

УДК 57.086.13:612.616:636.2

Ю.Ю. Шахова^{1,*}, А.П. Палій^{2,3}, А.П. Палій³,
О.І. Шкромата⁴, Ю.В. Мусієнко⁴, І.В. Бондаренко⁴

Вплив способів розморожування сперми бугаїв на її якість

UDC 57.086.13:612.616:636.2

Y.Y. Shakhova^{1,*}, A.P. Paliy^{2,3}, A.P. Paliy³,
O.I. Shkromada⁴, Y.V. Musiienko⁴, I.V. Bondarenko⁴

Influence of Ways to Thaw Bull Sperm on Its Quality

Ключові слова: сперма, розморожування, температура, пасти, облицьовані гранули.

Key words: semen, thawing, temperature, sequins, lined granules.

З метою консервування різних біологічних об'єктів низькі температури дуже широко використовуються у сільському господарстві, особливо у організації штучного осіменіння тварин [4, 8]. За швидкого та глибокого заморожування сперми тварин вдається досягти збереження її життєздатності та основних біологічних властивостей, протягом тривалого часу зберігати даний біологічний матеріал для подальшого використання у тваринництві [2, 3]. У біотехнології репродукції великої рогатої худоби найбільшого поширення набуло кріоконсервування біологічного матеріалу у рідкому азоті в облицьованих гранулах і пастах [1, 5, 6]. Для розморожування кріоконсервованої у рідкому азоті сперми бугаїв-плідників запропоновано цілу низку способів, які зумовлюють застосування різних пристроїв та режимів їх використання. Так, класичні рекомендації щодо розморожування кріоконсервованої сперми передбачають використання біотермостата з температурою води 37,0...37,5°C [9]. Сперму тварин рекомендують розморожувати у водяній бані з постійним током теплоносія за температури 70,0°C з експозицією 7 с та подальшим перенесенням до водяної бані з температурою 37,4°C [7]. Проте слід зазначити, що рекомендовані умови відтаювання спермодоз не повною мірою забезпечують процес міграційної рекристалізації та дію гіпертонічних розчинів на мембрани і цитоплазму сперматозоїдів, попереджуючи їх загибель, що сприяло б підвищенню показників рухливості й абсолютного показника виживаності сперміїв.

Low temperatures are largely used in agriculture, especially for artificial insemination of animals to preserve various biological objects [3, 8]. With rapid and deep freezing of animal sperm, it is possible to maintain its viability and basic biological traits, to store this biological material for a long time to be further applied in animal husbandry [1, 2]. In biotechnology of cattle reproduction, cryopreservation of biological material in liquid nitrogen in coated granules and pellets has become the most widespread [5, 4, 6]. To thaw the cryopreserved in liquid nitrogen sperm of breeding bulls, numerous methods have been proposed that determine the use of different devices and modes of their application. Thus, the classic recommendations for thawing cryopreserved sperm include the use of a biotermostat with a water temperature of 37.0...37.5°C [9]. Animal sperm is recommended to be thawed in a water bath with a constant heat carrier stream at a temperature of 70.0°C with a 7 s exposure and subsequent transfer to a 37.4°C water bath [7]. However, it should be noted that the recommended conditions for thawing of sperm doses do not completely ensure the migratory recrystallization and effect of hypertonic solutions on sperm membranes and cytoplasm, preventing their death, which would increase motility and absolute spermatozoa survival.

The purpose of this research was to investigate the effectiveness of bull semen thawing at different temperatures.

The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On Protection of Animals

¹ Луганський національний аграрний університет, м. Старобільськ

² Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

³ Харківський національний технічний університет сільського господарства імені Петра Василенка, м. Харків

⁴ Сумський національний аграрний університет, м. Суми

¹ Luhansk National Agrarian University, Starobilsk

² National Scientific Center 'Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine', Kharkiv

³ Kharkiv Petro Vasylenko National Technical University of Agriculture, Kharkiv

⁴ Sumy National Agrarian University, Sumy

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Слобожанська, 68, м. Старобільськ, Україна 92703;
тел.: (+38 097) 498-29-47
електронна пошта: yuliaschach@ukr.net

*To whom correspondence should be addressed:

68, Slobozhanska str., Starobilsk, Ukraine 92703;
tel.: +380 97 498 2947
e-mail: yuliaschach@ukr.net

Надійшла 17.08.2020

Прийнята до друку 31.08.2021

Received August, 17, 2020

Accepted August, 31, 2021

© 2021 Y. Y. Shakhova, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Мета роботи – дослідження ефективності розморожування сперми бугаїв за різних температурних режимів.

Експерименти були проведені відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження (№ 3447 – IV від 21.02.2006 р.) з дотриманням вимог комітету з біоетики Луганського національного аграрного університету, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

У досліджах застосовували сперму, отриману на племпідприємствах від бугаїв-плідників симентальської породи, заморожену як у пастах (французька технологія), так і облицьованих гранулах (харківська технологія), зберігали протягом 6 місяців у посудині Дьюара у рідкому азоті за температури -196°C . Результати досліджень опрацьовували методом варіаційної статистики. Для визначення рівня значущості (p) використовували значення критерію вірогідності за Стьюдентом.

Визначення якісних показників розмороженої сперми залежно від ступеня її розбавлення. Розморожування облицьованих гранул і паєт проводили на водяній бані за температури 38°C . Після розморожування облицьованих гранул сперму розбавляли середовищем № 2 за харківською технологією (лактоза $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$ – 1,67 моль/л; натрій лимоннокислий, тризаміщений, п'ятиводний $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 5.5 \text{H}_2\text{O}$ – 0,039 моль/л; гліцерин $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ – 0,51 моль/л; вода дистильована – 1000,0 мл) та «AndroMed» («Minitub GmbH», Німеччина) до вмісту 7,5; 3,75 і $1,87 \times 10^6$ кл / дозу в об'ємі 0,25 мл. Контролем слугувала нерозбавлена сперма з вмістом 15×10^6 кл / дозу в об'ємі 0,25 мл. Після розморожування сперму перевіряли на рухливість (кількість сперматозоїдів у еякуляті з прямолінійним поступальним рухом, виражали у балах від 0 до 10 або відсотках від 1 до 100); виживаність (сума показників руху сперматозоїдів (бал, відсоток) за інтервал часу (години) від отримання сперми до повної адинамії (смерті клітин) та абсолютний показник виживаності (АПВ, сума добутків із показників тривалості часу виживання (година) і зниження рухливості (бал, відсоток) сперматозоїдів від отримання сперми до їх повної адинамії (смерті)), в умовних одиницях (ум. од.)) (табл. 1).

З даних табл. 1 видно, що після розведення деконсервованої сперми в облицьованих гранулах до $7,5 \times 10^6$ кл / дозу прямолінійно рухливих спермійв (ПРС) у дозі 0,25 мл рухливість була значуще нижче на 0,99 бала (16,0%) порівняно з контролем, при розведенні до $3,75 \times 10^6$ кл / дозу – на 1,09 бала

Against Cruelty (№. 3447 – IV of 21.02.2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of Luhansk National Agrarian University, consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

We studied the Simmental cattle semen obtained at breeding enterprises, frozen in both pellets (French technique) and coated granules (Kharkiv technique), stored for 6 months in a Dewar vessel in liquid nitrogen at a temperature of -196°C . The research results were processed by the variation statistics. To determine the level of significance (p) the Student's probability criterion was used.

Examining the quality of thawed sperm depending on its dilution rate. Coated granules and pellets were warmed in a 38°C water bath. After thawing of the coated granules, the semen was diluted with medium №2 according to the Kharkiv technique (lactose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$ – 1.67 mol / l; sodium citrate, trisubstituted, pentahydrate $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 5.5 \text{H}_2\text{O}$ – 0.039 mol / l, glycerol $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$; 51 mol / l, distilled water – 1,000.0 ml) and 'AndroMed' ('Minitub GmbH', Germany) to a content of 7.5; 3.75 and 1.87×10^6 cells /dose in a volume of 0.25 ml. The control was undiluted sperm containing 15×10^6 cells / dose in a volume of 0.25 ml. After thawing, the sperm was examined for motility (amount of sperm in forward progressive moving ejaculate, expressed in points from 0 to 10 or in percentage from 1 to 100); survival (sum of sperm movement indices (score, percentage) for the time interval (hours) from sperm to complete adynamia (death) of cells) and absolute survival rate (APV, sum of products from the indices of survival time (hour) and reduced motility (score, percentage)) sperm from sperm to their complete adynamia (death)), conventional units (conv. units)) (Table 1).

Table 1 shows that after dilution of warmed sperm in coated granules to 7.5×10^6 cells / dose of forward progressive motile spermatozoa (FPMS) at a dose of 0.25 ml, motility was significantly lower by 0.99 points (16.0%) compared to the control, when diluted to 3.75×10^6 cells / dose – by 1.09 points (17.7%), to 1.87×10^6 cells / dose – by 2.33 points (37.8%). Motility in the samples containing 7.5×10^6 FPMS at a dose of 0.25 ml was slightly higher than in those containing 3.75×10^6 cells / dose – by 0.1 points (1.93%) and significantly higher than in samples with 1.87×10^6 cells / dose – by 1.34 points (25.9%).

When diluting the thawed semen in pellets, a similar decrease in motility was observed immediately after dilution: in the samples containing 7.5×10^6 cells / dose of FPMS in 0.25 ml – by 1.34 points (23.3%); 3.75×10^6 cells / dose – by 2.4 points (41.6%); 1.87×10^6 cells



Таблиця 1. Вплив ступеня розбавлення деконсервованої сперми бугаїв на її якість ($n = 9$)

Table 1. Influence of dilution rate for warmed bull sperm on its quality ($n = 9$)

Концентрація спермій, 10^6 /доза Concentration of spermatozoa	Облицьовані гранули Coated granules			Пастки Pellets		
	Рухливість, бали Mobility, points	Виживаність, година Survival, hr	АПВ, ум. од. ASR, conv. unit	Рухливість, бали Mobility, points	Виживаність, година Survival, hr	АПВ, ум. од. ASR, conv. unit
15,00 (контроль) 15,00 (control)	6,16 ± 0,12	8,0 ± 0,1	24,37 ± 0,60	5,77 ± 0,02	8,0 ± 0,0	26,53 ± 0,50
7,50	5,17 ± 0,09*	6,4 ± 0,2*	15,33 ± 0,32*	4,43 ± 0,19*	6,3 ± 0,2*	17,23 ± 1,46*
3,75	5,07 ± 0,03*	5,3 ± 0,1*	13,23 ± 0,20* [#]	3,37 ± 0,30*, [§]	5,9 ± 0,1*	14,2 ± 0,72*
1,87	3,83 ± 0,09* ^{#,§}	3,7 ± 0,2* ^{#,§}	8,00 ± 0,40* ^{#,§}	2,63 ± 0,12* ^{#,§}	4,1 ± 0,1* ^{#,§}	8,27 ± 0,75* ^{#,§}

Примітки: відмінності значущі порівняно з контролем 15×10^6 кл / дозу, $p < 0,001$ (*); порівняно з $7,5 \times 10^6$ кл / дозу, $p < 0,001$ (#), $p < 0,01$ (§); порівняно з $3,75 \times 10^6$ кл / дозу, $p < 0,001$ (&), $p < 0,01$ (^).

Notes: differences are significant compared to the control of 15×10^6 cells / dose, $p < 0.001$ (*); compared with 7.5×10^6 cells / dose, $p < 0.001$ (#), $p < 0.01$ (§); compared with 3.75×10^6 cells / dose, $p < 0.001$ (&), $p < 0.01$ (^).

(17,7%), до $1,87 \times 10^6$ кл / дозу – на 2,33 бала (37,8%). Рухливість у пробах, що містять $7,5 \times 10^6$ ПРС у дозі 0,25 мл, була дещо вищою, ніж у пробах, які містять $3,75 \times 10^6$ кл / дозу – на 0,1 бала (1,93%) і значуще вищою, ніж у пробах із $1,87 \times 10^6$ кл / дозу – на 1,34 бала (25,9%).

При розведенні деконсервованої в пастках сперми спостерігалось аналогічне зниження показника рухливості відразу після розведення: у пробах, які містять $7,5 \times 10^6$ кл / дозу ПРС в 0,25 мл – на 1,34 бала (23,3%); $3,75 \times 10^6$ кл / дозу – на 2,4 бала (41,6%); $1,87 \times 10^6$ кл / дозу – на 3,14 бала (54,4%) порівняно з контрольними зразками, які містять 15×10^6 кл / дозу. Показник рухливості був істотно вищим у дослідній групі з розбавленням до $7,5 \times 10^6$ кл / дозу, ніж у групах із розбавленням до $3,75 \times 10^6$ кл / дозу – на 1,06 бала (23,9%), і до $1,87 \times 10^6$ кл / дозу – на 1,8 бала (40,6%). Зі збільшенням ступеня розведення спостерігається зниження рухливості спермій. Виживаність після розведення деконсервованої в облицьованих гранулах сперми до $7,5 \times 10^6$ кл / дозу в 0,25 мл знизилася на 1,6 години порівняно з контролем (20,0%), після розбавлення до $3,75 \times 10^6$ кл / дозу – на 2,7 години (33,7%), до $1,87 \times 10^6$ кл / дозу – на 4,3 години (53,7%), що істотно нижче контролю з вмістом $15,0 \times 10^6$ рухливих спермій ($P > 0,999$). Виживаність статевих клітин у зразках із $7,5 \times 10^6$ кл / дозу була істотно вище таких із $3,75$ і $1,87 \times 10^6$ кл / дозу на 1,1 (17,2%) і 2,7 години (42,2%) відповідно.

Після розбавлення деконсервованої у пастках сперми до $7,5 \times 10^6$ кл / дозу виживаність ПРС знизилася на 1,7 годин (21,25%), до $3,75 \times 10^6$ кл / дозу – на 2,1 години (26,25%), до $1,87 \times 10^6$ кл / дозу –

/ dose – 3.14 points (54.4%) compared with the control samples containing 15×10^6 cells / dose. The motility was significantly higher in the experimental group with dilution up to 7.5×10^6 cells / dose if compared with the groups with dilution up to 3.75×10^6 cells / dose – by 1.06 points (23.9%), and up to 1.87×10^6 cells / dose – by 1.8 points (40.6%). With increasing the dilution, there is a decrease in sperm motility. Survival after dilution of the thawed sperm in coated granules to 7.5×10^6 cells / dose in 0.25 ml decreased by 1.6 hours compared with the control (20.0%), after dilution to 3.75×10^6 cells / dose – by 2.7 hours (33.7%), up to 1.87×10^6 cells / dose – by 4.3 hours (53.7%), which is significantly lower than the control with a content of 15.0×10^6 motile sperm ($P > 0.999$). The survival of gametes in the samples with 7.5×10^6 cells / dose was significantly higher than those with 3.75 and 1.87×10^6 cells / dose by 1.1 (17.2%) and 2.7 hours (42.2 %) respectively.

After dilution of sperm preserved in pellets to 7.5×10^6 cells / FPMS dose, their survival decreased by 1.7 hours (21.25%), to 3.75×10^6 cells / dose – by 2.1 hours (26.25 %), up to 1.87×10^6 cells / dose – by 3.9 hours (48.75%), which is significantly lower than the survival in control samples containing 15.0×10^6 cells / dose (8 hours). Survival in samples containing 7.5×10^6 cells / dose was significantly higher than in the presence of 3.75×10^6 cells / dose (6.3%) and higher than in the samples with 1.87×10^6 cells / dose (at 34.9%). In control samples of thawed sperm in the coated granules APV was significantly higher (24.37 conv. units) than in experimental samples containing 7.5×10^6 cells / dose – by 9.04 conv. units from (37.1%), 3.75×10^6 cells / dose – 11.14 conv. units from (45.7%), 1.87×10^6 cells / dose – at 16.37 conv. units



на 3,9 години (48,75%), що істотно нижче виживаності в контрольних зразках з вмістом $15,0 \times 10^6$ кл / дозу (8 годин). Виживаність у пробах із вмістом $7,5 \times 10^6$ кл / дозу була суттєво вища, ніж з наявністю $3,75 \times 10^6$ кл / дозу (на 6,3%) і вища, ніж у пробах із $1,87 \times 10^6$ кл / дозу (на 34,9%). У контрольних зразках розмороженої в облицьованих гранулах сперми АПВ був значуще вищим (24,37 ум. од.), ніж у дослідних зразках, що містять $7,5 \times 10^6$ кл / дозу – на 9,04 ум. од. (37,1%), $3,75 \times 10^6$ кл / дозу – на 11,14 ум. од. (45,7%), $1,87 \times 10^6$ кл / дозу – на 16,37 ум. од. (67,2%). Спостерігається подібна закономірність зниження АПВ сперми, деконсервованої у паєтах, із аналогічним збільшенням ступеня розбавлення. Так, при розбавленні сперми до $7,5 \times 10^6$ кл / дозу АПВ був нижче на 9,3 ум. од. (35,1%), до $3,75 \times 10^6$ кл / дозу – на 12,33 ум. од. (46,5%), до $1,87 \times 10^6$ кл / дозу – на 18,26 ум. од. (68,8%), ніж у контролі – у 26,53 ум. од. ($P > 0,999$). Зі збільшенням ступеня розбавлення у вказаних межах спостерігається значуще закономірне зниження АПВ спермійв як за харківською, так і французькою технологіями з використанням середовища «AndroMed» («Minitub GmbH»).

Дослідження ефективності розморожування сперми бугаїв за різних температурних режимів. З метою розморожування консервованої сперми у водяній бані застосовували три технологічні режими: температура $38^\circ\text{C} - 15$ с (контроль); $56^\circ\text{C} - 7$ с (дослід 1); $70^\circ\text{C} - 6$ с (дослід 2). Для прискорення процесу розморожування було проведено деконсервування за аналогічних температур в умовах постійного руху води (+РВ) у бані за експозиції 10 с (38°C), 6 с (56°C), 5 с (70°C) (табл. 2).

З даних табл. 2 видно, що під час деконсервування паєт за температури 38°C (+РВ), 56°C (+РВ), 70°C та 70°C (+РВ) спостерігалось значуще підвищення рухливості на 0,6; 0,87; 0,68 та 0,91 бали відповідно у порівнянні з контролем. Виживаність у годинах суттєво збільшилася порівняно з контролем на 0,5 години при розморожуванні за температури 56°C , 56°C (+РВ) та 70°C (+РВ). Після розморожування при 38°C (+РВ), 56°C , 56°C (+РВ), 70°C , 70°C (+РВ) порівняно з контролем АПВ був більший на 1,27; 2,65; 2,20 та 4,54 ум. од. відповідно.

У зразках з облицьованими гранулами, розморожених при 38°C (+РВ), 56°C (+РВ), 70°C (+РВ), спостерігалась суттєво вища порівняно з контролем рухливість на 0,65; 0,87 та 0,75 бали. Аналіз виживаності показав вищі значення у облицьованих гранулах, розморожених при 56°C (+РВ) та 70°C (+РВ). Виживаність клітин у цих групах була на 0,5 години більшою, ніж у контролі. Слід зазначити, що після розморожування кріоконсервованої в паєтах сперми у водяних банях із температурою 56 та 70°C при

from (67.2%). There is a similar pattern of decrease in APS of sperm thawed in pellets, with a similar increase in the dilution rate. Thus, when diluting semen to 7.5×10^6 cells / dose, APS was lower by 9.3 conv. units from (35.1%), up to 3.75×10^6 cells / dose – by 12.33 conv. units from (46.5%), up to 1.87×10^6 cells / dose – by 18.26 um. from (68.8%) than in the control – 26.53 conv. units from ($P > 0.999$). With a rise in dilution rate within these limits, there is a significant, natural decrease in the APS of sperm by both Kharkiv and French techniques using the 'AndroMed' medium ('Minitub GmbH', Germany).

Investigation of the effectiveness of bull sperm warming at different temperatures. In order to thaw preserved sperm in a water bath there were used three technological modes: temperature $38^\circ\text{C} - 15$ s (control); $56^\circ\text{C} - 7$ s (experiment 1); $70^\circ\text{C} - 6$ s (experiment 2). To accelerate the thawing process, warming was performed at similar temperatures under conditions of constant water stream (+WS) in the bath at an exposure of 10 s (38°C), 6 s (56°C), 5 s (70°C) (Table 2).

Table 2 demonstrates that during freeze-thawing of pellets at 38°C (+WS), 56°C (+WS), 70°C and 70°C (+WS) there was a significant rise in motility by 0.6; 0.87; 0.68 and 0.91 points compared to the control. Survival in hours significantly enhanced compared to the control by 0.5 hours when thawing at 56°C , 56°C (+WS) and 70°C (+WS). After thawing at 38°C (+WS), 56°C , 56°C (+WS), 70°C , 70°C (+WS) compared with the control of APS was higher by 1.27; 2.65; 2.20 and 4.54 conv. units, correspondingly.

In coated granules in the samples thawed at 38°C (+WS), 56°C (+WS), 70°C (+WS) was observed significantly higher compared to the control of motility by 0.65; 0.87 and 0.75 points. Survival analysis showed higher rates in coated granules thawed at 56°C (+WS) and 70°C (+WS). Survival in these groups was 30 min higher than in controls. It should be noted that after thawing of cryopreserved semen in pellets in water baths with a temperature of 56 and 70°C with constant stream of water, its quality indices (motility, survival, APV) were higher. Sperm in coated granules thawed at 38°C (+WS), 56°C ; 56°C (+WS); 70°C ; 70°C (+WS) had a significantly higher absolute survival rate compared to the control of 2.71; 5.18; 3.56 and 6.98 of con. units, correspondingly.

Thus, the use of elevated temperatures with constant fluid movement during thawing of spermatozoa in pellets / coated granules contributes to a significant increase in these indices and accelerates the thawing process three times. This should be taken into account when using sperm with the presence of active sperm up to 2 million in 0.25 ml for artificial insemination.



Таблиця 2. Вплив розморожування сперми бугаїв на її якісні показники ($n = 14$)

Table 2. Effect of thawing of bull sperm on its quality indices ($n = 14$)

Показник Index	Температура та спосіб розморожування $M \pm m$ Temperature and way of thawing $M \pm m$					
	38°C (Контроль) 38°C (Control)	38°C (+PB) 38°C (+WS)	56°C	56°C (+PB) 56°C (+WS)	70°C	70°C (+PB) 70°C (+WS)
Пасти Pellets						
Рухливість, бали Motility, points	5,53 ± 0,087	6,13 ± 0,149 [#]	5,62 ± 0,059	6,40 ± 0,107 ^{#1}	6,21 ± 0,123 [#]	6,44 ± 0,085 [#]
Вживаність, години Survival, hr	6,3 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,8 ± 0,1 [#]	6,8 ± 0,1 [#]	6,5 ± 0,1	6,8 ± 0,1 [#]
АПВ, ум. од. ASR, conv. unit	23,79 ± 0,54	24,56 ± 0,36	25,06 ± 0,29 [#]	26,44 ± 0,38 ^{#2}	25,99 ± 0,79 [*]	28,33 ± 0,84 ^{#111}
Облицьовані гранули Coated granules						
Рухливість, бали Motility, points	5,50 ± 0,087	6,15 ± 0,101 [#]	5,58 ± 0,039	6,37 ± 0,132 ^{#1}	5,88 ± 0,168	6,25 ± 0,101 [#]
Вживаність, години Survival, hr	6,5 ± 0,287	6,6 ± 0,196	6,8 ± 0,202	7,0 ± 0,202 [#]	6,6 ± 0,196	7,0 ± 0,202 [#]
АПВ, ум. од. ASR, conv. unit	21,44 ± 0,66	24,15 ± 0,20 [#]	23,12 ± 0,25	26,62 ± 0,72 [#]	25,00 ± 0,51 [#]	28,42 ± 0,71 ^{#111}

Примітки: різниця значуща порівняно з контролем (38°C): $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (#), $p < 0,001$ (&); $p < 0,05$ ('), $p < 0,01$ ("), $p < 0,001$ ("")) порівняно з аналогічним температурним режимом розморожування без перемішування.

Notes: difference is significant compared to the control (38°C): $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (#), $p < 0,001$ (&); $p < 0,05$ ('), $p < 0,01$ ("), $p < 0,001$ ("")) compared to the same thawing temperature without stirring.

постійному русі води її якісні показники (рухливість, виживаність, АПВ) були вищі. Сперма у облицьованих гранулах, розморожена при 38°C (+PB), 56°C; 56°C (+PB); 70°C; 70°C (+PB), мала значно вищий абсолютний показник виживаності порівняно з контролем на 2,71; 5,18; 3,56 та 6,98 ум. од. відповідно.

Таким чином, застосування підвищених температур із постійним рухом рідини під час розморожування спермодоз у паєтах / облицьованих гранулах сприяє значущому підвищенню зазначених показників і втричі прискорює процес розморожування. Це слід враховувати при використанні для штучного осіменіння корів і телиць спермодоз із наявністю активних сперміїв до 2 млн у 0,25 мл. Встановлено, що після розморожування сперми бугаїв, кріоконсервованої у паєтах та облицьованих гранулах у водяних банях із підвищеною до 56 та 70°C температурою, спостерігається підвищення її якісних показників порівняно з розморожуванням за температури 38°C. Отже, розморожування сперми бугаїв замороженої у паєтах та облицьованих гранулах у водяних банях за температур 38; 56 і 70°C за наявності постійного руху води збільшує швидкість відтаювання та процесу рекристалізації в критичній зоні, що вірогідно покращує рухливість, виживаність та абсолютний

nation of cows and heifers. It was found that after thawing of cryopreserved bovine sperm in pellets and coated granules in water baths with elevated to 56 and 70°C temperature there is an increase in its quality compared to thawing at 38°C. Thus, thawing of bovine sperm frozen in pellet and coated granules in water baths at temperatures of 38; 56 and 70°C with a constant water stream increases the rate of thawing and recrystallization in critical zone, which probably improves the motility, survival and absolute survival of sperm. In industrial conditions for thawing of spermatozoa it is expedient to apply the temperature of a water bath of 70°C with a constant stream of water and 5 s exposures.

References

- Ahmad M, Ahmad N, Riaz A, et al. Sperm survival kinetics in different types of bull semen: progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. *Reprod Fertil Dev.* 2014; 27 (5): 784–93.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 2009; 10 (1): 49–62.
- Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod.* 2000; 5 (1): 46–52.

показник виживаності сперміїв. У виробничих умовах для розморожування спермодоз доцільно застосовувати температуру водяної бані 70°C з постійним рухом води та часом експозиції 5 с.

Література

1. Осташко ФИ, Павленко МП, Кузнецов ГН, и др. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей. Методические рекомендации. Харьков; 1990. 47 с.
2. Ahmad M, Ahmad N, Riaz A, et al. Sperm survival kinetics in different types of bull semen: progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. *Reprod Fertil Dev.* 2014; 27 (5): 784–93.
3. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 2009; 10 (1): 49–62.
4. Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod.* 2000; 5 (1): 46–52.
5. Gaillard C, Kupferschmied H. Thawing time and nonreturn rate of bovine semen frozen in fine French straws. *Theriogenology.* 1982; 18 (4): 487–95.
6. Pesch S, Hoffmann BJ. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. *J Reproduktionsmed Endokrinol.* 2007; 4 (2): 101–5.
7. Tuli RK, Schmidt-Baulain R, Holtz W. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Animal Reproduction Science.* 1991; 25 (2): 125–31.
8. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology.* 2016; 85 (1): 47–64.
9. Yılmaz E, Ak K, Baran A. Effect of different thawing time and high temperature on frozen thawed bull semen traits. *J Anim Vet Adv.* 2019; 18 (7): 239–45.
4. Gaillard C, Kupferschmied H. Thawing time and nonreturn rate of bovine semen frozen in fine French straws. *Theriogenology.* 1982; 18 (4): 487–95.
5. Ostashko FI, Pavlenko MP, Kuznetsov GN, et al. [Kharkiv technology of aseptic collection and cryopreservation of sperm from breeding bulls. Methodical recommendations]. Kharkiv; 1990. 47 p. Russian.
6. Pesch S, Hoffmann BJ. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. *J Reproduktionsmed Endokrinol.* 2007; 4 (2): 101–5.
7. Tuli RK, Schmidt-Baulain R, Holtz W. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Animal Reproduction Science.* 1991; 25 (2): 125–31.
8. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology.* 2016; 85 (1): 47–64.
9. Yılmaz E, Ak K, Baran A. Effect of different thawing time and high temperature on frozen thawed bull semen traits. *J Anim Vet Adv.* 2019; 18 (7): 239–45.

