свиноматок при скармливании им ZooBioR. In: *Inovații în zootehnie și siguranța produselor animaliere – realizări și perspective: dedicată celei de-a 65-a aniversări de la fondarea Institutului științifico-Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară, 30 septembrie - 1 octombrie 2021, Maximovca*. Maximovca: Print-Caro, 2021, pp. 328-331. ISBN 978-9975-56-911-8.
137. КИМ, Е.Д. Фосфолипиды спермы сельскохозяйственных животных. Автореф. дис. канд. биол. наук, 1968.
138. КОЛОСОВ, Ю.А., ДЕГТЯРЬ, А.С., АБОНЕЕВ, В.В., МАРЧЕНКО, В.В., ВАСИЛЕНКО, В.Н., КАВАРДАКОВ, В.Я., КАЙДАЛОВ, А.Ф. *Использование потенциала интенсивных пород овец для увеличения производства продукции овцеводства*. Персиановский: Донской ГАУ. 2020, 234 с. ISBN 978-5-98252-371-6.
139. КОНДРАХИН, И.П., АРХИПОВ, А.В., ЛЕВЧЕНКО, В.И., ТАЛАНОВ, Г.А., ФРОЛОВА, Л.А., НОВИКОВ, В.Э. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. Изд. Колос, 2004. 520 с.
140. КОНИНА, Н.А., СЕМЕНОВ, А.В., ЗИГУНОВ, В.В. Микрофлора, выделенная от свиноматок при метрите маститагалактии. Материалы Российской НПК «Актуальные вопросы ветеринарной медицины». Новосибирск. 2003, с. 83-85 Доступно: <http://elib.cnsnb.ru/books/free/0352/352526/files/assets/basic-html/page-4.html>
141. КОНОНОВ, В.П. Глубокое замораживание семени хряков. Новое в теории и практике. Теория и практика воспроизведения животных. М., Колос., 1984. с. 241-256.
142. КОНОНОВ, В.П. Достижения и перспективы замораживания семени в свиноводстве. Обзорн. Информ., М. 1983. 75 с..
143. КОНОНОВ, В.П., СОКОЛОВСКАЯ, И.И. Цифрометрическое исследование динамики содержания ДНК в живчиках хряка при хранении семени вне организма. Доклады ВАСХНИЛ, 1968. №2. 26-28 с.

144. КОНОНСКИЙ, А.И. *Биохимия животных*. Белая церковь. Полиграфкнига, 1992. 418 с. ISBN 5-10-002451-8.
145. КОРБАН, Н.В. Криоконсервация спермы хряков. Криоконсервация спермы с.- х. животных. Л. Агропромиздат, 1988. 130-147 с.
146. КОРБАН, Н.В., МОРОЗ, Л.Г., ШАПИЕВ, И.Ш. Методические рекомендации по низкотемпературной консервации спермы хряков. Л., 1980. 61 с.
147. КОРБАН, Н.В., МОРОЗ, Л.Г., ШАПИЕВ, М.Ш. Оценка криорезистентности семени хряков по устойчивости к холодовому удару. Животноводство, 1983. № 3. С.44-45.
148. КОРОЧКИНА, Е.А., МОРОЗ, А.И. Значение разбавления спермы различных видов сельскохозяйственных животных в процессе ее криоконсервации. Генетика и разведение животных. 2022, №4, с.108-113. ISSN 2410-2733
149. КУДРЯВЦЕВ, А.А., КУДРЯВЦЕВА, Л.А. Клиническая гематология животных. Москва: Колос, 1974. с.345.
150. КУЛИКОВА, Н.И., ВОРОКОВ, В.Х., УТИЖЕВ, А.З. История зоотехнической науки и ее основных разделов. Учеб. Пособие, Краснодар, КубГАУ. 2018, 296 с. УДК 636:94(075.8) Доступно: <https://kubsau.ru/upload/iblock/436/436e733319bc7f04b639f8366b85d166.pdf>
151. КУНДЫШЕВ, П.П., ЛУКАНЕНКО, А.А., ЛЮДОХОВСКИЙ, В.А. и др. Совершенствование визо-цервикального метода искусственного осеменения коров. Животноводство, 1975. № 1. с. 35-37.
152. ЛАКИН, Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990. 352 с. ISBN 5-06-000471-6
153. ЛОЗИНО-ЛОЗИНСКИЙ, А.К. Очерки по криобиологии Л. Наука. 1972, 287с.
154. ЛОПАТКО, М.И. Замораживание спермы быка без глицерина. Молочное и мясное скотоводство. 1971, № 4, с. 24
155. ЛУГОВОЙ, В.И., ХАНИМА, Л.А. Современные аспекты проблемы поиска и создания криопротекторов. Проблемы криобиологии. 1997, №1-2, с. 30-36
156. ЛЮЦКАНОВ П.И. Создание новых типов цигайских и каракульских овец в Республике Молдова с использованием генетических маркеров. Дисс. докт. биол. наук. Дубровицы, 2009, с. 220.
157. ЛЮЦКАНОВ, П., МАШНЕР, О. Сохранение и использование генетических ресурсов овец и коз Республики Молдова. В: *Животноводни науки*, 2019, № 1, с. 6, стр. 14-26. ISSN 0514-7441.

158. МАМОНТОВА, Т.В., АЙБАЗОВ, М.М., СЕИТОВ, М.С. Сравнительная характеристика половой активности, уровня спермопродукции и устойчивости к криоконсервации спермы баранов различных пород. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2018, № 1(69), с. 145-147.
159. МИЛОВАНОВ, В.К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных, М. 1962. 696 с.
160. МИЛОВАНОВ, В.К. Имплементоры – новый класс физиологически активных синтетических сред для разбавления семени сельскохозяйственных животных. Тезисы докладов конференции по племенному делу и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных. Госсельхозиздат УССР. Киев. 1962, 24-26 с.
161. МИЛОВАНОВ, В.К., ВАРНАВСКАЯ, В.А., ЗАЙЦЕВ, В.В. Особенности живчиков барана и новые среды для семени. Проблемы долгосрочного хранения семени баранов. Дубровицы. 1989, с. 68-75
162. МИЛОВАНОВ, В.К., ВАРНАВСКАЯ, В.А., ШАЙДУЛИН, И.П. Среда для глубокого охлаждения семени. *Животноводство*. 1985, № 7, с. 39-41
163. МИЛОВАНОВ, В.К., ВАРНАВСКИЙ, А.Н., НАУК, В.А. О природе криогенных повреждений живчиков барана. *Вести, с.-х. Науки*. 1970, № 10, с. 86-93.
164. МИЛОВАНОВ, В.К., КОНОНОВ, В.П., АЗИЗОВА, О.А., МАКСИНА, А.Г. Исследование криогенных повреждений живчиков с помощью электронно-парамагнитно-резонансной спектроскопии спиновых зондов в мембранах. Доклады ВАСХНИЛ. 1981, № 10. 27-29 с.
165. МИЛОВАНОВ, В.К., КОНОНОВ, В.П., ГОЛЫШЕВ, Н.А., ХАЧАПУРИДЗЕ, Э.Л., ЛЕТЯГО, В.В., ПОХОДНЯ, П.С. Новое в технологии глубокого замораживания спермы хряка. *Животноводство*. 1974, № 12, с. 50-58.
166. МИЛОВАНОВ, В.К., ПАРАМОНОВ, Л.И., ЛИЗУНКОВ, А.Ф. Использование каротиноидов при криоконсервации спермы. Доклады ВАСХНИЛ. 1988, № 11. с. 33-35.
167. МИЛОВАНОВ, В.К., СОКОЛОВСКАЯ, И.И. Теория и практика воспроизведения животных, М. 1984, 186 с.
168. МИЛОВАНОВ, В.К., СОКОЛОВСКАЯ, И.И. Теория холодового удара живчиков млекопитающих. Докл. ВАСХНИЛ. 1959, с. 3-9
169. МИЛОВАНОВ, В.К., СОКОЛОВСКАЯ, И.И., СМИРНОВ, И.В. Свойство живчиков млекопитающих сохранить биологическую полноценность после быстрого замораживания. 1972. Диплом на открытие №103, 28 с.

170. МЫМРИН, В.С., ХАЛТУРИНА, Л.В., ЛЕБЕДЕВА, И.А. Влияние пробиотического препарата „Бацелл” на повышение качества спермы быков производителей. *Эффективное животноводство*. 2016, № 5 (126), с. 30-31.
171. НАЗАРОВ, М. В., ГОРПИНЧЕНКО, Е. А., ГАВРИЛОВ, Б. В. Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Учеб. пособие. Краснодар: КубГАУ, 2018, 138 с. УДК 691:636.082.453.5(075.8)
172. НАРИЖНЫЙ, А.Г., ДЖАМАЛДИНОВ, А.Ч. Использование L-карнозина для улучшения качества спермы хряков. Вестник Ульяновской ГСХА. 2019, №1, с. 96-100.
173. НАРИЖНЫЙ, А.Г., ПОРФИРЬЕВ, И.А., САВИН, О.К. Новые антиоксиданты для глубокого замораживания спермы хряков. Свиноферма. 2005, № 4, с. 7-19
174. НАРИЖНЫЙ, А.Г., САВИН, О.К., ДЖАМАЛДИНОВ, А.Ч. и др. Добавление комплексных препаратов ГАМП и полиген для санации криоконсервированной спермы хряков. Тезисы докладов научной конференции, посвященной 60-летию ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, С.-П. 2000, с. 107-108
175. НАУК, В.А. Криоконсервация семени животных. Консервация генетических ресурсов. Пущино: Институт биологической физики. 1982, с. 48-49
176. НАУК, В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. Кишинев: *Штиинца*. 1991, 200 с.
177. НАУК, В.А. Структурные и биохимические криоповреждения биомембран гамет самцов сельскохозяйственных животных. Криобиология. 1985, № 2, с. 47-50.
178. НАУК, В.А., ВОРОНЧУК, Г.В., ДМИТРИЕНКО, Н.Г. Криогенные изменения жирных кислот плазматических мембран гамет быка и хряка. Доклады ВАСХНИЛ. 1986, №1, с. 31-33
179. НАУК, В.А., ГУСЬКОВ, А.М. Особенности перекисного окисления липидов при замораживании спермы быков и хряков. Доклады ВАСХНИЛ, 1983, №2, с. 27-29
180. НАУК, В.А., ЛЯНСБЕРГ, Э.С., ШЕЙКИН, В.Н. Криогенные изменения живчиков барана. Овцеводство. 1970, №10, с. 35-40
181. НЕБОГАТИКОВ, Г.В., ИСАКОВ, А.А. Применение новой конструкции инструментов в искусственном осеменении овец. Известия Нижневолжского Агроуниверситетского Комплекса: *Наука и высшее профессиональное образование*. 2011, №2(22), с. 104-107. ISSN: 2071-9485

182. ОЗТЕРКЛЕР, ЙИ., АРИ, У.Ц. Краткий обзор современных подходов к разбавителям спермы, применяемых для изучения стабильности семени баранов к замораживанию. *Сельскохозяйственная биология*. 2017, том 52, № 2, с. 242-250 doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.242rus
183. ОСТАШКО, Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Киев: Урожай. 1978, 254 с.
184. ОСТАШКО, Ф.И., ГУБИН, Н.М., КАНЦЕДАЛЬ, В.И. О применении метода пламенной фотометрии для количественного определения натрия и калия в сперме производителей. Харьков: 1984, с. 110-114
185. ОСТАШКО, Ф.И., КАНЦЕДАЛЬ, В.И. Замораживание спермы баранов в герметической упаковке. Тезисы Всес. конф. Применение биотехнологии в животноводстве, растениеводстве и Вет.мед., М. 1988, с. 2-4.
186. ПАРАЩУК, Ю.С., ШРАГО, М.И., КАЛУГИН, Ю.К. и др. Сравнительная оценка цитотоксичности и криозащитной эффективности глицерина и его алкиловых эфиров при замораживании спермы человека. *Криобиология*. 1989, №1, с. 40-43
187. ПЛАТОВ, Е.М. Криоконсервация спермы баранов. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. Л.: Агопромиздат. 1988, с. 161-195.
188. ПЛАТОВ, Е.М. Теоретические и практические основы замораживания семени производителей с.-х. животных. Автореф. дис. докт. биол. наук. Дубровицы. 1973, 42 с.
189. ПЛАТОВ, Е.М. Теоретическое и практическое обоснование технологии замораживания, оттаивания и использования спермы баранов. *Биология воспроизведения и искусственного осеменения сельскохозяйственных животных*. Лесные Поляны. 1986, с.7-17.
190. ПОЛОЗЮК, О.Н., УШАКОВА, Т.М. Гематология. *Учебное пособие*, Персиановский: Донской ГАУ. 2019, 159 с. УДК 619:616-092:636
191. ПОНУРОВСКИЙ, А.А., ДЕГТЯРЬ, А.С., СЕМЕНЧЕНКО, С.В., РОМАНЕЦ, Т. С. Воспроизводительные качества баранов полутонкорунных пород. *Научно-методический электронный журнал «Концепт»*. 2014, Т. 26, с. 86–90. Доступно: <http://e-koncept.ru/2014/64318.htm>.
192. ПРОКОПЦЕВ, В.М., РУСТЕНОВ, А., МОРОЗ, Л.Г. Действие унитиола на сперму хряков. *Сельскохозяйственная биология*. 1974, т.9 № 4, с. 581-584

193. РОТАРИ, Д. Воспроизводительные качества баранов молдавского типа Каракульской породы. *Розведення I Генетика Тварин, Міжвідомчий тематичний науковий збірник*, Випуск 59. Київ. 2020, pp. 92-96. ISSN: 2312-0223.
194. РОТАРЬ, С., МАТВЕЕНКО, Н., САВКА, Д., КАРАПИРЯ, А. Коррекция воспроизводительной функции у хряков с помощью биологически активных веществ. В: „*Inovații în zootehnie și siguranța produselor animaliere – realizări și perspective*”. Maximovca. 2021, pp. 486 – 490. ISBN 978-9975-56-911-8.
195. РОШКА, Н., БАЛАН, И., БОРОНЧУК, Г., БУЗАН, В., БУКАРЧУК, М., КАЗАКОВА, Ю., ЗАЙЧЕНКО, Н., ДУБАЛАРЬ, А., ФЕДОРОВ, Н., БЛЫНДУ, И. Защитное действие антиоксидантов при криоконсервации репродуктивных клеток сельскохозяйственных животных. В кн.: *Интеграция через исследования и инновации: Естественные и точные науки, 7-8 ноября 2019 г.*, Кишинев, Республика Молдова: СЕР USM, 2019, SNE, стр. 94-97. ISBN 978-9975-149-46-4.
196. САМУСЕНКО, Л.Д., МАМАЕВ, А.В., КОНОВАЛОВ, К.В. Оценка показателей спермопродукции быков-производителей с разным уровнем биоэлектрического потенциала биологически активных центров и в разные сезоны года. *Вестник КрасГАУ*. 2019, №2 (134), с.70-76. ISSN: 1819-4036.
197. СЕЛИОНОВА, М.И., МАМОНТОВА, Т.В., АЙБАЗОВ, М.М. Воспроизводство овец и коз с использованием биотехнологических методов и приемов: монография. Ставрополь: типография ВНИИОК, 2018, 107 с.
198. СЕМАКОВ, В.Г. Криоконсервация спермы быков и баранов. *Обзорная информация ВНИИТЭИ агропром*. М. 1991, с. 24- 26
199. СЕМЕНОВА, В.А. Защитные свойства отдельных факторов желтка куриного яйца при замораживании семени животных. Автореф., дисс. канд.биол.наук. Дубровицы. 1987, 19 с.
200. СЕМЕНЧЕНКО, С.В., ЗАСЕМЧУК, И.В., ДЕГТЯРЬ, А.С. Технология первичной переработки продуктов животноводства. Методические указания к лабораторно-практическим занятиям для студентов направления 111100.62 - "*Технология производства продукции животноводства*". п. Персиановский, (2-е издание, переработанное и дополненное). 2014, 56 с.
201. СИЛЮКОВА, Ю.Л., СТАНИШЕВСКАЯ, О.И. Эффективность использования комбинации сахаридов в разбавителе для криоконсервации семени петухов. *Известия НВ АУК*. 2020, №4 (60), с. 280-290. DOI:10.32786/2071-9485-2020-04-28

202. СКОРНЯКОВ, Б.А., ОСТАШКО, Ф.И. Нарушение ультраструктуры спермиев при низкотемпературной консервации. В сб.: *Криобиология и криомедицина*. 1975, I: 110-114.
203. СМИРНОВ, И.В. К теории глубокого охлаждения спермы. *Животноводство*. 1974, №11, 65-70 с.
204. СМИРНОВ, И.В., ЕМЕЦ, А.З. Осмотическое давление в сперме животных и его значение при замораживании. Мат. 7-го Межд. конгр. по замораж. и искусств. осем.животных. Мюнхен. 1972, Т.2, с. 1391- 1397
205. СТУДЕНЦОВ, А. П., ШИПИЛОВ, В. С., НИКИТИН, В. Я., МИРОЛЮБОВ, М. Г., СУББОТИНА, Л. Г., ПРЕОБРАЖЕНСКИЙ, О. Н., ХРОМЦОВ, В. В. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных. М.: *КолосС*. 2011, 440 с. УДК 619:618(075.8)
206. СТШЕЖЕК, Е., ГЛЕГОВСКИ, Я., МАЧЕРСКИ, Э., и др. Биохимические показатели семени хряка в процессе замораживания. Симпоз. по теме: Криоконсервация семени барана и хряка, 14-15. X. 1982 г. Варна. София. 1984, с. 74-93.
207. ТАРУСОВ, Б.Н. О механизме защитного, антиокислительного действия некоторых серосодержащих соединений. *Радиобиология*. 1962, 2. №2. с. 177-180.
208. УСИПБЕК, Б.А., ДЖУМАШЕВА, Р.Т., ЖУМАГУЛ, М.Ж., АБЛАЙХАНОВА, Н.Т., ЕСИМСИИТОВА, З.Б., ИСАЧЕНКО, В. Технологические аспекты замораживания и хранения живых биологических объектов. *Вестник КазНМУ*. 2018. №1. ,с. 493-496
209. УСПЕНСКИЙ, А.Н. Углеводно-белковые соединения и воспроизводительная функция животных. Автореф. дисс. докт, биол.наук. Дубровицы. 1991, с. 44.
210. ХАЛИПАЕВ, М.Г. Этиопатогенез, диагностика и меры профилактики бесплодия овец. Дисс. на соиск. учен. степени канд. с.-х. наук. Махачкала, 2005, 427 с.
211. ХРАПОВА, Н.Г. Перекисное окисление липидов и системы регулирующие его интенсивность. *Биохимия липидов и их роль в обмене веществ*. М., Наука, 1998, с. 147-155.
212. ШАЙДУЛЛИН, И.Н., ВАРНАВСКАЯ, В.А. Сахара для синтетических сред, применяемых при разбавлении семени. *Животноводство*, 1982. № 7, с. 52-53
213. ШЕРГИН, Н.П. Биохимия спермы сельскохозяйственных животных. М. Колос, 1967, 239 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение № 1. Патент на изобретение № 4513





REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. 1460

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Procedeu de stimulare a spermatogenezei la berbeci în extrasezon**

Titulari: **INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE BIOTEHNOLOGII ÎN ZOOTEHNIE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD**

Data depozit: **2019.03.26**
Durata brevetului : **6 ani**

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată



Director General


CHIȘINĂU

Приложение № 3. Патент на изобретение № 4715

REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

**BREVET
DE INVENTIE**

Nr. 4715

Eliberat in temeiul Legii nr. 50/2008 privind protectia inventiilor

Titlul: **Dispozitiv pentru insamantarea artificiala a
ovinelor si caprinelor**

Titular: **INSTITUTUL STIINTIFICO-PRACTIC DE
BIOTEHNOLOGII IN ZOOTEHNIE SI MEDICINA
VETERINARA, MD**

Data depozit: 2018.08.06

Descrierea inventiei, revendicarile si desenele constituie parte
integranta a prezentului brevet de inventie

Director General

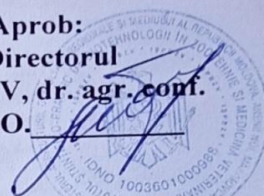
CHIȘINĂU

Приложение № 4. Акты внедрения

Aprob:
Directorul
STE Maximovca
Cociug V.



Aprob:
Directorul
ISPBMV, dr. agr. conf.
Maşner O.



Act
de implementare a cercetărilor științifice al Laboratorului Biotehnologii în
Reproducție și Transfer de Embrioni al Institutului Științifico-Practic de
Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară la fermă de ovine
de prăsilă ÎS „STE Maximovca”

Comisia în componența: colaboratorii Laboratorului „Biotehnologii în Reproducție și Transfer de Embrioni”, Iurcu Iu. cercetător științific superior, Bradu N., Rotari D., Djenjera I., cercetători științifici stagieri și șeful fermei de ovine STE Maximovca Balica I., au întocmit prezentul act de implementare a cercetărilor științifice în perioada 05.05.2020-23.06.2020 la ferma de prăsilă a STE Maximovca.

Implementarea constă în utilizarea metodei de stimulare a spermatogenezei la berbeci în extrasezon, în scopul sporirii nivelului cantitativ și calitativ al spermei colectate de la reproducători cu potențial genetic valoros, prin suplinirea rației furajere de bază cu biopreparatul complex ZooBioR, în cantitate de 5 g la 0,5 kg/ nutreț concentrat în termen de 50 de zile.

Efectul pozitiv al acestei metode este cauzat de suplinirea rației furajere de bază cu ZooBioR care posedă acțiune antioxidantă, stimulează epiteliul germinativ, spermatogeneza, secreția glandelor anexe ale aparatului genital, instinctul genezic la masculi, majorând cantitatea și calitatea spermei obținute de la berbeci în extrasezon.

În rezultat a sporit: volumul ejaculatului cu 0,3 ml ce constituie 50% față de martor, concentrația spermatozoizilor în ejaculat cu 0,64 miliarde/ml sau 29,3% față de martor, mobilitatea spermatozoizilor cu 17,9% și numărul spermatozoizilor cu mișcări rectilinii cu 38,5%.

Comisia a constatat că metodă de stimulare a spermatogenezei la berbeci în extrasezon implementată de către colaboratorii Laboratorului Biotehnologii în Reproducție și Transfer de Embrioni este eficientă și poate fi utilizată și în alte ferme de ovine pentru îmbunătățirea indicilor spermatici la berbeci în extrasezon.

Iurcu Iu., dr.conf.

Bradu N., cerc.șt.st.

Rotari D., cerc.șt.st.

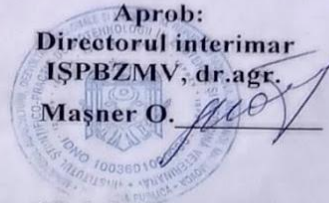
Djenjera I., cerc.șt.st.

Balica I., șef. fermă

Aprob:
Directorul interimar
STE "Maximovca"
Cociug V.



Aprob:
Directorul interimar
ISPBMV, dr. agr.
Maşner O.



**Act
de implementare a însămânțărilor artificiale la
ovinele crescute la ferma de prăsilă a STE "Maximovca"**

Subsemnații: Darie Gr., dr. hab., profesor universitar, șef al laboratorului Biotehnologii în Reproducere și Transfer de Embrioni a ISPBMV, Vacevschi S., dr. m.v., cercetător științific coordonator, Bradu N. și Șmilenco M., cercetători științifici stagieri, Djenjera I., tehnolog în reproducere și Balica I., șeful fermei de ovine a STE "Maximovca", au întocmit prezentul act de implementare a biotehnicii însămânțării artificiale a ovinelor la ferma de prăsilă a STE „Maximovca”.

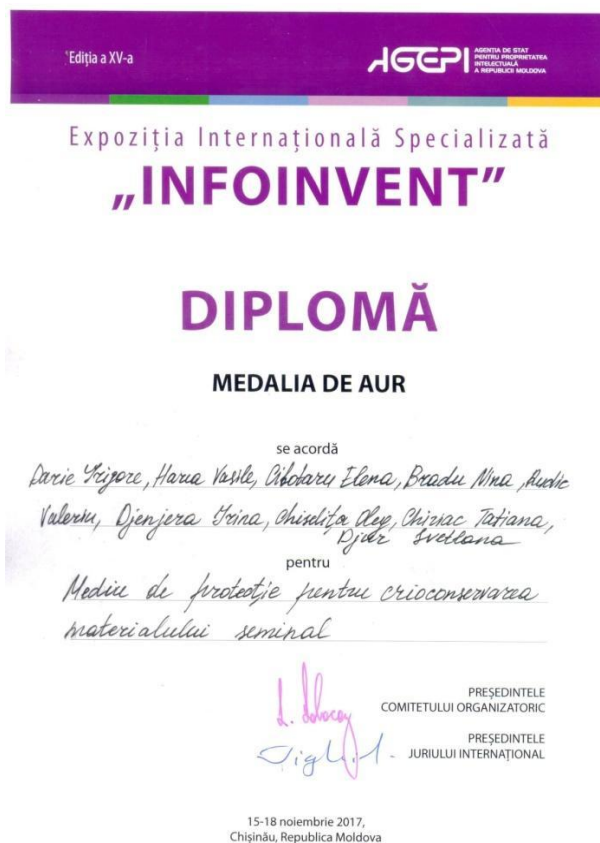
Materialul seminal a fost colectat de la berbecii reproducători nominalizați în planul de potrivire a perechilor. Sperma a fost colectată cu ajutorul vaginului artificial. Au fost supuse prelucrării ejaculatele care corespundeau standardelor: mobilitate nu mai mică de 70% și concentrație nu mai mică de 2 miliarde/ml. Ejaculatele admise pentru prelucrare (diluare, refrigerare, crioconservare) au fost diluate cu mediul de diluție GTJ în componența căruia au fost introduse substanțele bioactive Bio-R și PSS, pregătite în laboratorul Biotehnologii în Reproducere și Transfer de Embrioni a ISPBMV. Însămânțările artificiale a ovinelor au fost efectuate în luna octombrie 2017.

În perioada respectivă au fost însămânțate artificial 245 oi la care eficacitatea însămânțării la prima procedură a constituit 65,34%.

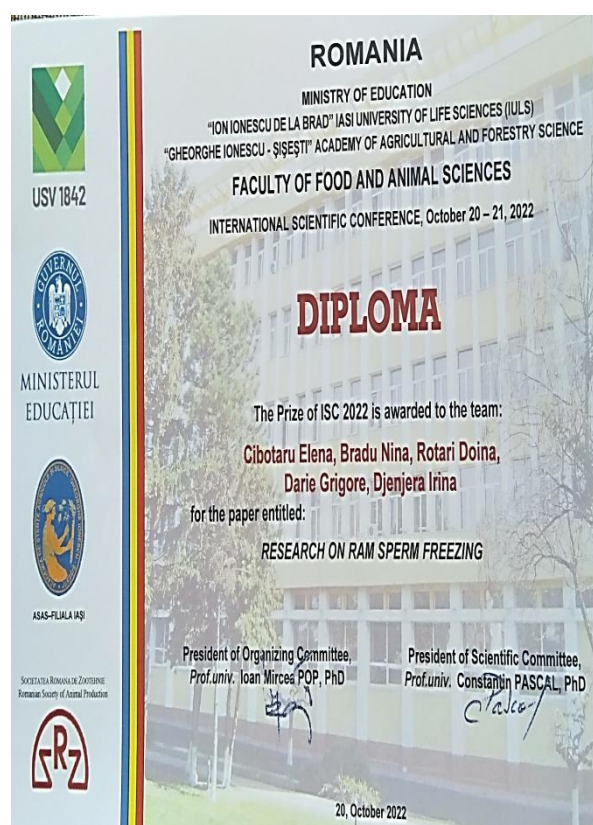
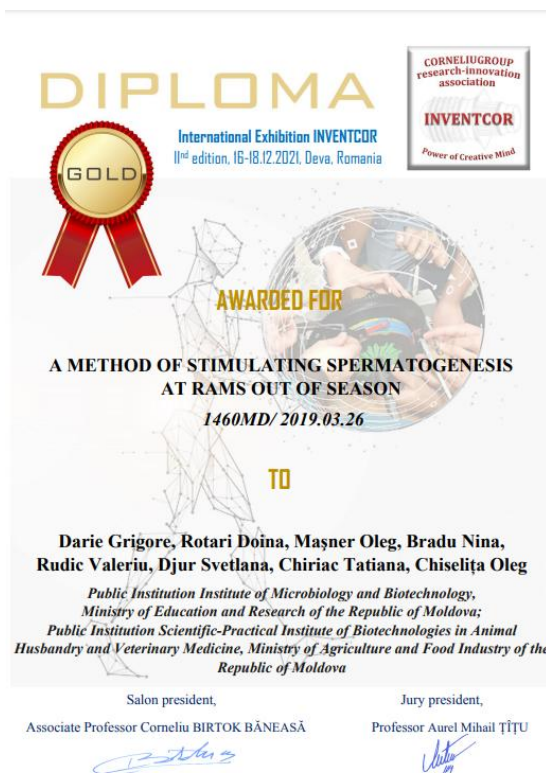
Comisia a constatat, că metoda biotehnică de însămânțări artificiale la ovine propusă de laboratorul Biotehnologii în Reproducere și Transfer de Embrioni a Institutului este eficientă și corespunde normelor zooveterinare.

Darie Gr.
Vacevschi S.
Bradu N
Șmilenco M.
Djenjera I.
Balica I.

Приложение № 5. Дипломы и медали, полученные на национальных и международных конференциях







Medalia de participare la salonul internațional al inovării și cercetării științifice studențești
"Cadet INOVA'20" "Academia Forțelor Terestre"
"Nicolae Bălcescu", România, Sibiu.



DIPLOMA OF BRONZE MEDAL

is awarded to:

Procedures for stimulating spermatogenesis in rams and boars

DARIE Grigore, RUDIC Valeriu, ROTARI Doina, MAŞNER Oleg, BRADU Nina,
CHISELIŢA Oleg, CHISELIŢA Natalia, DJUR Svetlana, CHIRIAC Tatiana,
CIBOTARU Elena, OSIPCIUC Galina, DJENJERA Irina

EURO
INVENT

EURO
INVENT

President of International Jury
Prof. Dr. Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Dr. Ion SANDU

May 22, 2021





ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ

Нижеподписавшаяся, заявляю под личную ответственность, что материалы, представленные в докторской диссертации, являются результатом личных научных исследований и разработок. Осознаю, что в противном случае, буду нести ответственность в соответствии с действующим законодательством.

Браду Нина

Подпись

22.03.2023

CV – ABTOPA



Curriculum vitae Europass

Informații personale

Nume / Prenume

Adresă(e)

Telefon(oane)

Fax(uri)

E-mail(uri)

Naționalitate(-ți)

Data nașterii

Sex

Bradu Nina

nr.5, strada Sportivă, MD-6225, Maximovca, r-nul Anenii
Noi, Republica Moldova

Mobil 067371676

022359350

nina-bradu@mail.ru

moldoveancă

17.09.1977

femenin

Locul de muncă vizat/

Domeniul ocupațional

Institutul Științifico-Practic de Biotehnologii în

Zootehnie și Medicină Veterinară,

laboratorul „Biotehnologia Reproduserii și Transfer de Embrioni”

Experiența profesională

Perioada

Funcția sau postul ocupat

2010-2015

Laborant superior în laboratorul „Biotehnologia
Reproduserii și Transfer de Embrioni” IȘPBZMV.

Educație și formare

Perioada

Funcția sau postul ocupat

2015- prezent

Cercetătoare științifică stagiară în laboratorul
„Biotehnologia Reproduserii și Transfer de Embrioni”
IȘPBZMV.

Aptitudini și competențe personale

Simpozionul Științific cu participare internațională dedicat
aniversării a 60-a de la fondarea Institutului, 29 septembrie-
01 octombrie, Maximovca, 2016. Simpozionul Științific
Internațional „85 ani ai Facultății de Agronomie-realizări și
perspective”, Chișinău, 2018. Simpozionul științific
internațional: „Modern Animal Husbandry – Food Safety
And Durable development” Iași, 2019. Conferința „Cercetări
și inovații în viziunea tinerilor cercetători” „Cadet
INOVA’20”, Sibiu, Romania, 26-28 martie 2020.
Conferința științifico-practică cu participare internațională
„Inovații în zootehnie și siguranța produselor animaliere –
realizări și perspective”. Maximovca, 30 septembrie – 01
octombrie, 2021.

Limba(i) maternă(e)
 Limba(i) străină(e) cunoscută(e)
 Autoevaluare
 Nivel european(*)

**Limba
 Română
 Franceză**

Rusă

Înțelegere		Vorbire		Scriere
Ascultare	Citire	Participare la conversații e	Discurs oral	Exprimar e scrisă
C2	C2	C2	C2	C2
B1	B	A	A	A

(*)Nivelul Cadrului European Comun de Referință Pentru
 Limbi Străine

Competențe și abilități sociale

Spirit de echipă, am experiența muncii în echipa
 laboratorului de cercetare a colaboratorilor instituțiilor de
 cercetare, participare la simpozioane naționale și
 internaționale

Competențe și aptitudini de
 utilizare a calculatorului

MS Office, Power Point, Excel, Internet-mediu

Data completării
 14.02.2023

Titular ,
 Bradu Nina