

Н. В. Плешанов, О. И. Станишевская, Ю. Л. Силюкова

Оплодотворяющая способность криоконсервированной спермы петухов в зависимости от уровня холестерина в ней и его влияния на степень повреждения мембранных структур спермиев

Аннотация. Одним из способов сохранения биоразнообразия сельскохозяйственной птицы, а также других видов животных является криоконсервация репродуктивных клеток. Для сельскохозяйственных птиц на сегодняшний день разработана технология криоконсервации репродуктивных клеток самцов, при этом показатели оплодотворяющей способности индивидуальных эякулятов деконсервированной спермы находятся на невысоком уровне.

В процессе криоконсервации и деконсервации сперматозоиды могут получать как необратимые повреждения, выражающиеся в отсутствии подвижности и различных морфологических нарушениях, так и обратимые, связанные, в основном, с временным нарушением структуры и проницаемости мембран.

Общепринятыми параметрами отбора эякулятов для целей криоконсервации являются: их объем, концентрация и подвижность сперматозоидов. Эти критерии не дают полного прогноза степени криотолерантности репродуктивных клеток, которая в значительной степени обусловлена состоянием мембран, а именно мембраны в первую очередь повреждаются в процессе замораживания-оттаивания.

Установлена положительная корреляция между активностью сперматозоидов после деконсервации и степенью повреждения мембранных структур, полученных в процессе замораживания-оттаивания. Коэффициент ранговой корреляции между процентом сохранения активности и процентом поврежденных сперматозоидов в сперме составил $-0,49$ ($P < 0,01$).

В статье приводятся результаты исследований по степени криоустойчивости спермы петухов в зависимости от содержания в ней липидов (холестерина). Получены данные об уровне содержания холестерина в нативной сперме с помощью энзиматического колориметрического метода с учетом концентрации спермы в $\text{мг/млрд} \times 10^{-2}$. Изучены показатели повреждения мембраны спермиев в деконсервированной сперме при помощи красителя *Sperm VitalStain* и микроскопической визуальной системы. Установлено, что сперма с содержанием холестерина на уровне $\leq M$ ср. отличается повышенной криоустойчивостью по сравнению со спермой с высоким содержанием холестерина. Это выражается в меньшей повреждаемости сперматозоидов в цикле замораживания-оттаивания (52,8% неповрежденных против 44,6%) (опыт III); лучшей сохранностью активности (I опыт: 60,5% против 37,3%), (II опыт: 65,9% против 63,2%) соответственно; и, что очень важно, более высокой оплодотворяющей способности (I опыт: 60,5% против 36,0%) (II опыт: 78,4% против 67,5%).

Ключевые слова: птицеводство, искусственное осеменение, сперма, липиды, холестерин, криоконсервация.

Авторы:

Плешанов Николай Вячеславович — младший научный сотрудник отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, 196601, Московское шоссе, 55 а; e-mail: klaus-90@list.ru;

Станишевская Ольга Игоревна — доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, 196601, Московское шоссе, 55 а; e-mail: olgastan@list.ru;

Силюкова Юлия Леонидовна — зоотехник отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц; Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, 196601, Московское шоссе, 55 а; e-mail: svadim33@mail.ru.

Введение.

Одним из способов сохранения биоразнообразия сельскохозяйственной птицы, а также других видов животных является криоконсервация репродуктивных клеток. С помощью данного метода возможно долговременное хранение генетического материала и использование его в дальнейшем для воссоздания пород и популяций. На основании этого во многих странах мира уже сформированы национальные криобанки. В них при температуре -196°C хранится генетическая информация. Стоит отметить, что банки долговременного низкотемпературного хранения в таких странах, как США, Канада, Франция, Испания и др., имеют достаточно обширную коллекцию криоконсервированных репродуктивных клеток различных пород, популяций, линий и кроссов [1]. Для сельскохозяйственных птиц на сегодняшний день разработана технология криоконсервации репродуктивных клеток самцов, при этом показатели оплодотворяющей способности индивидуальных эякулятов деконсервированной спермы находятся на невысоком уровне.

В процессе криоконсервации и деконсервации сперматозоиды могут получать как необратимые повреждения, выражающиеся в отсутствии подвижности и различных морфологических нарушениях, так и обратимые, связанные, в основном, с временным нарушением структуры и проницаемости мембран [2].

Общепринятыми параметрами отбора эякулятов для целей криоконсервации являются: их объем, концентрация и подвижность сперматозоидов. Эти критерии не дают полного прогноза степени криотолерантности репродуктивных клеток, которая в значительной степени обусловлена состоянием мембран, а именно мембраны в первую очередь повреждаются в процессе замораживания-оттаивания.

Чувствительность спермы млекопитающих к быстрому охлаждению была установлена еще в 30-х годах XX века В. К. Миловановым [3]. Были зафиксированы клеточные повреждения, проявляющиеся в потере проницаемости и целостности плазматической мембраны, наружной акросомной мембраны и митохондрий, что было подтверждено многочисленными последующими исследованиями [4, 5, 6]. В дальнейшем было определено, что устойчивость к холодовому шоку и криоустойчивость сперматозоидов различных видов сельскохозяйственных животных в значительной степени обусловлена содержанием и составом липидов клеточных мембран. Изучались такие липидные фракции, как гликолипиды, фосфолипиды, стерины [7]; холестерин и соотношение холестерина/фосфолипиды и др. [8, 9, 10, 11].

В наших исследованиях [12] также было установлено влияние липидов спермы петухов на ее оплодотворяющую способность после деконсервации. Поскольку холестерин является необходимым компонентом клеточных мембран, он стабилизирует мембраны, регулирует их проницаемость, влияет на микровязкость, текучесть и молекулярную подвижность липидов в мембране, на процесс капацитации, взаимодействие мембран яйцеклетки и сперматозоида, и как следствие, на результаты оплодотворения [13]. Его влияние на оплодотворяющую способность деконсервированной спермы было изучено более детально.

В литературе высказываются предположения, что содержание холестерина в сперме птиц может оказывать влияние на ее криоустойчивость, оцененную через показатель подвижности сперматозоидов после деконсервации [10].

Большинство исследований на сельскохозяйственной птице в этом направлении ограничиваются изучением влияния липидов спермы на потерю активности спермы после оттаивания, не рассматривая ее оплодотворяющую способность. Поэтому целью нашей работы было определить не только криоповреждения сперматозоидов и их активность, но и способность к оплодотворению.

Материалы и методы исследований. Опыты проведены с использованием биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» на птице породы род-айланд красный.

Было проведено два опыта (I опыт 2016 г., II опыт 2017 г.) на поголовье: петухи $n = 15$ и $n = 12$ соответственно; куры $n = 70$ и $n = 54$. Птица содержалась в индивидуальных клетках при принятой в хозяйстве технологии кормления и содержания.

Для оценки криотолерантности индивидуальных эякулятов были определены следующие показатели. В свежеполученной сперме: визуальная оценка качества спермы (объем, активность, концентрация), содержание холестерина с учетом концентрации спермы, определенной методом центрифугирования. В деконсервированной сперме: активность, поврежденность плазматических мембран сперматозоидов. Определена оплодотворенность яиц (%) при использовании заморожено-оттаянной спермы.

Для целей криоконсервации были предварительно оценены и отобраны лучшие петухи с объемом эякулята (0,4-1,4 мл.); концентрацией (Г.); активностью свежей спермы (≥ 8 баллов).

Определение содержания холестерина в свежеполученной сперме ($\text{мг/млрд} \times 10^{-2}$) было

проведено с помощью диагностических наборов ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» энзиматическим колориметрическим методом с учетом концентрации спермы.

Оценка качества спермопродукции, криоконсервация и деоконсервация спермы петухов, а также искусственное осеменение кур проведены по методикам Целютина К. В., Тура. Б. К. [14].

В качестве криопротектора использовали диметилацетамид (добавляли в конечной концентрации 8%).

Концентрация спермы определена методом центрифугирования по Н. Харитонову 1978 г. (цит. Попов И. И., 2000 [15]).

Поврежденность плазматических мембран сперматозоидов (опыт II) оценивали с помощью красителя Sperm VitalStain («Nidacon International AB», Швеция). Окрашивание проводили в пробирках типа Eppendorf (50 мкл спермы смешивали с 50 мкл красителя) и делали мазки на предметных стеклах. Препараты просматривали при

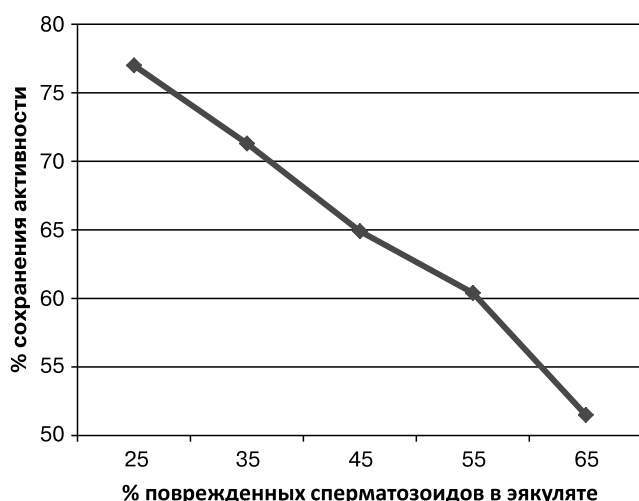


Рис. 1. Активность деоконсервированной спермы в зависимости от повреждаемости сперматозоидов при замораживании-оттаивании (опыт II)

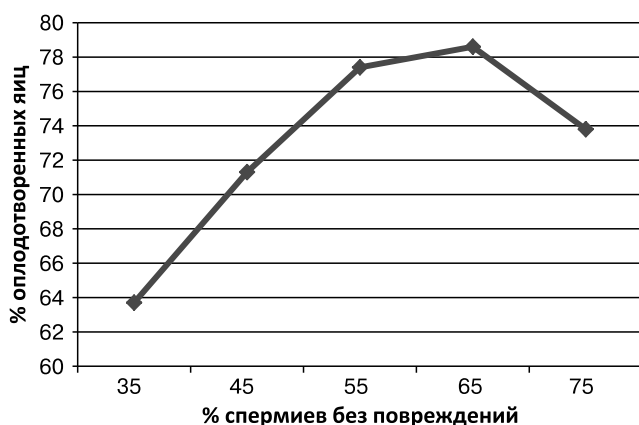


Рис. 2. Оплодотворяемость яиц в зависимости от степени повреждения мембранных структур сперматозоидов в процессе замораживания-оттаивания (опыт II)

увеличении $\times 100$ (объектив) с масляной иммерсией, подсчитывая не менее 200 клеток в каждом образце (белые клетки — неповрежденные, красные или розовые — сперматозоиды с поврежденными мембранами).

Для микроскопирования использовали визуализирующую систему Axio Imager («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия).

Инкубация яиц и их овоскопирование на 11 сутки развития проведены в инкубатории ВНИИГРЖ.

Полученные результаты были статистически обработаны с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение.

В результате исследований была изучена активность свежей и деоконсервированной спермы каждого петуха (индивидуальные эякуляты). В обоих опытах были получены данные, демонстрирующие большую индивидуальную изменчивость в цикле замораживание — оттаивание спермы петухов. Так в I опыте коэффициент вариации (Cv) активности нативной спермы составлял 2,6%, а деоконсервированной 36,2%. Во II опыте коэффициент активности вариации (Cv) нативной спермы составил 6,1%, а деоконсервированной 19,5%.

Это свидетельствует о широкой норме реакции сперматозоидов на влияние низких температур. Использование общепринятых методов оценки эякулятов для целей криоконсервации не обеспечивает стабильные показатели качества деоконсервированной спермы. Возникает необходимость подключения дополнительных критериев оценки и отбора эякулятов на криотолерантность.

Установлено, что активность сперматозоидов после деоконсервации напрямую связана со степенью повреждений мембранных структур, полученных в процессе замораживания-оттаивания. Коэффициент ранговой корреляции между процентом сохранения активности и процентом поврежденных сперматозоидов в сперме составил -0,49 ($P < 0,01$) (рис. 1).

Повреждение мембранных структур сперматозоидов оказывает негативное влияние на оплодотворяющую способность спермы (рис. 2).

В связи с этим было изучено влияние концентрации холестерина (как необходимого компонента клеточных мембран) в свежеполученной сперме на криоустойчивость сперматозоидов (таб. 1, 2).

Петухи были распределены по группам с учетом содержания холестерина в сперме согласно разработанной нами методики оценки и отбора петухов для целей создания криобанка [16].

В ходе экспериментов нами были получены данные, указывающие на то, что сперма петухов

Таблица 1. Показатели криоустойчивости спермы петухов в зависимости от содержания в ней холестерина (опыт I)

Содержание холестерина в сперме	Число петухов, гол.	Активность свежей спермы, балл.	Активность после деконсервации, балл.	% сохран. активности	Заложено яиц, шт.	Оплод. % от индивидуальных эякулятов
$\leq$ М ср. (2,32 – 4,41 мг/млрд $\times 10^{-2}$)	8	8,9 $\pm$ 0,08	5,4 ^a $\pm$ 0,49	60,5 ^c $\pm$ 6,3	228	60,5 ^e $\pm$ 6,7
$>$ М ср. (4,80 – 6,17 мг/млрд $\times 10^{-2}$)	7	8,9 $\pm$ 0,08	3,3 ^b $\pm$ 0,37	37,3 ^d $\pm$ 5,5	289	36,0 ^f $\pm$ 6,5

a, b: $P < 0,01$; c, d: $P < 0,05$; e, f: $P < 0,05$

Таблица 2. Показатели криоустойчивости спермы петухов в зависимости от содержания в ней холестерина (опыт II)

Содержание холестерина в сперме	Число петухов, гол.	% сперматозоидов без повреждения после деконсервации	Активность свежей спермы, балл.	Активность после деконсервации, балл.	% сохран. активности	Заложено яиц, шт.	Оплод. % от индивидуальных эякулятов
$\leq$ М ср. (3,60 – 6,47 мг/млрд $\times 10^{-2}$)	7	52,8 $\pm$ 4,0	9,6 $\pm$ 0,07	6,4 $\pm$ 0,6	65,9 $\pm$ 6,0	95	78,4 $\pm$ 3,4
$>$ М ср. (7,31 – 8,63 мг/млрд $\times 10^{-2}$)	5	44,6 $\pm$ 3,6	9,1 $\pm$ 0,43	5,7 $\pm$ 0,43	63,2 $\pm$ 6,2	61	67,5 $\pm$ 11,7

с содержанием холестерина на уровне $\leq$ М ср. отличается повышенной криоустойчивостью по сравнению со спермой с высоким содержанием холестерина. Это выражается в меньшей повреждаемости сперматозоидов в цикле замораживания-оттаивания (52,8% неповрежденных против 44,6%, опыт II); лучшей сохранностью активности (I опыт — 60,5% против 37,3%; II опыт — 65,9% против 63,2%); и, что очень важно — более высокой оплодотворяющей способности (I опыт — 60,5% против 36,0%; II опыт — 78,4% против 67,5%).

В итоге двухлетних экспериментов получена повторяемость результатов.

Анализ данных позволяет заключить, что содержание холестерина в сперме петухов оказывает значительное влияние на криотолерантность эякулятов. Такая оценка и отбор петухов для создания криобанка дает возможность повысить качество криоконсервированных эякулятов и экономическую целесообразность создания банка долговременного хранения генетического материала. Поэтому к имеющимся общепринятым параметрам отбора индивидуальных эякулятов для криокон-

сервации необходимо добавить еще один: уровень холестерина в сперме.

Выводы.

1. Установлена положительная корреляция между активностью сперматозоидов после деконсервации и степенью повреждения мембранных структур, полученных в процессе замораживания-оттаивания. Коэффициент ранговой корреляции между процентом сохранения активности и процентом поврежденных сперматозоидов в сперме составил -0,49 ($P < 0,01$).
2. Степень повреждений мембранных структур, полученных в процессе замораживания-оттаивания, и оплодотворяющая способность деконсервированной спермы зависит от содержания холестерина в нативной сперме.
3. Оценка и отбор петухов при создании криобанка с уровнем холестерина $\leq$ М ср. позволяет обеспечить лучшую сохранность мембранных структур сперматозоидов, более высокую подвижность сперматозоидов в деконсервированных эякулятах и, как следствие, более высокие (+10,9%...+24,5%) показатели оплодотворяемости яиц.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО

Литература

1. Целютин К. В. Криоконсервация спермы птиц — как инструмент сохранения генофонда / К. В. Целютин, Б. К. Тур // Генетика и разведение животных. — 2015. — № 1. — С. 50–52.
2. Артеменко А. Б. Влияние частоты осеменения кур заморожено-оттаянной спермой на оплодотворенность яиц / А. Б. Артеменко, А. В. Терещенко, О. Дунаева // Материалы IV Украинская конференция по птицеводству с международным участием. — 2003. — Алушта, Крым. — С. 372–375.
3. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных. — М. Сельхозиздат — 1962. — 696 с.
4. Watson P. F. Cold shock injury in animal cells / P. F. Watson, G. J. Morris // Symposia of the Society for Experimental Biology. — 1987. — Vol. 41. — P. 311–340.
5. Watson P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen // Animal Reproduction Science. — 2000. — Vol. 60 — 61. — P. 481–492.
6. Morris G. J. Freezing injury: The special case of the sperm cell / G. J. Morris, E. Acton J. , B. Murray, F. Fonseca // Cryobiology. — 2012. — Vol. 64. — P. 71–80.
7. Parks J. E. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes / J. E. Parks, D. V. Lynch // Cryobiology. — 1992. — Vol. 29. — P. 255–266.
8. Blesbois E. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation / E. Blesbois, I. Grasseau, F. Seigneurin // Reproduction. — 2005. — Vol. 129 (3). — P. 37–378.
9. Ahmed M. Cholesterol loaded cyclodextrin improves sperm survival in tris-based extender with less egg yolk used in buffalo bulls semen / M. Ahmed, A. Sattar, S. Iqbal, Q. Shahzad, M. Zahid Tahir, M. Hammad Fayyaz, M. Ahmad // The Thai Journal of Veterinary Medicine Suppl. — 2014. — Vol. 44 — P. 129–130.
10. Eubaid H. J. Possible role for cholesterol in human seminal fluidin relations to other semen parameters & fertility / H. J. Eubaid, B. A. Al-Haidary, L. J. Tawfiq // Journal of Babylon University / Pure and Applied Sciences. — 2015. — Vol. 23 (2). — P. 654–659.
11. Partyka A. Modification of membrane cholesterol and its impact on frozen-thawed chicken sperm characteristics / A. Partyka, D. Bonarska-Kujawa, M. Sporniak, i M. Strojeck, W. Nizański // Zygote. — 2016. — Vol. 24 (5). — P. 714–723.
12. Плешанов Н. В., Криоустойчивость спермы петухов в зависимости от содержания в ней липидов / Н. В. Плешанов, О. И. Станишевская // Генетика и разведение животных. — 2015. — № 1. — С. 53–57.
13. Белоус А. М., Грищенко В. И., Паращук Ю. С. Криоконсервация репродуктивных клеток: монография. — Киев: Издательство «Наукова Думка». — 1986. — 208 с.
14. Целютин К. В., Тур. Б. К. Искусственное осеменение и криоконсервация спермы (петухи, индюки, гусаки, селезни). — СПб. — Павел ВОГ. — 2013. — 85 с.
15. Попов И. И., Тур Б. К., Мавродина Т. Г., Давтян А. Д., Ройтер Я. С. Вопросы искусственного осеменения домашних птиц: методические рекомендации. Санкт-Петербург — Пушкин. — 2000. — 72 с.
16. Плешанов Н. В., Станишевская О.И., Новый критерий оценки качества спермы петухов на пригодность к криоконсервации // Материалы международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития современной репродуктивной технологии, криобиологии и их роль в интенсификации животноводства». — 2017. —Дубровицы. — Россия. — С. 170–174.

Pleshanov N. V., Stanishevskaya O. I., Silyukova Y. L.

Fertilizing ability of the cryopreserved cock sperm depending on cholesterol levels and cholesterol impact on the degree of damaging of the membrane structures in spermatozoa

Abstract. *One of the ways of preservation of the biological diversity in poultry and other farm animals is cryopreservation of reproductive cells. For poultry currently is already developed technology of spermatozoa, but percentage fertilization after thawing of individual ejaculates is on low level. During freezing and thawing spermatozoa can get both irreversible damages (losses of mobility and various morphological defects) and reversible damages (mainly temporary failures of the structure and penetration ability of membranes). Common parameters for selection of ejaculates for cryopreservation are: their volume, concentration and mobility of the spermatozoa. But these criteria do not reflect the whole degree of cryotolerance of the reproductive cells. This depends in wide extent on the condition of the membrane, because membranes are being firstly and mostly during the freezing and thawing process. There was found a positive correlation between spermatozoa mobility after thawing and degree of damaging of membrane structures during the freezing-thawing process. The coefficient of range correlation between the percentage of mobility and percentage of damaged spermatozoa was -0,49 ($P < 0,01$). In the article are presented results of the investigations of cryoresistance of cock sperm depending on lipid (cholesterol) in it. There are gained data of the cholesterol content in the native sperm with use of enzymatic colorimetric assay. The spermatozoa concentration was measured as $\text{mg/bln} \times 10^{-2}$. The parameters of the sperm membranes damaging were evaluated in de-frozen sperm with use of Sperm VitalStain colorant and microscopic visual system. There was found, that the sperm with cholesterol content on the level of $\leq M$ average had better cryoresistance compared to the sperm with high levels of cholesterol. This reflects in the lower damaging of the spermatozoa in freezing-thawing cycles (52,8% not damaged against 44,6%) in the experiment II; better mobility after thawing (60,5% against 37,3% in the experiment and 65,9% against 63,2% in the experiment II); and, most important, better fertilizing ability (60,5% against 36,0% in the experiment I and 78,4% against 67,5% in the experiment II).*

Key words: Poultry breeding, artificial insemination, sperm, lipids, cholesterol, cryopreservation.

Authors:

Pleshanov Nikolay Vyacheslavovich. — Junior research scientist of the Department of poultry genetics, breeding and gene pool preservation; Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry; Russia, St. Petersburg, Tyarlevo, Moscovskoe sh., 55 a; e-mail: klaus-90@list.ru;

Stanishevskaya Olga Igorevna. — Dr. Habil.(Biol.), Leading research scientist of the Department of poultry genetics, breeding and gene pool preservation; Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry; Russia, St. Petersburg, Tyarlevo, Moscovskoe sh., 55 a; e-mail: olgastan@list.ru;

Silyukova Yliya Leonidovna — zootechnician of the Department of poultry genetics, breeding and gene pool preservation; Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry; Russia, St. Petersburg, Tyarlevo, Moscovskoe sh., 55 a; e-mail: svadim33@mail.ru.

The study was supported by Federal Agency for Scientific Organizations program for support the bioresource collections

References

1. Celjutin K. V. Kriokonservacija spermy ptic — kak instrument sohraneniya genofonda (Cryopreservation of bird sperm as an instrument for gene pool conservation) / K. V. Celjutin, B. K. Tur // *Genetika i razvedenie zhivotnyh.* — 2015. — № 1. — С. 50–52.
2. Artemenko A. B. Vliyanie chastoty osemeneniya kur zamorozhenno-ottajannoju spermoju na oplodotvorennost' jaic (Effect of the frequency of insemination of chickens by frozen-thawed sperm on the fertilization of eggs) / A. B. Artemenko, A. V. Tereshhenko, O. Dunaeva // *Materialy IV Ukrainskaja konferencija po pticevodstvu s mezhdunarodnym uchastiem.* — 2003. — Alushta, Krym. — S. 372–375.
3. Milovanov V. K. Biologija vosproizvedeniya i iskusstvennogo osemeneniya zhivotnyh. — M. Sel'hozizdat — 1962. — 696 s.
4. Watson P. F. Cold shock injury in animal cells / P. F. Watson, G. J. Morris // *Symposia of the Society for Experimental Biology.* — 1987. — Vol. 41. — P. 311–340.
5. Watson P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen // *Animal Reproduction Science.* — 2000. — Vol. 60 — 61. — P. 481–492.
6. Morris G. J. Freezing injury: The special case of the sperm cell / G. J. Morris, E. Acton J. , B. Murray, F. Fonseca // *Cryobiology.* — 2012. — Vol. 64. — P. 71–80.
7. Parks J. E. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes / J. E. Parks, D. V. Lynch // *Cryobiology.* — 1992. — Vol. 29. — P. 255–266.
8. Blesbois E. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation / E. Blesbois, I. Grasseau, F. Seigneurin // *Reproduction.* — 2005. — Vol. 129 (3). — P. 371–378.
9. Ahmed M. Cholesterol loaded cyclodextrin improves sperm survival in tris-based extender with less egg yolk used in buffalo bulls semen / M. Ahmed , A. Sattar, S. Iqbal, Q. Shahzad, M. Zahid Tahir, M. Hammad Fayyaz, M. Ahmad // *The Thai Journal of Veterinary Medicine Suppl.* — 2014. — Vol. 44. — P. 129–130.
10. Eubaid H. J. Possible role for cholesterol in human seminal fluidin relations to other semen parameters & fertility / H. J. Eubaid, B. A. Al-Haidary, L. J. Tawfiq // *Journal of Babylon University / Pure and Applied Sciences .* — 2015. — Vol. 23 (2). — P. 654–659.
11. Partyka A. Modification of membrane cholesterol and its impact on frozen-thawed chicken sperm characteristics / A. Partyka, D. Bonarska-Kujawa, M. Sporniak, i M. Strojcek, W. Nizański // *Zygote.* — 2016. — Vol. 24 (5). — P. 714–723.
12. Pleshanov N. V., Krioustojchivost' spermy petuhov v zavisimosti ot sodержaniya v nej lipidov (Cryo-resistance of sperm of cocks depending on the content of lipids in it)/ N. V. Pleshanov, O. I. Stanishevskaja // *Genetika i razvedenie zhivotnyh.* — 2015. — № 1. — С. 53–57.
13. Belous A. M., Grishhenko V. I., Parashhuk Ju. S. Kriokonservacija reproduktivnyh kletok: monografija (Cryopreservation of reproductive cells: monograph). — Kiev: Izdatel'stvo «Naukova Dumka». — 1986. — 208 s.
14. Celjutin K. V., Tur. B. K. Iskusstvennoe osemenenie i kriokonservacija spermy (petuhi, indjuki, gusaki, selezni) (Artificial insemination and cryopreservation of sperm (cocks, turkeys, geese, drakes)). SPb.: Pavel VOG. — 2013. — 85 s.
15. Popov I. I., Tur B. K., Mavrodina T. G., Davtjan A. D., Rojter Ja. S. Voprosy iskusstvennogo osemeneniya domashnih ptic: metodicheskie rekomendacii (Questions of artificial insemination of domestic birds: guidelines). Sankt-Peterburg — Pushkin. — 2000. — 72 s.
16. Pleshanov N. V., Stanishevskaja O.I., Novyj kriterij ocenki kachestva spermy petuhov na prigodnost' k kriokonservacii (A new criterion for assessing the quality of sperm of cocks for suitability for cryopreservation) // *Materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Problemy i perspektivy razvitiya sovremennoj reproduktivnoj tehnologii, kriobiologii i ih rol' v intensivizacii zhivotnovodstva».* — 2017. — Dubrovicy, Rossiya. — С. 170–174.