

УДК 638.082

DOI: 10.31073/onehealthjournal2024-I-04

РЕЖИМИ ОХОЛОДЖЕННЯ І ДЕОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ ТВАРИН (Огляд літератури)

Сушко О. Б.¹ (ORCID ID: 0000-0003-3552-064X), **Жегунов Г. Ф.**² (ORCID ID: 0000-0003-0104-7890), **Савельєва М. С.**¹ (ORCID ID: 0000-0003-2221-933X), **Єлецька Л. М.**¹ (ORCID ID: 0000-0001-6029-0183X), **Мартинюк І. М.**¹ (ORCID ID: 0000-0002-3675-124X)

¹Інститут тваринництва Національної академії аграрних наук (НААН), м. Харків, Україна;

²Національний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна;
email: martinyuk.i.n.2015@ gmail.com

Резюме. Представлено огляд вітчизняних та іноземних літературних джерел, а також данні опублікованих власних досліджень стосовно режимів кріоконсервування і деонсервування сперми тварин. Осташко Ф. І. вперше було чітко доведено, що повне зникнення рідкої фази в статевих клітинах бугаїв при глибокому заморожуванні відбувається за температури мінус 51 °С. Белоус А. М. зі співавторами показали залежність ступеня ушкодження лізосом, мітохондрій і плазматичних мембран спермій в залежності від швидкості охолодження. Швидкість на рівні 80 °С/хв. в більшій ступені ушкоджує клітинні структури, ніж 18 °С/хв. У наших дослідженнях на моделі сперми жеребців доведено залежність фізіологічних показників і ступеня ушкодження клітинних мембран від режимів охолодження. Було застосовано три режими кріоконсервування: швидкий – від 0 до мінус 10 °С зі швидкістю 3 °С/хв; від мінус 10 до мінус 80 °С зі швидкістю 25 °С/хв; прискорений (або середній) – від 0 до мінус 10 °С зі швидкістю 2,5 °С/мин; від мінус 10 до мінус 80 °С зі швидкістю 15 °С/хв; повільний – від 0 до мінус 10 °С зі швидкістю 1 °С/хв; від мінус 10 до мінус 80 °С зі швидкістю 2,5 °С/хв. Було встановлено, що найкращі результати спостерігаються при швидкому методі охолодження. Також нами створено метод заморожування сперми жеребця у шприц-тубах об'ємом 1 мл и 5 мл. Для його реалізації використовується спеціально розроблений термоблок «Кріотроп». У практичній діяльності для відтавання сперми у більшості випадків використовують температуру наближену до температури тіла тварин 35–40 °С. Проте оригінальний метод деонсервації сперми бугаїв був розроблений Бугровим О. Д. і Осташко Ф. І., який полягав у відтаванні сперми в облицьованих гранулах за температури 100 °С. Серією експериментів було доведено, що найкращі фізіологічні показники деонсервованої сперми спостерігаються після витримки облицьованої гранули в окропі протягом 6–7 сек з наступною стабілізацією на повітрі. При цьому отримана середня рухливість сперми на рівні 46–47 % та виживаність 9,0–9,2 год, що достовірно перевищували контроль. У результаті тривалої роботи вчених розроблено режими кріоконсервування сперми тварин, що дозволяють зберігати її необмежений час та отримувати повноцінне запліднення тварин після деонсервації генетичних ресурсів.

Ключові слова: сперма, кріоконсервування, деонсервування, середовища, тварини, бугаї, жеребці.

Відкриття методу глибокого заморожування сперми тварин відкрило новий етап у племінній роботі, дало альтернативний засіб збереження їх генетичного різноманіття,

сприяло поширенню штучного осіменіння самиць сільськогосподарських тварин (Smirnov, 1949; Sokolovskaya, 1947; Milovanov, 1947; Smirnov, 1974).

Перші методи кріоконсервування сперми мали велике значення, бо показали можливість отримання повноцінних нащадків після перебування статевих клітин в умовах низьких температур. Проте вони були примітивними і малоефективними, так як базувалися на прямому внесенні контейнерів з біоматеріалом у зріджений азот. Пізніше було встановлено певні закономірності, щодо біологічної якості статевих клітин у залежності від режимів зниження температури (Smith Polge, 1950; Smith, Audrey, 1958; Yuschenko, 1963).

Мета роботи. Показати основні методи і режими кріоконсервування і де – консервування сперми, що застосовуються у практиці відтворення тварин.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для дослідження слугували друковані праці вітчизняних та іноземних авторів, а також опубліковані результати власних досліджень. У роботі використано загально наукові методи: аналіз і синтез.

Результати та їх обговорення. Як свідчать літературні дані, режим охолодження сперми за її кріоконсервування є одним із найвагоміших факторів. Швидкості заморожування безпосередньо впливають на фізіологічні показники сперми після її деконсервації. На вибір режиму кріоконсервування впливають проникність мембран клітин для води і кріопротекторів, склад кріозахисного середовища, форма упаковки спермодози та її об'єм (Varner, 1988; Parkinson, 1987; Ricker, 2006; Gardon, 2008; Vishwanath, 2000; Sharan, 2011).

На структуру статевих клітин суттєво впливає підвищення концентрації електролітів, котре відбувається по мірі кристалізації води. Осташко Ф. І. вперше було чітко визначено, що повне зникнення рідкої фази в спермі бугаїв, розбавленої синтетичними середовищами, відбувається за температури мінус 51 °С. (Ostashko F. I., 1987). Таким чином, швидкість зниження температури біоматеріалу впливає, головним чином, в діапазоні від 0 до мінус 51 °С. Він також вважав, що як занадто швидке так і занадто повільне заморожування сперми бугаїв може погіршувати її фізіологічні характеристики. Як швидкість охолодження 60...200 °С/хв. так і 0,05...0,1 °С/хв. може бути згубною для сперміїв.

Вчений А. М. Белоус зі співавт. (Belous, 1987) довели, що заморожування сперми зі швидкістю 80 °С/хв у більшому ступені ушкоджує лизосоми, мітохондрії та плазматичні мембрани статевих клітин, ніж заморожування зі швидкістю 18 °С/хв.

В практиці використовується велика кількість режимів охолодження сперми. При цьому можуть використовуватись як програмні заморожувачі так і обладнання для кріоконсервації сперми без програмного забезпечення (Belikov A. A., 1992).

Так при використанні апаратів з програмним регулюванням режиму охолодження існують рекомендації, щодо застосування наступного режиму: швидкість 0,5 °С/хв. у діапазоні від 0 °С до мінус 15 °С; швидкість 2–3 °С/хв – від мінус 15 °С до 50 °С; швидкість 5–7 °С/хв – від мінус 50 °С до 80 °С; перенос у зріджений азот (Pavlenko, 2005; Zhegunov, 2019).

Результати досліджень та їх обговорення. У наших експериментах було застосовано різні режими охолодження сперми жеребця. Випробувано три режими кріоконсервування: швидкий – від 0 до мінус 10 °С зі швидкістю 3 °С/хв; від мінус 10 до мінус 80 °С зі швидкістю 25 °С/хв; прискорений (або середній) – від 0 до мінус 10 °С зі швидкістю 2,5 °С/мин; від мінус 10 до мінус 80 °С зі швидкістю 15 °С/хв; повільний – від 0 до мінус 10 °С зі швидкістю 1 °С/хв; від мінус 10 до мінус 80 °С зі швидкістю 2,5 °С/хв. Результати власних досліджень наведені в таблиці (Sushko, 2009).

Як видно, рухливість сперми прямо корелювала зі швидкістю охолодження-заморожування: швидкий режим забезпечив максимальну (50 %) рухливість сперміїв з

прямолинійно-поступовим рухом. Прискорений режим забезпечував меншу ефективність кріоконсервування на 12 % і повільний ще меншу на 26 %. Аналогічна кореляція спостерігається і за ступенем ушкодження плазматичних мембран. Найбільша кількість статевих клітин з неушкодженою мембраною відмічена за використання швидкого режиму охолодження-заморожування. Прискорений режим за цим показником був менш ефективним на 7,1 %, повільний – на 26,3 %.

Таблиця

Фізіологічні показники і ступінь ушкодження мембран спермійів жеребця залежно від режиму охолодження – заморожування

Режим заморожування сперми жеребця	Рухливість, %	Вживаність при T=+37 °C, год	Ступінь ушкодження мембран спермійів (nкл=25000×ne)		
			Живі, %	Ушкоджені, %	Мертві, %
	a	b	c	d	e
Швидкий ne=5	50,00±4,17	5,40±0,60	27,54±0,13	15,73±0,10	56,71±0,14
Прискорений (середній) ne=5	44,00±2,45	5,40±0,60	25,70±0,12	13,88±0,10	59,57±0,14
Повільний ne=5	37,00±3,00	5,20±0,49	21,80±0,12	12,64±0,09	65,55±0,13

Примітка. – ne - кількість вивчених еякулятів в досліді; nкл - кількість оцінених клітин (спермійів)

За використання пристроїв не обладнаних засобами точного регулювання, температурний режим може забезпечується за рахунок температури парів зрідженого азоту, і часу перебування в них контейнерів зі спермою. Так для пайет об'ємом 0,25 мл встановлюють температуру мінус 120 °C, для пайетів об'ємом 0,5 мл – мінус 140 °C. Час перебування в них складає 8–12 хв після чого відбувається перенос у зріджений азот.

У Харківській технології асептичного отримання, кріоконсервації і використання сперми бугаїв спермодози закладаються у спеціальні металеві пласкі касети, та вставляються у спеціальний барабан для занурення у зріджений азот. При цьому пристрій контролюється на такому рівні щоб на першому етапі зріджений азот не попадав в середину касет, де знаходяться облицьовані гранули зі спермою. Повне занурення касет зі спермодозами відбувається через 8–10 хв (Rudenko et al., 2011).

Нами створено метод заморожування сперми жеребця у шприц-тубах об'ємом 1 мл и 5 мл (Sushko, 2007; Sushko, 2009; Zhegunov, 2019). Для заморожування сперми використовується спеціальний термоблок «Кріотроп». Особливістю процедури заморожування є зрошування оболонок спермодоз дрібно розпилим азотом та пряме внесення термоблоку до скрапленого азоту.

Динаміка зниження температури спермодоз при даному способі заморожування наступна. Заморожування сперми жеребця до температури мінус 10 °C проходить в повільному режимі 2,0 °C /хв., що забезпечує поступовий процес дегідратації та попереджає внутрішньоклітинну кристалізацію. Від температури мінус 10 °C до мінус 70 °C заморожування відбувається в прискореному режимі 7,0 °C /хв., що зменшує час негативного впливу високої концентрації солей в каналах мембран спермійів (Sushko, 2015).

Заморожування і відтавання сперми тварин є два взаємопов'язаних процесів, що змінюють стан і структуру статевих клітин. Вважається, що за температури від мінус 51 °C

до 0 з'являється рідка фаза та створюються умови, що можуть негативно впливати на фізіологічні функції гамет після повного відтавання біоматеріалу. В першу чергу це стосується дії висококонцентрованих розчинів солей. Механічне пошкодження гамет на початку появи рідкої фази можливо і невелика, оскільки осмотичні та дифузійні процеси мають мінімальні рівні. Однак, у процесі подальшого підвищення температури відбувається і подальше розчинення осмотично-активних речовин. Таким чином, у системі концентрація солей та інших речовин знаходиться на достатньо високому рівні, що спричинює шкідливий вплив на мембранний апарат статевих клітин.

Було експериментально показано, що 30-хвилинна витримка сперми за температури мінус 30 °C достовірно знижує кількість спермій з прогресивним рухом на 16 % після відтавання. Вважається, що саме ендоцелюлярні кріопротектори відіграють у цей період найбільш важливу роль у захисті гамет за їх заморожування та дефростації. Ендоцелюлярні кріопротектори (гліцерин, дімететілфосфат, діметилсульфоксид, етиленгліколь та інші) здатні підтримувати на некритичному рівні концентрацію розчинених солей та інших речовин, попереджуючи передчасні ферментативні і інші біохімічні реакції (Ostashko, 1980).

По досягненню температури вище 0 °C у біологічній системі тверда фаза повністю зникає і подальше підвищення температури повертає функціональну активність значної частини статевих клітин.

Незважаючи на численні експерименти, пов'язані з режимами деконсервації спермій, у практичній діяльності для відтавання сперми у більшості випадків використовують температуру наближену до температури тіла тварин.

Так для деконсервації пайет об'ємом 0,25 і 0,50 мл застосовується температура 35–37 °C, для відтавання сперми у облямованих гранулах 38–39 °C, для сперми у відкритих гранулах 38–40 °C.

Оригінальний метод деконсервації сперми бугаїв був розроблений Бугровим О. Д. і Осташко Ф. І. (Ostashko, 1980; 1981). Він полягав у відтаванні сперми в облицьованих гранулах за температури 100 °C. Після серії експериментів було встановлено, що найкращі фізіологічні показники деконсервованої сперми спостерігаються після витримки облицьованої гранули в окропі протягом 6–7 сек з наступною стабілізацією на повітрі. В експериментах була отримана середня рухливість сперми на рівні 46–47 % та виживаність 9,0–9,2 год, які достовірно перевищували контроль, де деконсервація відбувалась за температури 38 °C (40 % та 7,2 год, відповідно). Для реалізації такого режиму відтавання був сконструйований спеціальний пристрій, що забезпечував 7 сек експозицію спермодоз за температури кипіння води. Подальші дослідження і апробація методу підтвердили його ефективність не тільки за фізіологічними показниками сперми, а і за заплідненістю корів і телиць (Ostashko, 1982).

Період застосування сперми після відтавання має важливе значення для результативності штучного осіменіння деконсервованою спермою. Так при використанні сперми у пайетах термін їх застосування складає, згідно рекомендацій, 15 хв після відтавання. При застосуванні сперми в облицьованих гранулах їх необхідно використати для штучного осіменіння самиць протягом 30 хв (Інструкція зі штучного осіменіння корів та телиць, 2001). Існують експериментальні дані, що затримка з інсемінацією корів до 1–2 год після дефростації сперми майже у півтора-два рази знижує запліднюваність тварин (Bugrov, 1969; Kurbatov, 1988).

Висновки. Таким чином, у результаті тривалої роботи вчених створено режими заморожування і відтавання сперми тварин, які дозволяють зберігати її *in vitro* у кріоконсервованому стані практично не обмежений проміжок часу. Вагомі досягнення у цій галузі зроблені вітчизняними вченими.

Розроблені режими кріоконсервування біоматеріалу дозволяють зберігати запліднюючу здатність значного відсотку спермій, достатнього для реалізації

репродуктивної програми і ефективного отримання нащадків. При цьому кількість отриманих нащадків може бути значно більшою, ніж за відтворення тварин у природній спосіб. Однак, створення нових методів глибокого заморожування гамет, спрямованих на підвищення ефективності біотехнології кріоконсервування статевих клітин, продовжується і є перспективним напрямком наукової роботи.

REFERENCES

1. Bezuhlyy M. D., Ostashko F. I. Medvedovsky O. V. (2001). Instruktsiya zi shtuchnoho osimeninnya velykoyi rohatoyi khudoby (rehionalne vydavnytstvo), Kharkiv, 2001; 32 [in Ukrainian].
2. Belikov A. A. (1992). Metodika glubokogo zamorazhivaniya i dlitel'nogo khraneniya spermy khryakov-proizvoditeley. Novoye v metodakh zootekhnicheskikh issledovaniy. Institut zhivotnovodstva Ukrainskoy Akademii Agrarnykh Nauk. Kharkiv, Ch.1, 1992; 197–199. [in Ukrainian].
3. Belous, A.M., Gordienko, E.A., Rozanov, L.F. (1987). Membrane biochemistry. Freezing and cryoprotection. Moscow: Vissaya Shkola, 1987, p.80 [in Russian].
4. Bugrov, A. D., (1969). Zaplidnennist koriv ta telyts vid osimeninnya zamorozhenoyu spermoyu. *Molochno-m'iasne skotarstvo: mizhvidomchyy tematychnyy naukovyy zbirnyk*, Kyiv, Urozhay, 1969; 17:80–86. [in Ukrainian].
5. Gardon, J. C., Castrillo, F., Escibano, B. M., Castejon, F. J. (2008). Equine semen transport with different extenders and its capability for cryopreservation. *Reproduction in domestic Animals*; 43(3); July 2008; 99 Budapest. [in Hungarian].
6. Kurbatov, A. D., Platov, Ye. M., Korban, N. V. (1988). Kriokonservatsiya spermy sel'skohozhajstvennykh zhivotnykh, Leningrad : Agropromizdat, 1988; 256. [in Russian].
7. Milovanov, V. K. (1947). Svoystvo zhivchikov mlekopitajushhih sohranjat' biologicheskuyu polnocennost' posle bystrogo zamorazhivaniya : diplom na otkrytiye s prioritetom; 103:1947 [in Russian].
8. Ostashko, F. I. (1978). Glubokoe zamorazhivanie i dlitel'noe hranenie spermy proizvoditelej Kiyev : Urozhay, 1978, p. 256 [in Ukrainian].
9. Ostashko, F. I., Bugrov, A. D., (1980). Zashchitnyye svoystva krioprotektorov pri razmorazhivaniy spermy, Moscow, *Zhivotnovodstvo*; 1980; 20–22. [in Russian].
10. Ostashko, F. I., Bugrov, A. D., (1980). Rozmorozhennya spermy buhayiv- plidnykiv u kyplyachiy vodi, Kyiv, Tvarynnystvo Ukrayiny № 12, 1980, p. 43–44. [in Ukrainian].
11. Ostashko, F. I., Bugrov, A. D., (1981). Dekonservatsiya spermy buhayiv, Kyiv, Tvarynnystvo Ukrayiny № 14, 1981, p. 42–44. [in Ukrainian].
12. Ostashko, F. I., Bugrov, A. D., Kantsedal V. I. (1982). Metodicheskiye rekomendatsii po organizatsii vosproizvodstva na molochnykh fermakh. Kharkiv, 1982, 32 p. [in Ukrainian].
13. Parkinson, T. J., Whitfield, C. (1987). Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*; 27:781–797.
14. Pavlenko, B.M., Solovyov, S.T. (2005). Kriokonvektor dlya zamorozhuvannya spermodozy. *Ahrarna nauka vyrobnytstvu.– Naukovo-informatsiynyy byuleten zavershenykh naukovykh rozrobok UAAN.*; 2(32):26. [in Ukrainian].
15. Rudenko, E. V., Ostashko, F. I., Sushko, O. B. (2011). Natsionalna tekhnolohiya kriokonservatsiyi ta vykorystannya spermy plemennykh plidnykiv u systemi krupnomasshtabnoyi selektsiyi. (Kharkiv. Tekhnolohiya aseptychnoho oderzhannya, kriokonservatsiyi spermy buhayiv v oblytsovanykhkhranulakh ta shtuchnoho osimeninnya samyts) Ministerstvo ahrarnoyi polityky. Instytut tvarynnystva Natsionalnoyi Akademiyi Ahrarnykh Nauk, Kharkiv, 2011; 98. [in Ukrainian].
16. Ricker, J. V., Linfor, J. J., Delfino, W. J., Kysar, P., Scholtz, E. L., Tabli, F., Crowe, J. H., Ball, B. A. and Meyers, S. A. (2006). Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effect of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biology of reproduction*; 74:359–365.

17. Sharan, M. M., Yaremchuk, I. M., Nalovylo, S. (2011). Efektyvnist krioprotektoriv rosllynnoho i tvarynnoho pokhodzhennya pry zamorozhuvanni spermy buhayiv plidnykiv. *Naukovyy visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterinaryarnoyi medytsyny ta biotekhnolohiy imeni S.Z. Gzhytskoho*; 13(50):352–356. [in Ukrainian].
18. Smirnov, I. V. (1947). To the theory of deep freezing of sperm. *Zhivotnovodstvo*; 11:65–70. [in Russian].
19. Smirnov, I. V. (1949). Sohranenie semeni selskohozyaystvennykh zhivotnykh posredstvom glubokogo ohlazhdeniya. *Sovetskaya zootehniya*; 4:93–96. (in Russian).
20. Smith, A.U. Polge, C. (1950). Survival of Spermatozoa at Low Temperatures. *Nature*; 166(4225):668-669, DOI: 10.1038/166668aO
21. Smith, Audrey U. (1958). Life at Low Temperatures. *Nature*, 182(4640):911– 913. DOI:10.1038/182911aO
22. Sokolovskaya, I. I. (1947). Mozhet li zamorozhennaya sperma oplodotvoryat' i davat' normal'noe potomstvo? *Doklady VASKhNIL*; 6:74 – 75. (in Russian).
23. Sushko, O. B., Smoroh, Z., Bokhenek, M., Kompaniyets, M., Mishchenko, A. H. (2009). Efektyvnist zastosuvannya bufernykh seredovysch, krioprotektoriv i rezhymiv zamorozhuvannya spermy zherebtsiv, Kyiv, *Visnyk ahrarnoyi nauky*, 9:35–39. [in Ukrainian].
24. Sushko, O. B. (2007). Metod kriokonservatsiyi spermy zherebtsiv z vykorystanniam kompaktyzovanykh shpryts-tyubiv, Kyiv, *Visnyk ahrarnoyi nauky*, 43–45. [in Ukrainian].
25. Sushko, O. B., Novikov, O. O., Tkachov, O. V., Soklakova, O. V., Savelyeva, M. S. (2009). Kharkivskyy ekspedytsiyno-statsionaryy metod otrymannya, kriokonservatsiyi spermy ta shtuchnoho osimeninnya koney. *Informatsiynyy lystok Instytutu tvarynnystva Natsionalnoyi Akademiyi Ahrarnykh Nauk (biotsentr, lyuty)*, 2009. [in Ukrainian].
26. Sushko, O. B. (2015). Patentnozakhyshcheny metod kriokonservuvannya spermy zherebtsiv u shpryts-tyubakh (Kharkivska ekspedytsiyno – statsionarna tekhnolohiya kriokonservuvannya spermy ta shtuchnoho osimeninnya koney) Natsionalna akademiya ahrarnykh nauk Ukrayiny, Instytut tvarynnystva. Metodychni rekomendatsiyi, 2015, p. 15 [in Ukrainian].
27. Varner, D.D., Blanchard, T.L., Love, C.L., Garcia, M.C., Kenney, R.M. (1988). Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Animal Reproduction Science*; 29(5):1043–1051.
28. Vishwanath, R., Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and Frozen state. *Animal. Reprod. Sci.*; 62:25–53.
29. Zhegunov, G. F., Nardi, O. A., Stegnyy, B. T. (2019). Osnovy kriobiologii i kriomeditsyny: uchebnik dlya studentov – biologov i medikov, 2019, Kharkov.: FLP Brovin A. V. [in Ukrainian].
30. Yuschenko, N. P., Semakov, V. G., Levin, K. A. (1963). Zamorazhivanie spermy byikov v granulah bez primeneniya suhogo lida. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo*; 5:36–37. (in Russian).

MODES OF COOLING AND DEPRESERVATION OF SEMEN OF ANIMAL (The review)

Sushko O. B.¹ (ORCID ID: 0000-0003-3552-064X), **Zhegunov G. F.**² (ORCID ID: 0000-0003-0104-7890), **Savelieva M. S.**¹ (ORCID ID: 0000-0003-2221-933X), **Yeletska L. M.**¹ (ORCID ID: 0000-0001-6029- 0183X), **Martinyuk I. M.**¹ (ORCID ID: 0000-0002-3675-124X)

¹ Institute of Animal Science of NAAS, Kharkiv, Ukraine,

²National Biotechnology University, Kharkiv, Ukraine

email: martinyuk.i.n.2015@ gmail.com

Abstract. An overview of domestic and foreign literary sources is presented, as well as data of published own researches regarding the modes of cryopreservation and depreservation of animal sperm. Ostashko F.I. was the first to clearly prove that the complete disappearance of the liquid phase in the germ cells of wild boars during deep freezing occurs at a temperature of minus 51 °C. Belous A. M. and co-authors showed the dependence of the degree of damage to lysosomes, mitochondria and plasma membranes of sperm depending on the cooling rate. The speed is at the level of 80 °C/min. damages cellular structures to a greater degree than 18 °C/min. In our studies on stallion semen, the dependence of physiological indicators and the degree of damage to cell membranes on cooling modes was proven. Three modes of cryopreservation were used in the experiments: fast - from 0 to minus 10 °C at a rate of 3 °C/min; from minus 10 to minus 80 °C at a rate of 25 °C/min; accelerated (or average) - from 0 to minus 10 °C at a rate of 2.5 °C/min; from minus 10 to minus 80 °C at a rate of 15 °C/min; slow - from 0 to minus 10 °C at a rate of 1 °C/min; from minus 10 to minus 80 °C at a rate of 2.5 °C/min. It has been found that the best results are observed with the rapid cooling method. We also created a method of freezing stallion sperm in 1 ml and 5 ml syringe tubes. For its implementation, a specially developed thermoblock "Cryotrope" is used. In most cases, in practice, a temperature close to the animal's body temperature of 35-40 °C is used for sperm donation. However, the original method of depreservation of bull semen was developed by Bugrov O. D. and Ostashko F. I., which consisted in thawing sperm in coated granules at a temperature of 100 °C. A series of experiments proved that the best physiological indicators of depreserved sperm are observed after keeping the coated granule in boiling water for 6-7 seconds, followed by stabilization in air. At the same time, the average sperm motility was obtained at the level of 46-47 % and the survival time was 9.0–9.2 hours, which significantly exceeded the control. As a result of the long-term work of scientists, methods of cryopreservation of animal sperm have been developed, which allow you to store it for an unlimited time and obtain full-fledged offspring after depreservation.

Key words: sperm, cryopreservation, depreservation, media, animals, bulls, stallions.

DOI: 10.31073/onehealthjournal2024-I-04