

СЕЗОННІ ВІДМІННОСТІ СПЕРМІОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТА РІВНЯ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК У НАТИВНИХ ТА КРІОКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДАХ КІЗ ЗААНЕНСЬКОЇ ПОРОДИ

А.О. БОГДАНЮК^{1,2}, Т.О. ЮРЧУК¹, М.П. ПЕТРУШКО¹

¹ Інститут Проблем Кріобіології і Кріомедицини НАН України, м. Харків

² ТОВ «Інститут Сучасних Ветеринарних Технологій», с. Черевки

E-mail: taisiya.yur@gmail.com, petrushkomarina@gmail.com

Сезонність впливає на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин, що робить розмноження молочних кіз природнім шляхом можливим тільки в певний сезон року. Кріоконсервування сперматозоїдів, як складова допоміжних репродуктивних технологій, забезпечує їх гнучкість виконання, що підвищує шанси на збільшення поголів'я. Проте, воно може спричиняти зміну морфофункціональних характеристик та генетичного матеріалу сперматозоїдів. Тому, метою даного дослідження було визначення сезонних змін життєздатності, рухливості та рівня фрагментації ДНК нативних та кріоконсервованих сперматозоїдів кіз. Було використано еякуляти статево зрілих кіз зааненської породи, отримані у парувальний та непарувальний сезони. Для виявлення впливу сезонних відмінностей сім'яної рідини на характеристики кріоконсервованих сперматозоїдів клітини заморожували у складі еякуляту та окремо виділені клітини. Отримані результати дослідження показали, що рухливість сперматозоїдів нативного еякуляту в парувальний сезон була вищою ніж у непарувальний ($p \leq 0,05$). Кріоконсервування призвело до зниження кількості рухливих сперматозоїдів еякуляту та виділеної фракції сперматозоїдів непарувального сезону, та виділеної фракції клітин парувального сезону ($p \leq 0,05$). При порівнянні життєздатності та цілісності ДНК сперматозоїдів відмічалось їх значуще зниження для усіх груп непарувального сезону порівняно із парувальним ($p \leq 0,05$). Було встановлено, що рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів еякуляту тварин у парувальний сезон після кріоконсервування не змінювався порівняно з нативним зразком, тоді як у кріоконсервованих сперматозоїдах виділеної фракції того ж сезону підвищувався ($p \leq 0,05$). Кріоконсервовані сперматозоїди непарувального сезону у складі еякуляту та виділеної фракції мали підвищений рівень фрагментації ДНК порівняно з вихідними характеристиками до заморожування. Таким чином, можна зробити висновок, що склад сім'яної рідини змінюється залежно від парувального сезону, який

впливає на його криозахисні властивості щодо сперматозоїдів під час заморожування еякуляту. Тому, для покращення ефективності штучного осіменіння з використанням кріоконсервованих сперматозоїдів самців кіз зааненської породи рекомендовано збирати та заморожувати еякулят восени та на початку зими.

Ключові слова: сезонність, кріоконсервування, фрагментація ДНК, сперматозоїди самців кіз, сім'яна рідина

Вступ. Більшість сільськогосподарських тварин характеризуються сезонністю у розмноженні (Chemineau, 2007; Dias, 2020.) Наприклад, для кіз помірних широт парувальний сезон припадає на осінь, а період народження козенят – на весну (Fatet 2011). Також відомо, що зміни пір року впливають на морфофункціональні характеристики сперматозоїдів бугаїв, коней, кіз, баранів (Johnson, 2008; Wrench, 2010; Gamboa, 2010; Suliman, 2020; Argebola, 2017; Belkadi, 2017). Тому розмноження таких сільськогосподарських тварин природнім шляхом можливе тільки в певний сезон року, що є економічно не вигідним (Johnson, 2008). Розвиток допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), а саме штучного осіменіння, дозволив підняти продуктивність та використовувати кращий генетичний матеріал для розмноження поголів'я, незалежно від сезону (De Vries, 2005). Кріоконсервування репродуктивних клітин є важливим та необхідним етапом при виконанні ДРТ у тваринництві, оскільки дозволяє накопичити сперматозоїди з найкращими характеристиками та використовувати їх впродовж всього року: розділяти еякулят на кілька спермодоз і ефективно здійснювати штучне осіменіння, створювати кріобанк гамет цінних порід тварин та обмін зразків між господарствами (Shcherbak, 2008; Bailey, 2003; Barbas, 2009; Kopeika, 2019). Проте,

кріоконсервування може спричиняти зміну морфофункціональних характеристик сперматозоїдів: знижувати рухливість та життєздатність клітин, внаслідок пошкодження плазматичної та мембрани акросоми, виникнення аномалій ультраструктурних елементів клітин, підвищення рівня фрагментації ДНК та знижувати частоту настання вагітності (Pavlovych, 2020, Crespo, 2020, Yurchuk, 2021). Внаслідок пошкодження ДНК може бути порушена функція генів, що спричинить блокування розвитку ембріонів на різних етапах онтогенезу. Наразі питання щодо рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів кіз у різні сезони розмноження та можливі зміни цього показника після кріоконсервування сперми/сперматозоїдів залишається відкритим.

Метою дослідження було визначення сезонних змін життєздатності, рухливості та рівня фрагментації ДНК нативних та кріоконсервованих сперматозоїдів кіз.

Матеріали та методи. У дослідженні були використанні еякуляти 5 статевозрілих самців кіз зааненської породи (*Capra hircus hircus*), які вирощували у фермерському господарстві «Тетяна 2011» (с. Усівка, Київська область Україна). Усі маніпуляції з тваринами проводили з дотриманням норм, затверджених Європейською конвенцією з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (м. Страсбург, 1987), Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Україна, 2006) та рішенням Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (протокол №1 від 28 січня 2021 р.). Зразки еякулятів (n = 110) отримували раз в два тижні впродовж парувального (вересень-грудень, n = 40) та непарувального (січень-серпень, n = 70) сезонів за допомогою штучної вагіни («Minitube», Німеччина) з використанням кози в еструсі для приваблення самця.

Одразу після отримання еякуляту визначали концентрацію, рухливість та життєздатність сперматозоїдів. Кількість клітин підраховували у камері «Makler» («Sefi medical instrument», Ізраїль) під світловим мікроскопом «AmScore B120C» («AmScore», США). Рухливими вважали сперматозоїди при швидкості більше 50 мкм за с. Життєздатність клітин

визначали за забарвленням розчину еозин-нігрозину («Magarog», Іспанія) (Agarwal, 2016). На предметне скло наносили краплю сперми та краплю барвника. Після чого робили одразу мазок та висушували. Клітини, що виключали барвник з цитоплазми, вважали життєздатними (без забарвлення), а клітини, що забарвлювались у рожевий колір – нежиттєздатними. У кожному зразку оцінювали забарвлення у 200 клітин, а життєздатність виражали у відсотках.

Кріоконсервували цільний еякулят та виділену фракцію сперматозоїдів. Для цього еякулят розріджували HEPES буфером («WASH», IVF Bioscience, Об'єднане Королівство).

Виділену фракцію сперматозоїдів отримували шляхом центрифугування еякуляту впродовж 10 хв при 325 g. Після чого супернатант видаляли, а до преципітату додавали 100 мкл HEPES буфер («WASH», IVF Bioscience, Об'єднане Королівство).

Заморожування цільного еякуляту та виділених сперматозоїдів здійснювали двоетапним способом (Jiménez-Rabadán P, 2013) з власними модифікаціями. Готували кріозахисне середовище на основі HEPES буферу з додаванням 10 % гліцерину («BASF», Німеччина) та 20 % яєчного жовтку. Для цього еякулят бо виділену фракцію поступово змішували з кріозахисним середовищем у співвідношенні 1 : 1, кінцева концентрація сперматозоїдів складала 200 млн/мл. Суспензію сперматозоїдів із кріопротектором переносили у кріосоломинки об'ємом 0,25 мл («Minitube», Німеччина), еквілібрували 15 хв при кімнатній температурі (+25 °C), після чого охолоджували 2,5 год при +5 °C та 15 хв у парах азоту на відстані 4 см від його дзеркала з подальшим зануренням у рідкий азот. Відігрівали зразки на водяній бані при температурі +37 °C впродовж 30 с. Видаляли кріопротектор шляхом центрифугування, після чого до преципітату додавали HEPES буфер («WASH», IVF Bioscience, Об'єднане Королівство) і оцінювали рухливість, життєздатність та рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів. Після відігріву оцінювали життєздатність за забарвленням еозиннігрозином.

Визначення рівня фрагментації ДНК проводили з використанням набору Halosperm («Halotech», Іспанія) за протоколом, зазначеним

виробником. Принцип визначення зазначеного показника базується на методі SCD (sperm chromatin dispersion) – визначенні дисперсії хроматину сперматозоїдів. (Fernández, 2005) Сперматозоїди іммобілізували в агарозному гелі на предметному скельці, після чого обробляли розчином кислоти для денатурації ДНК, а потім – буфером для лізису мембран та білків. Далі, після фіксації у розчині етанолу, зразки забарвлювали розчином еозину та тіазину для візуалізації диспергованих петель ДНК. Сперматозоїди з фрагментованою ДНК мали дуже малі або зовсім відсутні ореоли дисперсії, тоді, як сперматозоїди з низьким рівнем фрагментації вивільняють петлі ДНК, які утворюють великі ореоли – «хало». Препарати візуалізували під світловим мікроскопом «AmScore V120C» («AmScore», США) та підраховували кількість сперматозоїдів з цілісною та пошкодженою ДНК.

Кожен з отриманих еякулятів було розділено на 4 частини, які склали наступні групи: 1А – нативний еякулят парувального сезону, 2А – виділена з еякуляту фракція сперматозоїдів, 3А – кріоконсервовані нативні еякуляти, 4А – кріоконсервована виділена фракція сперматозоїдів. Групи 1Б – 4Б були розділені за принципом щодо груп 1А–4А, з тією відмінністю, що еякуляти тварин були отримані у непарувальний сезон.

Для статистичної обробки даних використовували програмне забезпечення Origin 8.5 (OriginLab Corporation, США). Дані наводили як середнє значення \pm стандартне відхилення. Для порівняння двох вибірок застосовували непараметричний тест, для порівняння вибірок з ненормальним розподілом – U-критерій Манна-Уїтні, різницю вважали значущою при $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Концентрація сперматозоїдів самців кіз у парувальний сезон складала $(3,09 \pm 0,69) \cdot 10^9$, а у непарувальний – $(1,64 \pm 0,87) \cdot 10^9$ у мл.

Рухливість сперматозоїдів групи 1А складала $(70,43 \pm 11,01) \%$, та була значущо вищою ($p \leq 0,05$), порівняно з групою 1Б $(52,22 \pm 17,16) \%$ (рис. 1). Така ж тенденція спостерігалась і у групах 2А і 2Б. Кріоконсервування призводило до значущого зниження кількості рухливих сперматозоїдів груп 3А, 4А та 4Б

($p \leq 0,05$). При цьому найменша кількість рухливих клітин була зафіксована в групі 4Б.

При порівнянні життєздатності сперматозоїдів відмічали її зниження в усіх групах непарувального сезону порівняно із парувальним ($p \leq 0,05$) (рис. 2). Ми не спостерігали зниження життєздатності клітин груп 2А та 2Б. Найбільші зміни досліджуваного показника відбулися у групі 3Б та 4Б.

Дослідження рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів нативних еякулятів ців у різних парувальних сезонах показало значущу різницю між групами (рис. 3, 4). Так, зазначений показник групи 1Б збільшувався у 2,7 рази, порівняно з групою 1А ($p \leq 0,05$). Як і при дослідженні рухливості та життєздатності було виявлено зниження кількості клітин з цілісною ДНК у всіх групах непарувального сезону порівняно з парувальним. Було встановлено, що рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів групи 3А значущо не змінювався, тоді як в групі 4А – зріс майже на 30%. Пошкодження ДНК сперматозоїдів груп 3 та 4Б значущо збільшувалися до $5,66 \pm 1,90$ та $(7,18 \pm 3,46) \%$ відповідно ($p \leq 0,05$).

Фрагментація ДНК в нативному еякуляті може бути пов'язана з дією природних чинників, таких як сезонність, вік тварин та метаболізм клітин (González-Marín, 2012; Hamilton, 2019). В парувальний сезон, який найчастіше припадає на прохолодну пору року, на сім'яники не діють екзогенні термічні фактори, які можуть негативно впливати на сперматогенез (Crespo, 2020). Показано, що теплове випромінювання на етапі сперматогенезу призводить до порушення правильного формування дисульфідних зв'язків протамінів сперматозоїдів (Hamilton, 2018), що в свою чергу є причиною їх більш легкої денатурації. Внаслідок цього ДНК позбавляється правильної компактизації та втрачає свою цілісність (Love, 1999). Більш того, декомпактизована ДНК стає більш вразливою до дії нуклеаз, які розщеплюють її на фрагменти (Sotolongo, 2005). Тепловий шок також призводить до руйнування сперматозоїдів, під час якого утворюються активні форми кисню (Ball, 2001), які спричиняють оксидативний стрес, що також викликає фрагментацію ДНК (Crespo, 2020).

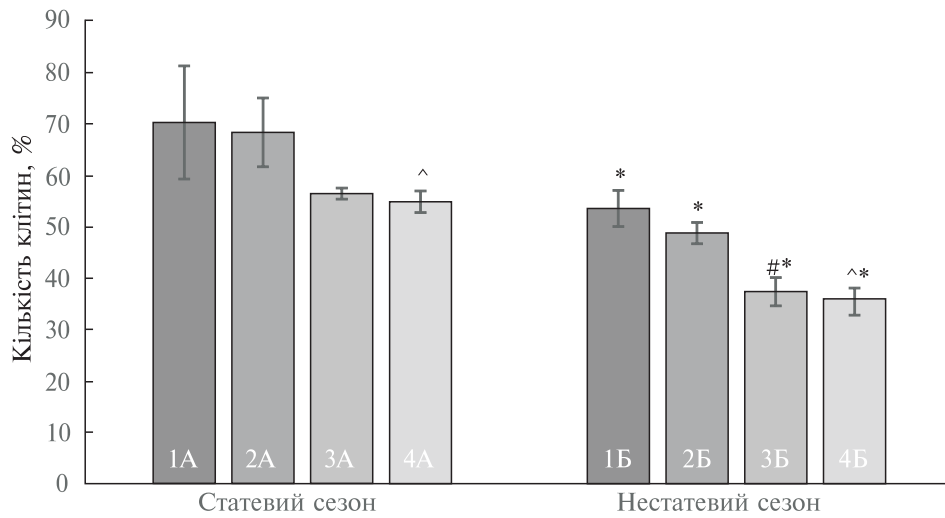


Рис. 1. Рухливість сперматозоїдів самців кіз різних досліджуваних груп. * – різниця значуща порівняно з показником відповідної групи парувального сезону, # – різниця значуща порівняно з відповідним показником групи 1 того ж сезону, ^ – різниця значуща порівняно з відповідним показником групи 2 того ж сезону, $p \leq 0,05$

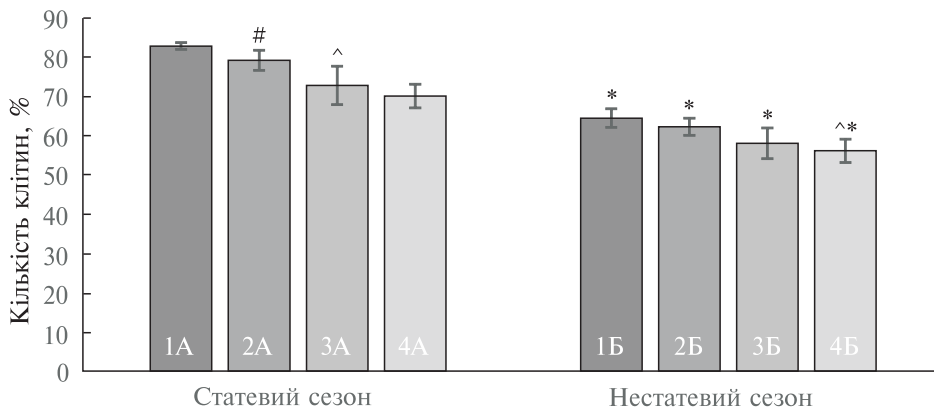


Рис. 2. Життєздатність сперматозоїдів самців кіз різних досліджуваних груп. * – різниця значуща порівняно з показником відповідної групи парувального сезону, # – різниця значуща порівняно з відповідним показником групи 1 того ж сезону, ^ – різниця значуща порівняно з відповідним показником групи 2 того ж сезону, $p \leq 0,05$

В нашому дослідженні сезонність вплинула на декілька основних сперміологічних характеристик. У парувальний сезон концентрація сперматозоїдів в еякуляті, їх рухливість, життєздатність та цілісність ДНК були вищими, порівняно з цими показниками непарувального сезону. Такі дані характерні для інших тварин, наприклад, коней (Gamboa, 2010; Crespo, 2020), верблюдів (Al-Bulushi, 2018; Elsharpony, 2021), оленів (Martinez-Pastor, 2005), бізонів (Krishnakumar, 2015) та буйволів (Shah-

zad, 2020). В той же час, група вчених (Garcia-Macias, 2006) виявила протилежну нашим результатам сезонну залежність рівня фрагментації ДНК у овець, оленя благородного та бурого ведмеда. Автори пояснюють це тим, що у парувальний сезон хроматин менш конденсований, імовірно, через посилений сперматогенез та пришвидшений транзит сперматозоїдів через протоки придатків яєчок. Тобто, сезонна залежність цілісності ДНК сперматозоїдів є видоспецифічною ознакою.

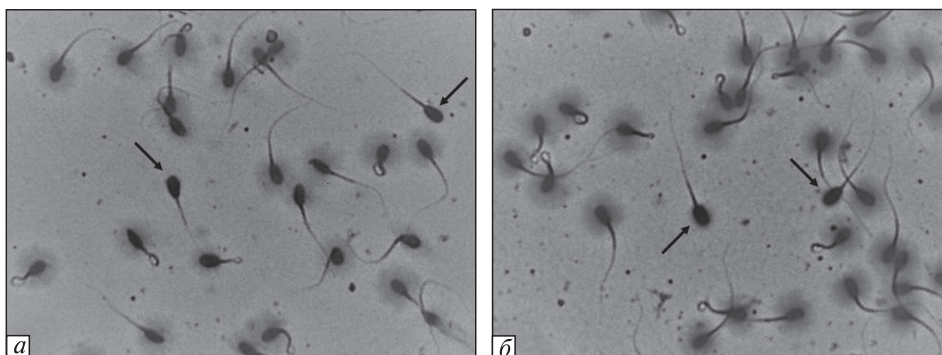


Рис. 3. Мікрофотографії визначення методом SCD рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів нативних еякулятів самців кіз зааненської породи різних парувальних сезонів, *a* – парувальний сезон, *б* – непарувальний сезон. Стрілками зазначено сперматозоїди з фрагментованою ДНК

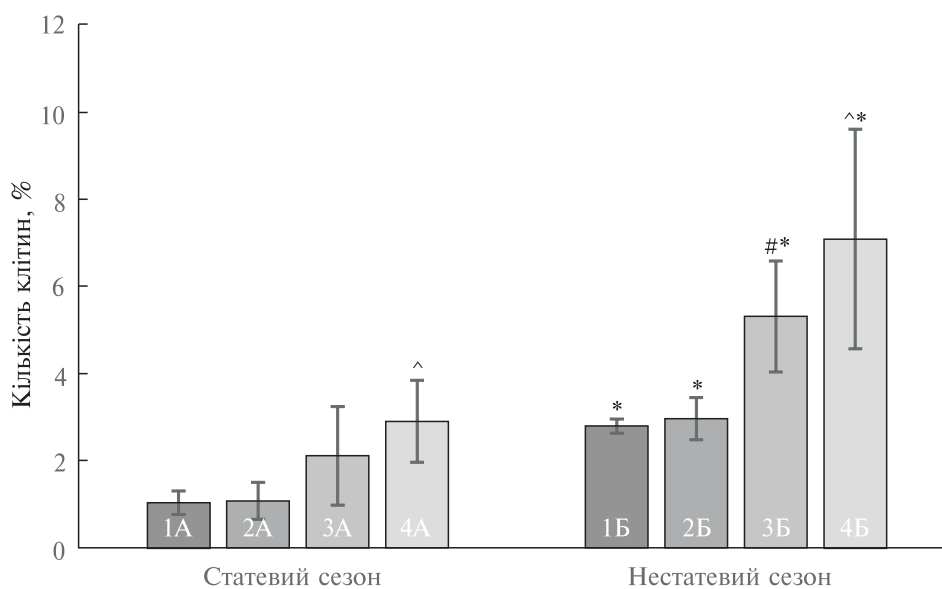


Рис. 4. Рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів самців кіз різних досліджуваних груп. * – різниця значуща порівняно з показником відповідної групи парувального сезону, # – різниця значуща порівняно з відповідним показником групи 1 того ж сезону, ^ – різниця значуща порівняно з відповідним показником групи 2 того ж сезону, $p \leq 0,05$

Показники рухливості, життєздатності та фрагментації ДНК клітин, які були виділені із еякуляту шляхом центрифугування (групи 2А та 2Б) не відрізнялися від таких щодо груп 1А та 1Б, відповідно. Це вказує на те, що виділення фракції сперматозоїдів шляхом однократного центрифугування не призводить до значущих негативних змін функціональних характеристик сперматозоїдів різних парувальних сезонів.

Відомо, що будова хроматину і ДНК сперматозоїдів можуть бути змінені або пошкоджені

ні під час кріоконсервування (Yurchuk, 2021). Пошкодження цілісності ДНК може бути викликане такими факторами, як цитотоксичні речовини, до яких, безумовно, можна віднести розчини кріопротекторів, компоненти розведення сперми та спосіб її отримання, умови зберігання та холодний шок під час заморожування (González-Marín, 2012).

Результати нашого дослідження показали, що кріоконсервування значуще знижувало цілісність ДНК сперматозоїдів у непарувальний

період ($p \leq 0,05$). Це узгоджується з висновками вчених, які показали вплив сезонності на рівень фрагментації ДНК клітин, кріоконсервованих та інкубованих протягом 2–48 год при 37 °C (Lopez-Fernández, 2011).

Заморожування сперматозоїдів нативного еякуляту у парувальний сезон не призводило до збільшення рівня фрагментації ДНК та зниження рухливості сперматозоїдів, на відміну від показників для виділеної фракції гамет того ж сезону ($p \leq 0,05$). З іншого боку кріоконсервування еякуляту або виділених сперматозоїдів у непарувальний сезон призводить до зниження показників рухливості та цілісності ДНК. Це вказує на те, що сім'яна рідина у парувальний сезон має відмінний від непарувального склад, що надає їй більших кріозахисних властивостей, які зменшують ступінь пошкодження ДНК та рухливості сперматозоїдів. Показано, що компоненти сім'яної плазми можуть покращувати кріотолерантність сперматозоїдів. Так, групою чеських вчених (Bubenickova, 2020) було показано, що у сім'яній плазмі коней містяться білки, які здатні позитивно впливати на сперміологічні характеристики після кріоконсервування. Схожі результати були отримані і при кріоконсервуванні сперматозоїдів свиней (Rescigno, 2019) та бугаїв (Zosa, 2021). Більш того, було показано, що деякі компоненти сім'яної плазми, включаючи різні білки, можуть взаємодіяти зі сперматозоїдами і прикріплюватися до їх поверхні, захищаючи тим самим мембрану сперматозоїдів від кріоповшкодження. Ті білки сім'яної плазми, кількість яких збільшувалася в парувальний період, були в основному залучені до регуляції ліпідного обміну, запобіганню передчасної капацитації та захисту від холодового шоку, який збільшує сприйнятливості гамет до окислювального стресу, що призводить до порушення структури плазматичної мембрани, білків та ДНК (Üstüner, 2015, Peris-Frau, 2020). Наявність антиоксидантів у сім'яній рідині має позитивний вплив на настання окислювано-відновленої рівноваги (Li, 2017). Однак, наші дослідження показали позитивний вплив сім'яної рідин в залежності від сезону. Тому необхідним є вивчення того, зміна яких саме компонентів антиоксидантної системи відбу-

вається у парувальні і не парувальні сезони.

Таким чином, на підставі одержаних нами даних можна зробити висновок, що склад сім'яної рідини змінюється залежно від парувального сезону, який впливає на його кріозахисні властивості щодо сперматозоїдів під час заморожування еякуляту. Тому доцільним є кріоконсервування еякуляту, отриманого у парувальний сезон з метою подальшого використання для штучного осіменіння та запліднення *in vitro* незалежно від парувального сезону.

Метою подальших досліджень буде встановлення складу сім'яної рідини, що змінюється між сезонами парування та впливає на кріостійкість ДНК заморожених сперматозоїдів.

Висновки. Основні параметри сперматозоїдів кіз, як то рухливість, життєздатність, цілісність ДНК мають сезонну залежність і знижуються у непарувальний сезон. Кріоконсервування значущо збільшує рівень фрагментації ДНК та знижує життєздатність й рухливість сперматозоїдів самців кіз у непарувальний сезон. Видалення сім'яної рідини з еякуляту призводить до зниження життєздатності кріоконсервованих сперматозоїдів, незалежно від парувального сезону. Кріоконсервування сперматозоїдів, отриманих у парувальний сезон з сім'яною рідиною призводить до збереження їх рухливості та цілісності ДНК. Тому, для покращення ефективності штучного осіменіння з використанням кріоконсервованих сперматозоїдів самців кіз зааненської породи рекомендовано збирати за заморожувати цільний еякулят восени та на початку зими.

Робота виконана за підтримки Національної академії наук України в рамках пріоритетної теми 2.2.6.130 «Оцінка ступеня фрагментації ДНК сперматогенних клітин різних стадій диференціювання як обов'язковий компонент технології їх кріоконсервування».

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Дотримання етичних стандартів. Автори підтверджують відсутність конфлікту інтересів та порушень договору про нерозголошення. Ця стаття не містить жодних досліджень, виконаних на тваринах або людях.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансую-

чих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

SEASONAL DIFFERENCES IN SPERM CHARACTERISTICS AND THE LEVEL OF DNA FRAGMENTATION IN NATIVE AND CRYOPRESERVED SPERM OF SAANEN GOATS

A. Bogdaniuk, T. Yurchuk, M. Petrushko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv
LLC Institute of Contemporary Veterinary Technologies, Cherevki

E-mail: taisiya.yur@gmail.com,
petrushkomarina@gmail.com

Seasonality affects the morphofunctional characteristics of reproductive cells, which makes the natural reproduction of dairy goats possible only in certain seasons. Cryopreservation of sperm, as part of assisted reproductive technologies, provides their flexibility, which increases the chances of increasing the number of livestock. However, it can cause changes in the morphofunctional characteristics and genetic material of sperm. Therefore, the aim of this study was to determine seasonal changes in viability, motility and DNA fragmentation level of native and cryopreserved goat sperm. The experiment was conducted using ejaculates of sexually mature male goats of Saanen breed, obtained in breeding and non-breeding seasons. To detect the effect of seasonal differences of seminal plasma on the characteristics of cryopreserved sperm, cells were cryopreserved in ejaculate and following isolation. The results of the study showed that the motility of native ejaculate sperm in the breeding season was higher than in the non-breeding season ($p \leq 0.05$). Cryopreservation led to a decrease in the number of motile sperm of ejaculate and the selected fraction of sperm in the non-breeding season, and the selected fraction of cells in the breeding season ($p \leq 0.05$). When comparing the viability and integrity of sperm DNA, there was a significant decrease in all groups in the non-breeding season compared to the breeding season ($p \leq 0.05$). It was found that the level of DNA fragmentation of goat ejaculate sperm in the breeding season after cryopreservation did not change compared to the native sample, while in cryopreserved sperm of the selected fraction of the same season increased ($p \leq 0.05$). Cryopreserved spermatozoa of the non-breeding season in the ejaculate and isolated fraction had an increased level of DNA fragmentation compared to baseline before cryopreservation. Thus, it can be concluded that the composition of semen liquid varies depending on the mating season, which affects its cryoprotective properties against spermatozoa during

the ejaculate freezing. Therefore, it is recommended to collect whole ejaculate by freezing in autumn and early winter to improve the effectiveness of artificial insemination using cryopreserved sperm of male goats of Saanen breed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. (2016) Eosin-Nigrosin Staining Procedure Andrological Evaluation of Male Infertility: 73–77. doi:10.1007/978-3-319-26797-5_8
- Al-Bulushi S, Manjunatha B, de Graaf S, Rickard J. (2019) Reproductive seasonality of male dromedary camels *Animal Reproduction Science* 202:10–20. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.12.013
- Arrebola F, Abecia J. (2017) Effects of season and artificial photoperiod on semen and seminal plasma characteristics in bucks of two goat breeds maintained in a semen collection center *Veterinary world* 10(5): 521–525. doi.org/10.14202/vetworld.2017.521-525
- Bailey J, Morrier A, Cormier N. (2003) Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species *Canadian J Animal Sci* 83:393–401. doi: 10.4141/a03-024
- Ball B, Vo A, Baumber J. (2001) Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa *Amer J Vet Res* 62:508–515. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.508
- Barbas J, Mascarenhas R. (2008) Cryopreservation of domestic animal sperm cells *Cell and Tissue Banking* 10:49–62. doi: 10.1007/s10561-008-9081-4
- Belkadi S, Safsaf B, Heleili N et al. (2017). Seasonal influence on sperm parameters, scrotal measurements, and serum testosterone in Ouled Djellal breed rams in Algeria *Veterinary World* 10(12):1486–1492. doi: 10.14202/vetworld.2017.1486-1492
- Bubenickova F, Postlerova P, Simonik O et al. (2020) Effect of Seminal Plasma Protein Fractions on Stallion Sperm Cryopreservation *Inter J Mol Sci* 21:6415. doi: 10.3390/ijms21176415
- Chemineau P, Malpoux B, Brillard J, Fostier A. (2007) Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals *Animal* 1:419–432. doi: 10.1017/s1751731107691873
- Crespo F, Quicones-Pérez C, Ortiz I et al. (2020) Seasonal variations in sperm DNA fragmentation and pregnancy rates obtained after artificial insemination with cooled-stored stallion sperm throughout the breeding season (spring and summer). *Theriogenology* 148:89–94. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.032
- De Vries A, Steenholdt C, Risco C. (2005). Pregnancy Rates and Milk Production in Natural Service and Artificially Inseminated Dairy Herds in Florida and Georgia *J Dairy Sci* 88(3):948–956. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(05)72762-4

- Dias J, Veloso C. (2020) A influncia do fotoperiodo na reproduzro do macho caprino e ovino Research, Society and Development 9:e4359108243. doi: 10.33448/rsd-v9i10.8243
- Elsharnoby H, Kandil O, Abu-Elnaga H. (2021) Dromedary camel epididymal sperm characteristics at breeding and non-breeding seasons Al-Azhar Bulletin of Science 32:1–9. doi: 10.21608/absb.2021.67232.1104
- Fatet A, Pellicer-Rubio M, Leboeuf B. (2011) Reproductive cycle of goats Anim Reprod Sci 124:211–219. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.029
- Fernández J, Muriel L, Goyanes V. (2005) Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertility and Sterility 84(4):833–842. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.089
- Gamboa S, Rodrigues A, Henriques L et al. (2010) Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa Theriogenology 73:950–958. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.023
- Garcia-Macias V, Martinez-Pastor F, Alvarez M et al. (2006) Seasonal Changes in Sperm Chromatin Condensation in Ram (*Ovis aries*), Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and Brown Bear (*Ursus arctos*). J Androl 27:837–846. doi: 10.2164/jandrol.106.000315
- González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. (2012) Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. International J Mol Sci 13:14026–14052. doi: 10.3390/ijms131114026
- Jiménez-Rabadán P, Ramyn M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A et al. (2013) Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation Cryobiology. 67(3):251–257. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.08.002.
- Hamilton T, Assumpção M (2019) Sperm DNA fragmentation: causes and identification. Zygote 28:1–8. doi: 10.1017/s0967199419000595
- Hamilton T, Siqueira A, Castro L et al. (2018) Effect of Heat Stress on Sperm DNA: Protamine Assessment in Ram Spermatozoa and Testicle. Oxidative Med Cell Longevity 2018:1–14. doi: 10.1155/2018/5413056
- Johnson S, Jones R. (2008). A Stochastic Model to Compare Breeding System Costs for Synchronization of Estrus and Artificial Insemination to Natural Service The Professional Animal Scientist 24(6):588–595. doi: 10.15232/s1080-7446(15)30909-8
- Kopeika EF, Petrushko MP, Piniayev VI et al. (2019) Cryopreservation of Reproductive Cells and Embryos of Laboratory, Agricultural and Wild Animals. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 29:3–18. doi: 10.15407/cryo29.01.003
- Krishnakumar S, Whiteside DP, Elkin B et al. (2015) Effect of reproductive seasonality on gamete quality in the North American bison (*Bison bison bison*). Reproduction in domestic animals. Zucht-hygiene 50:206–213. doi: 10.1111/rda.12471
- Li J, Tvarijonaviute I, Molina A et al. (2018) Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. Theriogenology 107:27–35. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.035
- Lopez-Fernández, C, Johnston SD, Gosálbez A et al. (2011) Seasonal changes in sperm DNA fragmentation of Murciano-Granadina goats: The compelling case for dynamic assessment Small Ruminant Res 100:50–53. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.05.006
- Love CC, Kenney RM. (1999) Scrotal Heat Stress Induces Altered Sperm Chromatin Structure Associated with a Decrease in Protamine Disulfide Bonding in the Stallion. Biology of Reproduction 60:615–620. doi: 10.1095/biolreprod60.3.615
- Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M et al. (2005) Season effect on genitalia and epididymal sperm from Iberian red deer, roe deer and Cantabrian chamois Theriogenology 63:1857–1875. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.006
- Paramio MT, Izquierdo D. (2014) Current status of in vitro embryo production in sheep and goats Reproduction in domestic animals 49:37–48. doi: 10.1111/rda.12334
- Pavlovych O, Hapon H, Yurchuk T et al. (2020) Ultrastructural and functional characteristics of human spermatozoa after cryopreservation by vitrification. Probl Cryobiol Cryomed 30:24–33. doi: 10.15407/cryo30.01.024
- Recuero S, Fernandez-Fuertes B, Bonet S et al. (2019) Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa Theriogenol 137:36–42. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.035
- Peris-Frau P, Soler AJ, Iniesta-Cuerda M et al. (2020) Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality Inter J Mol Sci21:2781. doi: 10.3390/ijms21082781
- Shahzad Q, Waqas M, Pu L et al. (2020) Seasonality and photoperiod influence in vitro production of buffalo embryos Reprod Domestic Anim 55:1115–1123. doi: 10.1111/rda.13749
- Shcherbak O, Trotskii P, Zyuzyun A. (2008) Biotechnologichni metody odezhannya i zberihannya hamet sil'skohospodars'kykh tvaryn. In: Faktory eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv, Vol. 5. Kyiv: Logos, pp. 382–385
- Sotolongo B, Huang TTF, Isenberger E et al. (2005) An endogenous nuclease in hamster, mouse and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments

- J Androl 26:272–280. doi: 10.1002/j.1939-4640.2005.tb01095.x
- Suliman Y, Becker F, Tuchscherer A et al. (2020). Seasonal variations in quantitative and qualitative sperm characteristics in fertile and subfertile stallions Arch Anim Breed 63(1):145–154. doi.org/10.5194/aab-63-145-2020
- Üstüner B, Nur Z, Alçay S et al. (2015) Effect of freezing rate on goat sperm morphology and dna integrity Turkish J Vet Anim Sci 39:110–114. doi: 10.3906/vet-1407-70
- Wrench N, Pinto C, Klinefelter G et al. (2010) Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen Anim Rep Sci 119(3-4):219–227. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.02.007
- Yurchuk TO, Pavlovich OV, Gapon GO et al. (2021) Lipid peroxidation and DNA fragmentation in fresh and cryopreserved spermatozoa of men at different spermatogenesis state Ukr Biochem J 93:24–29. doi: 10.15407/ubj93.03.024
- Yurchuk T, Petrushko M, Gapon A et al. (2021) The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia Cryobiology 100:117–124. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.02.009
- Zoca GB, Celeghini ECC, Pugliesi G et al. (2021) Influence of seminal plasma during different stages of bovine sperm cryopreservation Reprod in Domestic Anim 56:872–883. doi: 10.1111/rda.13928

Надійшла в редакцію 29.10.21
Після доопрацювання 07.04.22
Прийнята до друку 18.09.22