

УДК 57.084:591.3:57.086.13

Е.Ф. Копейка, М.П. Петрушко\*, В.И. Пиняев, Т.А. Юрчук,  
Е.В. Павлович, К.Б. Миксон, К.И. Буцкий, А.А. Гапон, А.Ю. Пуговкин

## Криоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов лабораторных, сельскохозяйственных и диких животных

UDC 57.084:591.3:57.086.13

Е.Ф. Копейка, М.П. Petrushko\*, V.I. Piniayev, T.O. Yurchuk,  
O.V. Pavlovich, K.B. Mikson, K.I. Butskiy, H.O. Hapon, A.Yu. Puhovkin

## Cryopreservation of Reproductive Cells and Embryos of Laboratory, Agricultural and Wild Animals

**Реферат:** В представленном обзоре описывается текущее состояние проблемы криоконсервирования сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов животных. Проанализированы методические подходы для эффективного низкотемпературного сохранения генетических ресурсов животного мира, описаны этапы криоконсервирования гамет и эмбрионов животных. Показана результативность применения технологии криоконсервирования репродуктивных клеток и эмбрионов животных. Отмечено, что на данный момент успешно криоконсервированы половые клетки и эмбрионы многих видов лабораторных, сельскохозяйственных и диких животных, однако остаются нерешенными вопросы криоконсервирования ооцитов и эмбрионов некоторых видов птиц, рыб и млекопитающих. В работе обсуждаются подходы к разработке методов сохранения генетического материала тех видов, которые на сегодняшний день криоконсервировать не удалось.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, сперматозоиды, ооциты, эмбрионы, витрификация.

**Реферат:** У представленному огляді описується поточний стан проблеми криоконсервування сперматозоїдів, ооцитів і ембріонів тварин. Проаналізовано методичні підходи для ефективного низькотемпературного збереження генетичних ресурсів тваринного світу, описано етапи криоконсервування гамет і ембріонів тварин. Показана результативність застосування технології криоконсервування репродуктивних клітин і ембріонів тварин. Відзначено, що на даний момент успішно криоконсервовані статеві клітини і ембріони багатьох видів лабораторних, сільськогосподарських і диких тварин, проте залишаються невирішеними питання криоконсервування ооцитів і ембріонів деяких видів птахів, риб і ссавців. У роботі обговорюються підходи до розробки методів збереження генетичного матеріалу тих видів, які на сьогоднішній день криоконсервувати не вдалося.

**Ключові слова:** криоконсервування, сперматозоїди, ооцити, ембріони, вітрифікація.

**Abstract:** This review describes the state of the art in cryopreservation of animal spermatozoa, oocytes and embryos. We have analyzed methodical approaches for the effective low-temperature preservation of the genetic resources of animal world and specified the procedures of cryopreservation of animal gametes and embryos. The history of efficient cryopreservation for animal reproductive cells and embryos was described. To date the germ cells and embryos of many laboratory, agricultural and wild animals have been successfully cryopreserved, nevertheless there is still pending the issue with the oocytes and embryos of some species of birds, fishes and mammals. The paper discusses the ways for developing the methods to preserve the genetic material of those species that have not been successfully cryopreserved yet.

**Key words:** cryopreservation, spermatozoa, oocytes, embryos, vitrification.

На территории Украины обитает более 45 000 видов животных, из которых 542 вида находится под угрозой исчезновения [3]. Для сохранения ценных мировых генетических ресурсов животных комитет ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства рекомендует проводить мероприятия, направленные на воссоздание их популяций [71].

В Украине один из приоритетов государственной политики на 2005–2025 гг. в сфере приро-

More than 45,000 animal species inhabit Ukraine, among those 542 are endangered ones [18]. In order to conserve the world's valuable animal genetic resources, Food and Agriculture Organization of the United Nations recommends the activities to be undertaken to recreate their populations [71].

Biodiversity conservation is one of the Ukrainian state policy priorities for 2005–2025 in nature management, environmental safety and environmental protection [61].

Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryobiology of Reproductive System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: petrushkomarina@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: petrushkomarina@gmail.com

Надійшла 27.06.2017

Прийнята до друку 18.02.2019

Received June, 27, 2017

Accepted February, 18, 2019

© 2019 M.P. Petrushko, 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.

допользования, экологической безопасности и охраны окружающей среды – сохранение биоразнообразия [12].

Наилучшим способом поддержания популяции животных является их разведение путем естественного спаривания. Однако в результате влияния антропогенных факторов сокращаются природные ареалы обитания животных, что усложняет их размножение и препятствует восстановлению популяций: в мире половина из 6379 популяций находится на грани исчезновения [71]. Сохранение видового разнообразия возможно в заповедниках (*in situ*), при этом следует учитывать тот факт, что в естественной среде обитания породы животных могут эволюционировать и адаптироваться к изменяющимся условиям. Существуют и другие способы сохранения видового разнообразия: содержание вне естественных условий размножения и обитания (*ex situ*); криоконсервирование гамет и эмбрионов (*ex situ in vitro*), позволяющие создавать коллекции наиболее полного аллельного разнообразия для каждого вида и породы с целью последующего воспроизводства. Стратегия сохранения животных *ex situ in vitro* основывается на достижениях криобиологии и реализуется с помощью вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В последнее время во многих странах мира выделяются значительные средства для создания криобанков репродуктивных клеток и эмбрионов диких, мутантных и трансгенных видов лабораторных животных, пород домашнего скота, а также представителей дикой фауны [14].

В связи с этим необходима разработка эффективных способов криоконсервирования, которое является одним из этапов биотехнологического процесса долгосрочного хранения генетического материала ценных и исчезающих видов животных [2]. Перспективным в этом направлении является сохранение генетического материала в условиях *in vitro*, поскольку для его реализации требуются небольшие финансовые затраты и технологически простые методики [56]. Для воссоздания организмов из половых клеток, хранящихся в криобанках, используются только геномы особей банковского резерва. Поэтому для поддержания биоразнообразия важно увеличивать запасы репродуктивного материала особей в пределах одного вида. Кроме того следует учитывать, что при реинтродукции восстановленных видов в естественную популяцию изменяется ее генетическая структура, что может быть причиной нерегулируемых «вспышек» размножения, нарушения биологических связей в сообществах и аномального поведения животных.

The best way to maintain a population of animals is to breed them via natural mating. However, influence of anthropogenic factors results in a reduction of natural habitats of animals, that complicates their reproduction and prevents the restoration of populations: half of the 6,379 world populations are on the extinction verge [71]. Conservation of species diversity is possible in wildlife sanctuaries (*in situ*), and it should be borne in mind that animal breeds can evolve and adapt to changing conditions in their natural habitat.

There are other ways to preserve species diversity: keeping beyond the natural conditions of reproduction and habitat (*ex situ*); cryopreservation of gametes and embryos (*ex situ in vitro*), allowing to establish the collections of the most full allele diversity for each species and breed with the aim of further reproduction. The *ex situ in vitro* animal conservation strategy is based on the achievements of cryobiology and is implemented using the assisted reproductive technologies (ART). Recently, many countries of the world allocated significant funds for the establishing the cryobanks of reproductive cells and embryos of wild, mutant and transgenic species of laboratory animals, livestock breeds, as well as representatives of wild fauna [2]. In this regard, the development of effective cryopreservation methods, that is one of the stages of the biotechnological process of long-term storage of genetic material of valuable and endangered species of animals, is vital [27].

Prospective direction is the preservation of genetic material *in vitro*, since its implementation requires quite a low funding and simple technological approach [49]. To get organisms from germ cells stored in cryobanks one can use only genomes of individuals being a part of the bank reserve. Therefore, to maintain biodiversity, it is important to enhance the stocks of reproductive material of the individuals within the same species. In addition, it should be taken into account that the reintroduction of the ‘restored’ individuals into natural population changes its genetic structure, which may be the cause of unregulated ‘outbreaks’ of reproduction, disruption of community networks and abnormal behavior of animals.

An important cryobiological task is to preserve not only the biodiversity of gametes and embryos, but also their morphofunctional integrity, as well as genetic stability [27]. It is known that the genetic apparatus of reproductive cells and embryos can be damaged during cryopreservation and long-term storage [40]. To uncover the mecha-



Важной криобиологической задачей является сохранение не только биоразнообразия гамет и эмбрионов, но и их морфофункциональной целостности, а также генетической стабильности [2]. Известно, что генетический аппарат репродуктивных клеток и эмбрионов может повреждаться в процессе криоконсервирования и долгосрочного хранения [48]. Для установления механизмов криоповреждений генома гамет и эмбрионов необходимо проведение фундаментальных исследований, направленных на изучение морфологических, цитологических и цитогенетических характеристик клеток, что позволит сохранить не только структуру, функциональные характеристики, но и геном репродуктивных клеток и эмбрионов животных.

Цель работы – обобщение сведений, касающихся проблемы криоконсервирования репродуктивных клеток и эмбрионов для сохранения генетического материала лабораторных, домашних и диких животных.

*Этапы криоконсервирования гамет и эмбрионов.* Криоконсервирование как способ совершенствовался параллельно с развитием ВРТ, направленных на лечение бесплодия человека [10], которые включают в себя: криоконсервирование сперматозоидов человека [8] и долгосрочное низкотемпературное хранение ооцитов и эмбрионов [1, 9].

Криоконсервирование большинства биообъектов, в том числе гамет и эмбрионов разных видов животных, состоит из нескольких технологических этапов: получение биоматериала; транспортировка биообъектов, гипотермическое хранение; экспозиция биоматериала с криозащитными средами; выбор контейнера для криоконсервирования биоматериала; охлаждение биообъектов до температуры жидкого азота и последующее их хранение в криобанке; нагрев биообъектов и удаление криопротектора; оценка жизнеспособности биоматериала.

Для снижения повреждающего действия низких температур на биообъект важен подбор криопротекторов для среды, обеспечивающей защиту и обладающей низкой токсичностью [15]. При этом должны учитываться структура и свойства замораживаемого материала, а также видовые отличия каждого типа клеток. Проникающие криопротекторы (глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль (ЭГ), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), диметилацетамид (ДМАА), диметилформамид (ДМФА) и др.) снижают точку замораживания раствора, взаимодействуют с мембранными структурами клетки, предотвращают рост

mechanisms of cryogenic damage in the genome of gametes and embryos, it is necessary to perform fundamental studies of morphological, cytological and cytogenetic characteristics of cells, which will help to preserve not only the structure and functional characteristics, but also of the genome of reproductive cells and animal embryos.

The purpose of the work was to compile information on the cryopreservation of reproductive cells and embryos used for the conservation of the genetic material of laboratory, domestic and wild animals.

*Stages in cryopreservation of gametes and embryos.* Cryopreservation as a method was developed simultaneously with the improvement of ART in terms of human infertility treatment [67], and included human sperm cryopreservation [65] and long-term low-temperature storage of oocytes and embryos [7, 66].

Cryopreservation of most biological objects, including gametes and embryos of various animal species, consists of several technological steps: biomaterial obtaining; transportation of biological objects, hypothermic storage; exposure of biomaterial with cryoprotective media; selection of the container for biomaterial cryopreservation; cooling of biological objects down to the temperature of liquid nitrogen and their subsequent storage at cryobank; warming of biological objects and cryoprotectant removing; assessment of the biomaterial viability.

To reduce the damaging effect of low temperatures on a biological object, the selection of proper cryoprotectant medium, providing the protection and having a low toxicity is important [3]. This should take into account the structure and properties of the specimens which is planned to be frozen, as well as the species differences for each cell type. Penetrating cryoprotectants (glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl acetamide (DMAA), dimethylformamide (DMF), etc.) reduce the freezing point of the solution, interact with membrane structures of cells, prevent the growth of concentrations of intra- and extracellular electrolytes resulting from the water transport, in particular during its freezing. Non-penetrating cryoprotectants (sucrose, trehalose, polyvinylpyrrolidone (PVP), polyethylene glycol (PEG), etc.) protect cells against osmotic pressure changes during cryopreservation [70].

Depending on the applied cooling rate of a bio-object cooling there are the following types of freezing regimens: very slow (less than 1 deg/min), slow (1–10 deg/min), rapid (10–100 deg/min), very



концентраций внутри- и внеклеточных электролитов в результате транспорта воды, в частности при ее вымерзании. Непроницающие криопротекторы (сахароза, трегалоза, поливинилпирролидол (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ) и др.) защищают клетки от перепадов осмотического давления в процессе криоконсервирования [11].

В зависимости от применяемой скорости охлаждения биообъекта выделяют очень медленные (менее 1 град/мин), медленные (1–10 град/мин), быстрые (10–100 град/мин), очень быстрые (100–1000 град/мин) и сверхбыстрые (1000–10 000 град/мин и более) режимы. Для криоконсервирования гамет и эмбрионов животных обычно используют медленное охлаждение, реализуемое с помощью программных замораживателей. Однако дороговизна и сложность использования данного оборудования в полевых условиях являются существенными его недостатками. Альтернативой стандартному замораживанию различных биообъектов можно считать витрификацию, которая широко применяется для криоконсервирования ооцитов и эмбрионов [45]. Витрификация предполагает стеклование всего объема образца за счет использования высоких концентраций растворов криопротекторов и/или сверхвысоких скоростей охлаждения, что позволяет избежать повреждения клеточных структур кристаллами льда.

Для криоконсервирования репродуктивных клеток, эмбрионов и тканей используют специальные контейнеры. Они должны быть биобезопасными и сохранять прочность при длительном низкотемпературном хранении. Для замораживания сперматозоидов применяют пластиковые криовials [49], соломинки [92], для ооцитов и эмбрионов – преимущественно соломинки (закрытая система замораживания) и носители типа микропластин, криотеки и криотопы (открытая система замораживания) [41, 57].

Выживаемость гамет и эмбрионов после длительного низкотемпературного хранения во многом зависит от параметров процесса нагрева. Для клеток, охлажденных с контролируемой низкой скоростью, показан медленный нагрев с целью регидратации и выхода из них криозащитного вещества. При быстром охлаждении необходим быстрый нагрев, который предотвращает развитие процесса рекристаллизации. Выбор режима нагрева зависит от объекта криоконсервирования, способа замораживания и типа криопротектора. В настоящее время технология нагрева гамет и эмбрионов не стандартизирована.

Следующим этапом после нагрева является удаление криопротекторов, которые могут ока-

rapid (100–1000 deg/min) and ultra-rapid (1,000–10,000 deg/min and higher). Cryopreservation of gametes and embryos of animals usually involves slow cooling, which is performed with programmable freezers. Nevertheless it has significant drawbacks like, high operation costs and complexity of using this equipment in the field. An alternative to the conventional freezing of various biological objects is vitrification, which is widely used for cryopreservation of oocytes and embryos [36]. Vitrification is basically the glass transition of the entire volume of the sample due to the use of high concentrations of cryoprotectant solutions and/or ultra-high cooling rates, and allows the avoiding of damage to the cell structures by ice crystals.

Special containers are used for cryopreservation of reproductive cells, embryos and tissues. They must be biosafe and retain strength during long-term low-temperature storage. Plastic cryovials [41], straws [92] are applied for freezing sperm, for oocytes and embryos – mainly straws (closed freezing system) and microplate type carriers, cryotecs and cryotops (open freezing system) [32, 50].

The survival of gametes and embryos after long-term low-temperature storage depends largely on the parameters of the heating process. For cells cooled at a controlled low rate, slow heating is recommended for rehydration and removal of a cryoprotectant from them. In case of rapid cooling, rapid heating is necessary, which helps to prevent the recrystallization. The choice of heating regimen depends on the nature of cryopreserved object, freezing method and type of cryoprotectant. At present, the warming techniques for gametes and embryos are not standardized.

The next stage after heating is the removal of cryoprotectants, which can have a cytotoxic effect on gametes and embryos. In the case of sperm cryopreservation, this is usually achieved by a single dilution of the cell suspension with culture medium and centrifugation followed by removal of the supernatant [79]. Reduction of osmotic shock in cryopreserved oocytes and embryos could be achieved by stepwise wash-out of penetrating cryoprotectant from the cells using a non-penetrating osmotic component, *e. g.* sucrose.

To date, many stages of cryopreservation are standardized, which allows to improve the reproducibility of the results and to achieve high preservation rate of gametes and embryos of many species of animals (Table).

*Cryopreservation of animal sperm.* The first attempt for cryopreservation of sperm of some spe-

зывать цитотоксическое действие на гаметы и эмбрионы. В случае криоконсервирования сперматозоидов это достигается, как правило, путем однократного разведения клеточной суспензии культуральной средой и центрифугированием с последующим удалением супернатанта [79]. При криоконсервировании ооцитов и эмбрионов для снижения осмотического шока отмывку клеток от проникающего криопротектора проводят ступенчато с использованием непроникающего осмотического компонента, например, сахарозы.

На сегодняшний день многие этапы криоконсервирования стандартизированы, что позволяет улучшить воспроизводимость результатов и добиться высокой сохранности гамет и эмбрионов многих видов животных (таблица).

*Криоконсервирование сперматозоидов животных.* Первая попытка криоконсервирования сперматозоидов некоторых видов сельскохозяйственных животных была предпринята в 1949 г. после открытия защитных свойств глицерина [69]. В настоящее время разработаны способы низкотемпературного хранения сперматозоидов для более 80 видов млекопитающих, 10 видов птиц, множества видов рептилий, амфибий, рыб и некоторых беспозвоночных (иглокожих, моллюсков, ракообразных). Во многих странах мира для разведения домашних животных используют искусственную инсеминацию криоконсервированной спермой. Наибольшее практическое применение технология имеет при разведении лошадей, свиней, овец, коз, кроликов, птиц и рыб [69, 80]. Получение эякуляторных сперматозоидов может быть затруднено у некоторых видов животных, например, у диких стадных животных, овец и домашней птицы [78]. Поэтому в последнее время разрабатываются новые способы криоконсервирования сперматозоидов, полученных при аспирации или экстракции сперматозоидов из яичка или придатка яичка [44]. Одна из особенностей эякуляторных и эпидидимальных сперматозоидов – высокое содержание в их плазматической мембране полиненасыщенных жирных кислот [85]. Определенный липидный состав эякуляторных сперматозоидов достигается только после эпидидимального созревания и специфичен не только для классов [70], но и для видов животных [61, 86], а также для фертильных и субфертильных популяций одного и того же вида [13]. Видовыми различиями состава жирных кислот и соотношением липидов в сперматозоидах, которые определяют криорезистентность при замораживании-оттаивании [68], объясняется разнообразие применяемых криозащитных сред и режимов охлаждения гамет

of farm animals was undertaken in 1949 after the discovery of the protective properties of glycerol [69]. Currently, there are the methods for the storage of low temperature spermatozoa for more than 80 species of mammals, 10 species of birds, many species of reptiles, amphibians, fish, and some invertebrates (echinoderms, mollusks, crustaceans). In many countries of the world, artificial insemination with cryopreserved sperm is used for breeding domestic animals. The technology has the greatest practical application for breeding horses, pigs, sheep, goats, rabbits, birds and fish [69, 80]. The production of ejaculatory spermatozoa can be difficult in some animal species, for example, wild herd animals, sheep and poultry [78]. Therefore, recently, new methods of cryopreservation of spermatozoa obtained by aspiration or extraction of sperm from the testicle or epididymis have been developed [35]. One of the features of the ejaculatory and epididymal spermatozoa is the high content of polyunsaturated fatty acids in their plasma membrane [85]. A certain lipid composition of ejaculatory spermatozoa is a result of epididymal maturation and is peculiar not only for taxonomical classes [69], but also for species [56, 86], as well as for fertile and subfertile populations [1]. The species specific differences in fatty acid composition and lipid ratios in spermatozoa, which may determine cryoresistance during freeze-thawing [64], explain the diversity of cryoprotective media used as well as the cooling regimens applied for gametes of various animal classes (mammals, birds, fish) and species within the class.

For cryopreservation of spermatozoa of most mammalian species one uses 5–10% glycerol as a protective solution and slow cooling: from room temperature to down  $-5^{\circ}\text{C}$  at a rate of 0.3–1 deg/min, initiation of crystallization and subsequent cooling down to  $-80^{\circ}\text{C}$  at a rate of 1–10 deg/min with following immersion into liquid nitrogen. During rapid cooling, the biological object is kept for 12–30 min in nitrogen vapor (*e. g.* 8 cm above the nitrogen surface), then it is immersed into liquid to nitrogen (cooling rate 100–150 deg/min) [17]. It should be noted that these regimens are not applicable to all bioobjects. For example, the buffalo sperm are the most susceptible to damage during slow cooling (due to the low content of phospholipids in the membranes and lipid loss during freezing-heating) [77]. Adding of egg yolk to cryoprotective media stabilizes the spermatozoan phospholipid membrane and increases its resistance to the damaging factors of freezing due to the low density lipoproteins contained in it [62].

различных классов животных (млекопитающие, птицы, рыбы) и видов в пределах класса.

Для криоконсервирования сперматозоидов большинства видов млекопитающих в качестве защитного раствора применяют 5–10%-й глицерин и медленное охлаждение: от комнатной температуры до  $-5^{\circ}\text{C}$  со скоростью 0,3–1 град/мин, инициацию кристаллизации и последующее охлаждение до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью 1–10 град/мин с погружением в жидкий азот. При быстром охлаждении биообъект выдерживают в течение 12–30 мин в парах азота (8 см над поверхностью азота), затем его погружают в жидкий азот (скорость охлаждения 100–150 град/мин) [28]. Следует отметить, что указанные режимы применимы не для всех биообъектов. Так, наиболее восприимчивы к повреждениям при медленном охлаждении сперматозоиды буйвола (из-за низкого содержания фосфолипидов в мембранах и потери липидов при замораживании-нагреве) [77]. Яичный желток в составе криозащитных сред благодаря содержащимся в нем липопротеинам низкой плотности стабилизирует фосфолипидную мембрану сперматозоидов и повышает ее устойчивость к повреждающим факторам замораживания [66].

При криоконсервировании сперматозоидов козла необходимо предварительное отделение клеток от семенной плазмы, поскольку она содержит фермент, изменяющий плазматические мембраны сперматозоидов после взаимодействия с липидами и фосфолипидами [74]. Сперму барана успешно криоконсервируют с использованием медленного режима охлаждения в присутствии 5–10%-го глицерина [73]. Криорезистентность спермы этого вида животного зависит от времени года получения клеток [25]. Для криоконсервирования спермы свиней широко применяют медленное охлаждение и комбинированную среду на основе лактозно-яичного консерванта и глицерина [91].

При использовании криопротекторов глицерина и ЭГ сперматозоиды кролика имеют низкую криорезистентность. Использование защитных сред на основе сочетания проникающих и непроникающих криопротекторов (ацетамида,

Результативность криоконсервирования репродуктивных клеток и эмбрионов животных  
Efficiency of cryopreservation of reproductive cells and embryos of animals

| Виды / Species  | Сперматозоиды Spermatozoa | Ооциты Oocytes | Эмбрионы Embryos |
|---|---------------------------|----------------|------------------|
| <b>Лабораторные животные / Laboratory Animals</b>           |                           |                |                  |
| Мышь / Mouse  | +                         | +              | +                |
| Крыса / Rat   | +                         | +              | +                |
| Хомяки / Hamsters   | +                         | ±              | +                |
| Кролики / Rabbits   | +                         | +              | +                |
| <b>Сельскохозяйственные животные / Agricultural Animals</b> |                           |                |                  |
| Крупный рогатый скот / Cattle ( <i>Bos sp., var. dom.</i> ) | +                         | +              | +                |
| Овца / Sheep ( <i>Ovis sp., var. dom.</i> )                 | +                         | ± *            | +                |
| Коза / Goat ( <i>Capra sp., var. dom.</i> )                 | +                         | ±              | +                |
| Лошадь / Horse ( <i>Equus sp., var. dom.</i> )              | +                         | ±              | ±                |
| Свинья / Pig ( <i>Sus sp., var. dom.</i> )                  | +                         | +              | ±                |
| Курица / Chicken ( <i>Gallus sp., var. dom.</i> )           | +                         | –              | –                |
| Гусь / Goose ( <i>Anser sp., var. dom.</i> )                | +                         | –              | –                |
| Индюк / Turkey ( <i>Meleagris sp., var. dom.</i> )          | +                         | –              | –                |
| Осетр / Sturgeon ( <i>Acipenser sp., var. dom.</i> )        | +                         | –              | –                |
| Форель / Trout ( <i>Salmo sp., var. dom.</i> )              | +                         | –              | –                |
| Карп / Carp ( <i>Cyprinus sp., var. dom.</i> )              | +                         | –              | –                |
| <b>Дикие животные / Wild Animals</b>                        |                           |                |                  |
| Олень / Deer ( <i>Cervus sp.</i> )                          | +                         | ±              | +                |
| Носорог / Rhinoceros ( <i>Rhinoceros sp.</i> )              | +                         | ±              | +                |
| Антилопа / Antelope ( <i>Antilope sp.</i> )                 | +                         | ±              | +                |
| Волк / Wolf ( <i>Canis sp.</i> )                            | +                         | ±              | +                |
| Лисица / Fox ( <i>Vulpes sp.</i> )                          | +                         | ±              | +                |
| Медведь / Bear ( <i>Ursus sp.</i> )                         | +                         | ±              | ±                |
| Тигр / Tiger ( <i>Panthera tigris</i> )                     | +                         | ±              | ±                |
| Пума / Puma ( <i>Puma sp.</i> )                             | +                         | ±              | +                |
| Леопард / Leopard ( <i>Panthera pardus</i> )                | +                         | ±              | +                |
| Горилла / Gorilla ( <i>Gorilla sp.</i> )                    | +                         | +              | +                |

**Примечания:** «+» – высокие результаты в практике; «±» – положительные результаты, в практике не используются; «–» – отсутствие способов криоконсервирования; \* – существуют способы криоконсервирования ткани яичников.

**Notes:** «+» – high results in practice; «±» – positive results, but not used in practice; «–» – lack of cryopreservation methods; \* – existing methods of cryopreservation of ovarian tissue.

треалозы и метилцеллюлозы) повышает жизнеспособность криоконсервированной спермы указанного вида [26].

В настоящее время для криоконсервирования сперматозоидов некоторых видов обезьян, оленей и других видов животных применяют медленное охлаждение, раствор трис-буфера с яичным желтком и 5%-м глицерином [24].

Криоконсервированную сперму используют, как правило, при искусственной инсеминации с целью получения потомства от ценных племенных самцов многих видов домашних и сельскохозяйственных животных [18]. По сравнению с естественным размножением искусственная инсеминация позволяет максимизировать репродуктивный потенциал, разделяя на порции эякулят, осеменять сразу нескольких самок, улучшать генетические характеристики пород сельскохозяйственных животных. Искусственную инсеминацию криоконсервированной спермой применяют в зоопарках при отказе животных от спаривания. Кроме того, инсеминацию можно проводить в благоприятный для реципиента день и транспортировать криоконсервированный образец спермы в отдаленное хозяйство. В 1973 г. впервые успешно была проведена искусственная инсеминация криоконсервированной спермы волчице в дикой природе [32], затем успешное осеменение гориллы [36]. Однако попытки искусственно оплодотворить некоторые виды диких кошек оказались неудачными.

В птицеводстве криоконсервирование спермы до настоящего времени находится на стадии разработки. В научной литературе описаны методы, позволяющие сохранять подвижность сперматозоидов птиц (петух, гусь, перепел) после криоконсервирования. При этом не все клетки после оттаивания могут быть функционально-полноценными, поэтому частота оплодотворения остается низкой и составляет 1–30% [5]. Повреждения, возникающие в процессе криоконсервирования сперматозоидов птиц, в основном затрагивают клеточные мембраны и, прежде всего, митохондриальные. Кинетическая активность сперматозоидов, которые должны длительно храниться в маточно-вагинальных железах самки, снижается, что негативно влияет на частоту оплодотворения [54].

В случае возникновения эпидемий птичьего гриппа необходима разработка эффективных методов криоконсервирования спермы. Наличие банка спермы высокопродуктивных пород позволит повысить результативность селекционно-генетической работы и восстановление пород при утрате их отличительных адаптивных генов.

Cryopreservation of goat spermatozoa requires a preliminary separation of spermatozoa from seminal plasma, because it contains an enzyme that changes the plasma membranes of spermatozoa after interacting with external lipids and phospholipids [74]. Ram semen is successfully cryopreserved using a slow cooling regimen in the presence of 5–10% glycerol [73]. The cryoresistance of sperm in this species depends on the season of year when the cells were obtained [14]. For cryopreservation of pig sperm one uses a combination medium based on lactose-egg preservative and glycerol and slow cooling is applied [91].

Rabbit spermatozoa show low cryoresistance if glycerol and EG are used as cryoprotectants, rabbit spermatozoa have low cryoresistance. The use of protective media based on a combination of penetrating and non-penetrating cryoprotectants (acetamide, trealose and methylcellulose) increases the viability of the cryopreserved sperm in this species [15].

Currently, cryopreservation of spermatozoa of some species of monkeys, deer and other animal species involves the use of a solution of Tris-buffer with egg yolk and 5% glycerol and slow cooling [13].

Cryopreserved sperm is used, as a rule, during artificial insemination in order to obtain offspring from valuable breeding males of many species of domestic and farm animals [6]. Compared with natural reproduction, artificial insemination allows maximizing reproductive potential by separation of ejaculate into several portions, insemination of several females at once, and improving the genetic characteristics of breeds of farm animals. Artificial insemination with cryopreserved sperm is used in zoos when animals refuse to mate. In addition, this method allows an insemination in the day favorable for the recipient and transportation of the cryopreserved sperm sample to a remote facility. In 1973, artificial insemination with cryopreserved sperm was carried out for the first time for a wild wolf [22], later a successful insemination of the gorilla was performed [26]. However, attempts to artificially fertilize some species of wild cats remain unsuccessful.

In the poultry industry, sperm cryopreservation is still under development. There are the reports with the described methods that allow the preservation of birds semen motility (rooster, goose, quail) after cryopreservation. At the same time, not all of the cells after thawing can be functionally high-grade, therefore the rate of fertilization remains low, *i. e.* 1–30% [45]. The injuries arising in the



Работы по криоконсервированию сперматозоидов проводились более чем с 200 видами рыб, в основном с пресноводными, которые используются в аквакультуре. Эффективность криоконсервирования сперматозоидов разных видов рыб отличается, при этом более высокие результаты достигнуты при криоконсервировании спермы морских видов рыб, чем пресноводных [40]. Описаны методики криоконсервирования половых клеток рыб, в частности осетровых [90] и карповых [52]. Сперму рыб можно криоконсервировать как в лабораторных, так и полевых условиях (без использования сложных замораживающих установок). Медленное охлаждение, которое предполагает использование высокотехнического оборудования, для криоконсервирования спермы исчезающих видов рыб в полевых условиях не представляется возможным. В этой связи актуальной является разработка простых и доступных способов, позволяющих заморозить образец быстро и эффективно [16, 40, 42]. В качестве криопротекторов чаще всего используют ДМСО, глицерин, ЭГ, метанол, 1,2-ПД и ДМАЦ в концентрации 5–15% (v/v). Насыщение образцов криопротекторным раствором проводят в течение 10–15 мин при 4°C. Процедура их охлаждения обычно осуществляется медленным способом, при этом она аналогична той, которая применяется для криоконсервирования сперматозоидов млекопитающих. Нагрев спермы проводят преимущественно на водяной бане с температурой до 40°C, после чего ее немедленно используют для искусственного оплодотворения, поскольку с течением времени подвижность и оплодотворяющая способность сперматозоидов быстро снижаются. Повышение осмотического давления на мембраны сперматозоидов во время смешивания спермы с криозащитной средой является одним из основных повреждающих факторов, влияющих на результат криоконсервирования [29]. Кроме того, в процессе охлаждения-нагрева существенно изменяется осмолярность среды, выходя за пределы физиологических значений для сперматозоидов [21]. Известно, что в анизоосмотических условиях сперматозоиды пресноводных рыб не способны к сохранению объема клетки, поэтому их криорезистентность ниже, чем у сперматозоидов морских видов [4, 47].

*Криоконсервирование ооцитов животных.* Ооциты животных, в отличие от сперматозоидов, характеризуются низкой выживаемостью после замораживания-оттаивания. Основные проблемы криоконсервирования ооцитов обусловлены особенностями строения плазматической мембраны,

process of cryopreservation of bird spermatozoa mainly affects the cell membranes and mainly the mitochondrial membrane. The kinetic activity of spermatozoa, which must be stored for a long time in the uterine-vaginal glands of the female, is reduced, which negatively affects the fertilization rate [47].

Due to repeating avian influenza outbreaks, the development of effective methods for sperm cryopreservation is important. The existence of the sperm bank of highly productive breeds will increase the effectiveness of breeding and procedures, as well as restore the breed if the distinctive genes would be lost.

Sperm cryopreservation was carried out with more than 200 species of fish, mainly freshwater, which are used in aquaculture. The cryopreservation of sperm of various fish species is different, and better results (if compared with fresh water species) were achieved when cryopreserving semen of marine fish species [31]. There are numerous protocols for cryopreservation of gamete cells of fish, in particular sturgeon [90] and carp [44]. Fish sperm can be cryopreserved in both laboratory and field conditions (without using complex devices freezing). Slow cooling, which involves the use of complex equipment, to cryopreserve semen of endangered fish species in field conditions is not possible. In this regard, the development of simple and affordable methods to freeze the sample quickly and efficiently [4, 31, 33] is still relevant. DMSO, glycerol, EG, methanol, 1,2-PD and DMAC at concentration of 5–15% (vol/vol) are most often used as cryoprotectants. Samples are usually incubated with a cryoprotectant solution for 10–15 min at 4°C. The cooling is usually carried out slowly, similarly to that used in the cryopreservation of mammalian spermatozoa. Heating of sperm is carried out mainly in a water bath with a temperature of up to 40°C, and there after it is immediately used for artificial insemination, due to a rapid reduction in the motility and fertilizing ability of sperm cells after several minutes. The increase in osmotic pressure on sperm membranes during mixing of sperm with a cryoprotective medium is one of the main damaging factors affecting the result of cryopreservation [19]. In the process of cooling-heating, the osmolarity of the medium significantly changes, going beyond the limits of physiological values for spermatozoa [10].

It is known that under anisotonic conditions, freshwater fish spermatozoa are not capable of keeping cell volume, therefore their cryoresistance is lower than that of marine spermatozoa [38, 39].



наличием кортикальных гранул и мейотического веретена [81]. Кроме того, высокое содержание внутриклеточной воды, крупный размер, низкое соотношение площади поверхности к объему – основные критерии для подбора эффективного протокола криоконсервирования [50]. При этом важно учитывать межвидовые различия в строении ооцитов. Так, у рыб, птиц, амфибий и рептилий размер ооцитов существенно превышает размер ооцитов млекопитающих, что значительно усложняет замораживание клеток.

Плазматическая мембрана ооцитов на стадии МII имеет низкий коэффициент проницаемости, при этом дополнительным барьером является *Zona pellucida* (ZP), вследствие этого диффузия воды и криопротекторов происходит медленнее, чем у соматических клеток и сперматозоидов [72]. В результате замораживания-оттаивания происходит преждевременный кортикальный экзоцитоз, что приводит к затвердеванию ZP и делает невозможным проникновение спермия через оолемму [19, 59]. Поэтому для оплодотворения криоконсервированных ооцитов применяют технологию интацитоплазматической инъекции спермия в ооцит [51].

Мейотическое веретено млекопитающих представляет собой динамический конгломерат тубулина и связанных с ним белков и обеспечивает расхождение хромосом к полюсам клетки при созревании ооцита на стадии МII [27]. Мейотическое веретено формируется за счет полимеризации и деполимеризации тубулиновых микротрубочек, чувствительных к действию факторов криоконсервирования [22, 43], которые, в свою очередь, могут привести к развитию анеуплоидного эмбриона [27].

Низкий уровень выживаемости криоконсервированных ооцитов и эмбрионов свиньи, крупного рогатого скота и других видов животных обусловлен высоким содержанием липидов [89]. Например, в ооцитах свиней содержится 161 нг липидов, что в ~2,5 раза больше, чем в ооцитах быка, которые содержат в 17 раз больше липидов, чем ооциты мышей [60]. Вероятно, относительно низкое содержание липидов в ооците мыши стало причиной его успешного криоконсервирования (1976 г.) [67, 88]. В 1985 г. W.F. Rall и G.M. Fahy сообщили об удачной попытке витрификации ооцитов крупного рогатого скота и других домашних животных [33, 39, 55, 64].

Ученым удалось повысить криорезистентность ооцитов путем снижения содержания липидов [35, 76]. Ранее это достигалось механическим удалением липидных капель [63]. К сожалению, после проведения таких процедур снижалась частота

*Cryopreservation of animal oocytes.* Unlike the case of sperm cells the animal oocytes are characterized by low survival after freezing and thawing. The main problems of cryopreservation of oocytes are due to the structural features of the plasma membrane, the presence of cortical granules and the meiotic spindle [81]. The high content of intracellular water, large cell size, low surface-to-volume ratio are the main criteria for selecting an effective cryopreservation protocol [42]. It is important to take into account interspecific differences in the structure of oocytes. In particular, in fish, birds, amphibians and reptiles, the size of the oocytes is much larger than in mammals, which greatly complicates the successful freezing of the cells.

The plasma membrane of oocytes at stage MII has a low permeability coefficient, and *Zona pellucida* (ZP) as an additional barrier because of which the diffusion of water and cryoprotectants is slower than that in somatic cells and spermatozoa [72]. Freeze-thawing, results in premature cortical reaction, which causes ZP hardening and entails the impossibility of sperm penetration through the oolemma [8, 52]. Therefore, the fertilization of cryopreserved oocytes often involves intracytoplasmic sperm injection into the oocyte [43].

The meiotic spindle in mammals is a dynamic conglomerate of tubulin and associated proteins and provides the movement of chromosomes to the poles of the cell during the maturation of the oocyte at stage MII [27]. The meiotic spindle is formed due to the polymerization and depolymerization of tubulin microtubules sensitive to the effects of cryopreservation factors [11, 34], and unsuccessful outcome could be e. g. the development of an aneuploid embryo [16].

The low survival rate of cryopreserved oocytes and embryos of pigs, cattle and other animal species is caused by a high content of lipids [89]. For example, a pig oocyte contains 161 of lipids, which is almost 2.5 times more than in bull oocytes, which in turn contain 17 times more lipids than mouse oocytes [60]. It is likely that the relatively low content of lipids in the mouse oocyte was the reason for its successful cryopreservation (in 1976) [63, 88]. In 1985, W.F. Rall and G.M. Fahy reported a successful attempt to vitrify oocytes in cattle and other domestic animals [23, 30, 48, 59].

Scientists were able to increase the cryoresistance of oocytes by reducing the lipid content [25, 76]. Early this was achieved by mechanical removal of lipid droplets [58]. Unfortunately, after

оплодотворения и дробления эмбрионов *in vitro* [34]. Фармакологические подходы к истощению липидных капель были более щадящими, поскольку основывались на усилении катаболизма и ингибировании синтеза липидов [84]. Поскольку процесс делипидизации достаточно дорогостоящий, трудоемкий и длительный, он не нашел широкого применения в практической криобиологии.

На сегодняшний день успешных методов криоконсервирования ооцитов птиц, рыб и земноводных не существует [23]. Яйцеклетки этих животных характеризуются крупным размером, имеют высокое содержание липидов и полярную организацию [37]. По-видимому, перечисленные особенности строения ооцитов являются причиной их низкой криорезистентности. Для создания эффективных протоколов криоконсервирования необходимо исследование механизмов криорезистентности ооцитов животных и выявление факторов, вызывающих криповреждения.

*Криоконсервирование эмбрионов животных.* Наиболее перспективным с точки зрения сохранения генетической информации является замораживание эмбрионов, впервые осуществленное в 1971 г. на мышах [87]. К настоящему времени криоконсервированы эмбрионы 40 видов животных, в том числе исчезающих, беспозвоночных – морских ежей, моллюсков, насекомых, ракообразных, червей. Метод имеет большое практическое значение, поскольку позволяет сохранить генотип обоих родителей и значительно облегчить транспортировку ценных видов и линий животных.

У эмбрионов рыб, птиц, рептилий и земноводных более низкое соотношение площади поверхности к объему и более низкий коэффициент проницаемости мембраны. Эмбрионы имеют три мембранные структуры: синцитиальный слой, плазматическую мембрану и мембрану хориона с определенным коэффициентом проницаемости для воды [75].

Показатель выживаемости эмбрионов, находящихся на одной стадии развития, но полученных у разных видов животных, отличается, но при этом эмбрионы одного вида на разных стадиях развития отличаются по уровню выживаемости. Например, у крупного рогатого скота зиготы и эмбрионы на ранних стадиях дробления криоконсервировать не удастся, тогда как морулы и бластоцисты переносят процедуру замораживания-отогрева. Показатель выживаемости эмбрионов свиньи на стадии вылупившейся бластоцисты выше, чем у ранних эмбрионов. Возможно, это связано с отсутствием *ZP*, многокле-

such procedures entailed the drop in fertilization rate and embryo *in vitro* development [24]. Pharmacological approaches to reduce amount of lipid drops were more benign because they were based on enhancing catabolism and inhibiting lipid synthesis [84]. Since the process of delipidization is quite expensive, time consuming and long process, it has not found wide application in practical cryobiology.

There are no successful methods for the cryopreservation of oocytes of birds, fishes, and amphibians so far [12]. The oocytes of these animals are large in size, have a high content of lipids and polar organization [28]. Apparently, the mentioned structural features of oocytes are the cause of their low cryoresistance. To create effective cryopreservation protocols, it is necessary to study the cryoresistance mechanisms of animal oocytes and to identify the factors causing cryodamage.

*Cryopreservation of animal embryos.* The most promising approach in terms of the preservation of genetic information is the freezing of embryos, first carried out in 1971 in mice [87]. To date, embryos of 40 animal species, have been cryopreserved including endangered ones, as well as invertebrates: sea urchins, mollusks, insects, crustaceans, worms. The method is of great practical importance, since it allows the preservation of genotype of both parents and greatly facilitate the transportation of valuable species and breeds of animals.

Embryos of fish, birds, reptiles and amphibians have a lower surface-to-volume ratio and a lower permeability coefficient of the membrane. Embryos have three membrane structures: the syncytial layer, plasma membrane, and chorion membrane with different water permeability coefficients [75].

The survival rate of embryos that are at the same stage of development, but obtained from different animal species, is different, but at the same time, embryos of the same species at different stages of development have various survival rate. For example, in cattle, zygotes and embryos cannot be cryopreserved at the early stages of cleavage, while morulae and blastocysts undergo the freeze-thawing procedure. The survival rate of pig embryos at the hatching blastocyst stage is higher than that of early embryos. Perhaps this is due to the absence of *ZP*, multicellularity and higher surfaceto-volume ratio of the blastocyst [21].

Early reported attempts to cryopreserve fish eggs and embryos date back to 1955 [5]. To date, there have been developed the cryopreservation methods

точностью и увеличением соотношения площади поверхности бластоцисты к ее объему [31].

Ранние сообщения о попытках криоконсервирования эмбрионов рыб относятся к 1955 г. [17]. На сегодняшний день существуют методы криоконсервирования неоплодотворенных икринок кумжи [30], эмбрионов золотой рыбки на стадиях развития, соответствующих ранней эпиморфе, образованию сомитов, глазного пузырька, биению сердца и началу пигментации, однако показатель выживаемости после нагрева остается низким [53]. В связи с этим необходима разработка индивидуальных протоколов криоконсервирования эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития.

В настоящее время предпринимаются попытки криоконсервировать эмбрионы данио [38], ложного палтуса [20], линя, выюна [6, 7], однако получение высоких результатов затруднено из-за крупного размера эмбрионов, большого количества внутриклеточной воды и разной проницаемости оболочек эмбриона для молекул воды и криопротекторов. Проблема насыщения криозащитными растворами зародыша рыбы была частично решена выполнением микроинъекций пропиленгликоля и наночастиц золота перед криоконсервированием с комбинированным использованием лазера при нагреве [46]. Полученные результаты важны для разработки оптимального режима нагрева, однако при этом важно учитывать, что на этапе насыщения криозащитными растворами и наночастицами золота оказывают токсическое действие на эмбрион рыбы, а использование лазера может привести к затвердеванию хориона.

Альтернативным способом сохранения гермплазмы является криоконсервирование предшественников половых клеток (primordial germ cells – PGC), имеющих сходные морфометрические и физиологические параметры с клетками, которые успешно криоконсервируют. В качестве варианта дозревания PGC *in vivo* предлагается проведение их трансплантации в перитонеальную полость личинок рыб. Поскольку иммунная система у личинок рыб не развита, зародышевые клетки способны сохраняться и дифференцироваться в зрелые гаметы [58, 65]. Таким образом, в настоящее время известны простые и эффективные методы выделения большого количества жизнеспособных PGC, способных дифференцироваться в зародышевые [82].

На сегодняшний день отсутствуют сообщения об успешном криоконсервировании эмбрионов птиц. Ведутся эксперименты по глубокому охлаждению PGC цыплят методом витрифика-

ции для unfertilized bull-trout eggs [20], goldfish embryos at stages of early epimorph, formation of somites, eye bubble, start of heartbeat, and onset of pigmentation, but the survival rate after heating remains low [46]. In this regard, it is necessary to develop individual cryopreservation protocols for embryos at different stages of development.

At present, attempts are being made to cryopreserve the zebrafish embryos [29], false halibut [9], tench, and loach [54, 55], but high results are hard to get due to the large size of the embryos, significant amounts big amounts of intracellular water and different permeability of the embryonic membranes for water molecules and cryoprotectants. The problem of saturation of the fish embryo with cryoprotective solutions was partially solved by performing microinjections of propylene glycol and gold nanoparticles before freezing and combined application of laser during heating [37]. These findings are important for developing an optimal warming protocol, nevertheless it is important to consider potential toxic effect of gold nanoparticles on fish embryo as well as observed hardening of chorion due to laser irradiation.

Cryopreservation of germ cell precursors (primordial germ cells – PGC) is an alternative method of germplasm preservation. PGC are unique biological objects that have similar morphometric and physiological parameters with cells that successfully cryopreserve. Transplantation of germ cell precursors into the peritoneal cavity of fish larvae is proposed as an option for PGC maturation *in vivo* [51, 60]. Thus, simple and effective methods for isolating a large number of viable PGCs capable of differentiating into embryonic cells [82] are currently known.

To date, there are no reports about successful cryopreservation of avian embryos. Experiments on a deep cooling of chicken's PGC using vitrification in the presence of 10% EG are underway [57]. Avian PGCs retain their specific germline properties and proliferative potential after cryopreservation, as well as after long-term cultivation and genetic modification [83]. If PGCs can differentiate into functional gametes in the gonads of xenogenic recipients, transplantation of cryopreserved PGCs can be a powerful tool for *ex situ* conservation of wild birds, including endangered species.

## Conclusions

Collectively, at the moment, germ cells and embryos of many laboratory, agricultural and wild animals have been successfully cryopreserved. However, the issues of cryopreservation of oocytes and embryos of certain species of birds, fish and



ции с 10% ЭГ [62]. PGC птиц сохраняют специфические свойства зародышевой линии и пролиферативный потенциал после криоконсервирования, а также длительного культивирования и генетических модификаций [83]. Если PGC смогут дифференцироваться в функциональные гаметы в гонадах ксеногенных реципиентов, то трансплантация криоконсервированных PGC может стать мощным инструментом для сохранения *ex situ* диких птиц, включая виды, находящиеся под угрозой исчезновения.

### Выводы

На данный момент успешно криоконсервированы половые клетки и эмбрионы многих видов лабораторных, сельскохозяйственных и диких животных. Однако остаются нерешенными проблемы криоконсервирования ооцитов и эмбрионов некоторых видов птиц, рыб и млекопитающих. Для создания криобанков гермоплазмы всего животного мира нашей планеты необходимо дальнейшее развитие и совершенствование методов криоконсервирования.

### Литература

1. Бударцаька НО, Петрушко МП. Ооцити як альтернатива ембріонам при криоконсервуванні для використання у допоміжних репродуктивних технологіях. Проблеми криобіології і криомедицини. 2016;26(4):375–2.
2. Грищенко ВИ, Копейка ЕФ, Петрушко МП. Проблеми криобіології і збереження генетических ресурсів. Цитологія. 2004;46(9): 784–85.
3. Дідух ЯП, ред. Зелена книга України: Рідкісні і такі, що перебувають під загрозою зникнення, та типові природні рослини угруповання, які підлягають охороні. Київ: Альтерпрес, 2009. 448 с.
4. Копейка ЕФ, Дрокин СИ, Черепанов ВВ, и др. Качество криоконсервированной спермы сазанов после 25 лет хранения. В: Материали IV Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми теоретичної іхтіології»: тези доповідей. Одеса, 7–11 вересня: Фенікс, 2011;136–8.
5. Линник ТП, Мартынюк ИН. Подходы к созданию криозащитных сред при криоконсервировании спермы птиц. Проблеми криобіології. 2010;20(2):109–22.
6. Миксон КБ, Зинченко АВ, Боброва ЕН. Криоконсервирование эмбрионов вьюна стеклованием. В: Материали міжнародної конференції «Криоконсервирование генетических ресурсов, современное состояние, проблемы и перспективы»; 2014 октябрь 28–30, Пушино, Россия. Пушино; 2014. с. 123–5.
7. Миксон КБ, Копейка ЕФ, Линник ТП. Условия витрификации эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis* L., 1758) в криозащитных средах. Проблеми криобіології. 2009; 19(2):154–62.
8. Павлович О, Ревенко О, Гапон Г. Оптимізація режиму відтавання криоконсервованої сперми людини при нормо- та патоспермії. Проблеми криобіології і криомедицини. 2016; 26(1):45–52.
9. Петрушко МП. Использование криоконсервированных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях. Проблеми криобіології. 2000;(1):171.

mammals remain unresolved. In order to establish the cryobanks of the germplasm of the entire fauna of our planet, it is necessary to further develop and improve the methods of cryopreservation.

### References

1. Am-in N, Kirkwood RN, Techakumphu M, Tantasuparuk W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology*. 2011; 15;75(5):897-903.
2. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation an emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009; 5(3): 90–6.
3. Benjamin P Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res*. 2015 Oct 1; 18(5): 422–36.
4. Billard R, Cosson J, Noveiric SB, Pourkazemi M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*. 2004;236(1–4):1–9.
5. Blaxter IHS. Herring rearing 1. The storage of herring gametes. *Mar Res Scot*. 1955;(3):1–12.
6. Bromfield JJ. A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction*. 2016; 152(6):R223–R232.
7. Buderatska NO, Petrushko MP. Oocytes as alternative to embryos in cryopreservation applied in assisted reproductive technologies. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2016; 26(4): 375–82.
8. Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze–thaw-induced changes of the ZP explains decreased rates of fertilization in frozen–thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*. 1990; 90(2):547–53.
9. Chen SL, Tian YS. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology*. 2005; 63(4):1207-19.
10. Ciereszko A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation in fish. In: Alavi S H M, Cosson J, Coward K, Rafiee G, editors. *Fish spermatology*. Oxford: Alpha Science International Ltd; 2007. p. 215–40.
11. Clark NA, Swain JE. Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(7):865–75.
12. Clulow J, Clulow S. Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of threatened amphibians and reptiles: bringing the ARTs up to speed. *Reprod Fertil Dev*. 2016; 28 (8): 1116–32.
13. Comizzoli P, Songsasen N, Hagedorn M, Wildt DE. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology*. 2012;78(8):1666–81.
14. D'Alessandro AG, Martemucci G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim Reprod Sci*. 2003; 79(1–2):93–102.
15. Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*. 1997;48(5):831–41.
16. Deng A, Wang W-H. Assessment of aneuploidy formation in human blastocysts resulting from cryopreserved donor eggs. *Mol Cytogenet*. [Internet] 2015 [Cited 17.01.2019]; 8: 12–9. Available from: <https://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-015-0117-8>.
17. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol*. [Internet] 2012 [Cited 17.01.2019]; 2012: 854837. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/au/2012/854837/>



- 10.Петрушко МП. Сучасний стан проблеми кріоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів людини. Вісник НАН України. 2017; (7):44–52.
- 11.Про схвалення Концепції Загальнодержавної програми збереження біорізноманіття на 2005-2025 роки. Розпорядження Кабінету Міністрів України від 22.09.04 № 675-р. [Цитовано 04.11.2017] Доступно: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/675-2004-%D1%80>
- 12.Пушкарь НС, Шраго МИ, Белоус АМ, и др. Криопротекторы. Киев: Наукова думка. 1978. 406 с.
- 13.Am-in N, Kirkwood RN, Techakumphu M, Tantasuparuk W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology*. 2011; 75(5):897–903.
- 14.Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation an emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009; 5(3): 90–6.
- 15.Benjamin P Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res*. 2015; 18(5): 422–36.
- 16.Billard R, Cosson J, Noveiric SB, Pourkazemi M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*. 2004;236(1–4):1–9.
- 17.Blaxter IHS. Herring rearing 1. The storage of herring gametes. *Mar Res Scot*. 1955;(3):1–12.
- 18.Bromfield JJ. A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction*. 2016;152(6):R223–R232.
- 19.Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze–thaw-induced changes of the ZP explains decreased rates of fertilization in frozen–thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*. 1990; 90(2): 547–53.
- 20.Chen SL, Tian YS. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology*. 2005; 63(4): 1207–19.
- 21.Ciereszko A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation in fish. In: Alavi S H M, Cosson J, Coward K, Rafiee G, editors. *Fish spermatology*. Oxford: Alpha Science International Ltd, 2007; 215–40.
- 22.Clark NA, Swain JE. Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. *J Assist Reprod Genet*. 2013; 30(7):865–75.
- 23.Clulow J, Clulow S. Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of threatened amphibians and reptiles: bringing the ARTs up to speed. *Reprod Fertil Dev*. 2016; Jun 1.
- 24.Comizzoli P, Songsasen N, Hagedorn M, Wildt DE. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology*. 2012; 78(8):1666–81.
- 25.D'Alessandro AG, Martemucci G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Lecce ram. *Anim Reprod Sci*. 2003;79(1–2):93–102.
- 26.Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*. 1997; 48(5): 831–41.
- 27.Deng A, Wang W-H. Assessment of aneuploidy formation in human blastocysts resulting from cryopreserved donor eggs. *Mol Cytogenet*. [Internet]. 2015; 8:12-9. [Cited 17.01.2019] Available from: <https://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-015-0117-8>
- 28.Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol*. [Internet]. 2012; 2012: 854837 [Cited 17.01.2019] Available from: <https://www.hindawi.com/journals/au/2012/854837/>
- 29.Dzyuba B, Cosson J, Yamaner G, et al. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa. *Cryobiology*. 2013;66(2): 192-4.
- 30.Erdahl DH, Graham EF. Preservation of gametes of freshwater. In: *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on*
- 31.Didukh YaP, editor. [Green Book of Ukraine: endangered rare plants and plants, and typical natural flora groups, which are subject to protection]. Kyiv: AlterPress, 2009. 448 p. Ukrainian.
- 32.Dzyuba B, Cosson J, Yamaner G, et al. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa. *Cryobiology*. 2013; 66(2): 192-4.
- 33.Erdahl DH, Graham EF. Preservation of gametes of freshwater. In: *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*; 1980 June 16-20, Madrid, Spain. Madrid; 1980; Vol. 2; p. 317–26.
- 34.Esaki R, Ueda H, Kurome M, et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod*. 2004;71(2):432-7.
- 35.Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species *Theriogenology*. 2000; 53(1):175–86.
- 36.Gajda B, Skrzypczak-Zielińska M, Gawrońska B, et al. Successful production of piglets derived from mature oocytes vitrified using OPS method. *CryoLetters*. 2015;36(1):8–18.
- 37.Garrels W, Mates L, Holler S, et al. Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine oocytes and targeted integration in the pig genome. *PLoS One*. [Internet]. 2011; 6(8):e23573. [Cited 17.01.2019] Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023573>
- 38.Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, et al. Forskolin improves the cryosurvival of in vivo-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. *Cryobiology*. 2013; 66(2):144–50.
- 39.Gould KG. Techniques and significance of gamete collection and storage in the great apes. *J Med Primatol*. 1990;19(6): 537–51.
- 40.Grishchenko VI, Kopeika EF, Petrushko MP. [Problems of Cryobiology and Conservation of Genetic Resources]. *Tsytologia*. 2004;46(9):784–5. Russian.
- 41.Guan MI, Rawson DM, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *CryoLetters*. 2010; 31(3): 230–8.
- 42.Hagedorn M, Peterson A, Mazur P, Kleinhans FW. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow freezing is not an option. *Cryobiology*. 2004;49(2):181–9.
- 43.Hamano S, Koikeda A, Kuwayama M, Nagai T. Full-term development of in vitro-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*. 1992;38(6):1085–90.
- 44.Horváth Á, Miskolczi E, Urbányi B. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquat Living Resour*. 2003;16(5): 457–60.
- 45.Hwang IS, Kwon DJ, Im GS, et al. High incidence of polyspermic fertilization in bovine oocytes matured in vitro after cryotop vitrification. *CryoLetters*. 2016;37(1):27–33.
- 46.Jamieson BGM, Barrie GM. Live preservation of fish gametes. In: *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*. Cambridge, UK: Cambridge University Press;1991. p. 245–69.
- 47.Kadam PD, Chuan HH. Rectocutaneous fistula with transmigration of the suture: a rare delayed complication of vault fixation with the sacrospinous ligament. *Int Urogynecol J*. 2016; 27(1):155-7.
- 48.Katanbafzadeh H, Barati F, Tabandeh M. Cryoprotectant-free freezing of the goat epididymal sperm. *CryoLetters*. 2014; 35(4): 293-8.
- 49.Katkov II, Bolyukh VF, Chernetsov OA, et al. Kinetic vitrification of spermatozoa of vertebrates: what can we learn from nature? In: II Katkov, editor. *Current Frontiers in Cryobiology*. InTech Open Access Books; 2012. Chapter 1; p. 3–40. [Cited 25.07.2018] Available from: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/31227/InTech-Kinetic\\_vitrification\\_of\\_spermatozoa\\_of\\_vertebrates\\_what\\_can\\_we\\_learn\\_from\\_nature.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/31227/InTech-Kinetic_vitrification_of_spermatozoa_of_vertebrates_what_can_we_learn_from_nature.pdf)
- 50.Khosla K, Wang Y, Hagedorn M, et al. Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. *ACS Nano* 2017; 11(8): 7869-78.

- Animal Reproduction and Artificial Insemination; 1980 June 16-20, Madrid, Spain. Madrid; 1980; Vol.2; p. 317–26.
31. Esaki R, Ueda H, Kurome M, et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod.* 2004;71(2):432-7.
  32. Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology.* 2000;53(1):175–86.
  33. Gajda B, Skrzypczak-Zielińska M, Gawrońska B, et al. Successful production of piglets derived from mature oocytes vitrified using OPS method. *CryoLetters.* 2015;36(1):8–18.
  34. Garrels W, Mates L, Holler S, et al. Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine oocytes and targeted integration in the pig genome. *PLoS One.* [Internet] 2011 [Cited 17.01.2019];6(8):e23573. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023573>.
  35. Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, et al. Forskolin improves the cryosurvival of in vivo-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. *Cryobiology.* 2013; 66(2):144–50.
  36. Gould KG. Techniques and significance of gamete collection and storage in the great apes. *J Med Primatol.* 1990;19(6): 537–51.
  37. Guan M1, Rawson DM, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *CryoLetters.* 2010; 31(3): 230–8.
  38. Hagedorn M, Peterson A, Mazur P, Kleinhans FW. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow freezing is not an option. *Cryobiology.* 2004;49(2):181–9.
  39. Hamano S, Koikeda A, Kuwayama M, Nagai T. Full-term development of in vitro-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology.* 1992;38(6):1085–90.
  40. Horváth Á, Miskolczi E, Urbányi B. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquat Living Resour.* 2003;16(5): 457–60.
  41. Hwang IS, Kwon DJ, Im GS, et al. High incidence of polyspermic fertilization in bovine oocytes matured in vitro after cryotop vitrification. *CryoLetters.* 2016;37(1):27–33.
  42. Jamieson BGM, Barrie GM. Live preservation of fish gametes. In: *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa.* Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1991; 245–69.
  43. Kadam PD, Chuan HH. Rectocutaneous fistula with transmigration of the suture: a rare delayed complication of vault fixation with the sacrospinous ligament. *Int Urogynecol J.* 2016; 27(1):155-7.
  44. Katanbafzadeh H, Barati F, Tabandeh M. Cryoprotectant-free freezing of the goat epididymal sperm. *CryoLetters.* 2014; 35(4): 293-8.
  45. Katkov II, Bolyukh VF, Chernetsov OA, et al. Kinetic vitrification of spermatozoa of vertebrates: what can we learn from nature? In: II Katkov, editor. *Current Frontiers in Cryobiology.* InTech Open Access Books; 2012. Chapter 1; p. 3–40. [Cited 25.07.2018] Available from: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/31227/InTech-Kinetic\\_vitrification\\_of\\_spermatozoa\\_of Vertebrates\\_what\\_can\\_we\\_learn\\_from\\_nature\\_.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/31227/InTech-Kinetic_vitrification_of_spermatozoa_of Vertebrates_what_can_we_learn_from_nature_.pdf)
  46. Khosla K, Wang Y, Hagedorn M, et al. Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. *ACS Nano* 2017; 11(8): 7869-78.
  47. Kopeika E, Kopeika J, Zhang T. Cryopreservation of fish. Cryopreservation and freeze-drying protocols. In: Day JG, Stacey GN, editors. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007: p. 203–17.
  48. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update.* 2015;21(2): 209–27.
  49. Li MW, Vallengunga JM, Kinchen KL, et al. IVF recovery of mutant mouse lines using sperm cryopreserved with mtg in cryovials. *CryoLetters.* 2014; 35(2):145-53.
  50. Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(3):141–52.
  51. Kopeika E, Kopeika J, Zhang T. Cryopreservation of fish. Cryopreservation and freeze-drying protocols. In: Day JG, Stacey GN, editors. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007: p. 203–17.
  52. Kopeika EF, Drokin SI, Cherepanov VV, et al. [Cryopreserved sperm quality carp after 25 years of storage]. In: Proceedings of the IV International Ichthyological Scientific-Practical. Conference [Modern problems of theoretical ichthyology]. Odessa, 7-11 Sept: Feniks, 2011;136–8. Russian.
  53. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update.* 2015;21(2): 209–27.
  54. Li MW, Vallengunga JM, Kinchen KL, et al. IVF recovery of mutant mouse lines using sperm cryopreserved with mtg in cryovials. *CryoLetters.* 2014; 35(2):145-53.
  55. Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(3):141–52.
  56. Liang YY, Srirattana K, Phermethai T. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Cryobiology.* 2012; 65(2):151–6.
  57. Linhart O, Rodina M, Cosson J. Cryopreservation of sperm in common carp cyprinus carpio: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology.* 2000; 41(3): 241–50.
  58. Linnik TP, Martynyuk IN. Approaches to creation of cryoprotective media for cryopreservation of avian sperm. *Problems of Cryobiology.* 2010;20(2):109–22.
  59. Liu KC, Chou TC, Lin HD. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. *Aquat Living Resour.* 1993;6(1):63–6.
  60. Long JA, Purdy PH, Zuidberg K, et al. Cryopreservation of turkey semen: effect of breeding line and freezing method on post-thaw sperm quality, fertilization, and hatching. *Cryobiology.* 2014;68(3):371-8.
  61. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology.* 2016 15;86(7): 1637–44.
  62. Mara L, Casu S, Carta A, Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci.* 2013;138(1–2):25–38.
  63. Marco-Jiménez F, Casares-Crespo L, Vicente JS. Porcine oocyte vitrification in optimized low toxicity solution with open pulled straws. *Zygote.* 2014; 22(2): 204-12.
  64. Martínez-Páramo S, Horváth Á, Labbé C, et al. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture.* 2017; 472:156-77.
  65. Mavrides A, Morroll D. Bypassing the effect of ZP changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;118(1): 66–70.
  66. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact ZP. *J Reprod Fertil.* 2000; 118(1):163–70.
  67. Mikson KB, Kopeika EF, Linnik TP. Conditions for loach (*Misgurnus fossilis*) embryo vitrification in cryoprotective media. *Problems of Cryobiology.* 2009; 19(2):154–62.
  68. Mikson KB, Zinchenko AB, Bobrova EM. [Cryopreservation of loach's embryos by vitrification]. In: Proceedings of the international conference 'Cryopreservation of genetic resources, current status, problems and prospects'; 2014 October 28–30, Pushchino. Pushchino; 2014. p. 123–5. Russian.
  69. Miller RR Jr, Cornett CL, Waterhouse KE, Farstad W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. *Cryobiology.* 2005;51(1):66–75.
  70. Moore DT, Purdy PH, Blackburn HD. A method for cryopreserving chicken primordial germ cells. *Poult Sci.* 2006; 85(10):1784–90.

51. Liang YY, Srirattana K, Phermthai T. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Cryobiology*. 2012; 65(2):151–6.
52. Linhart O, Rodina M, Cosson J. Cryopreservation of sperm in common carp cyprinus carpio: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*. 2000;41(3):241–50.
53. Liu KC, Chou TC, Lin HD. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. *Aquat Living Resour*. 1993;6(1):63–6.
54. Long JA, Purdy PH, Zuidberg K, et al. Cryopreservation of turkey semen: effect of breeding line and freezing method on post-thaw sperm quality, fertilization, and hatching. *Cryobiology*. 2014;68(3):371–8.
55. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*. 2016;15;86(7):1637–44.
56. Mara L, Casu S, Carta A, Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci*. 2013;138(1–2):25–38.
57. Marco-Jiménez F, Casares-Crespo L, Vicente JS. Porcine oocyte vitrification in optimized low toxicity solution with open pulled straws. *Zygote*. 2014; 22(2): 204–12.
58. Martínez-Páramo S, Horváth Á, Labbé C, et al. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*. 2017; 472:156–77.
59. Mavrides A, Morroll D. Bypassing the effect of ZP changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005;118(1):66–70.
60. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK: Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact ZP. *J Reprod Fertil*. 2000; 118(1):163–70.
61. Miller RR Jr, Cornett CL, Waterhouse KE, Farstad W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. *Cryobiology*. 2005; 51(1):66–75.
62. Moore DT, Purdy PH, Blackburn HD. A method for cryopreserving chicken primordial germ cells. *Poult Sci*. 2006;85(10):1784–90.
63. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, et al. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod*. 1994;51(4):618–22.
64. Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil*. 1989;87(2):479–83.
65. Okutsu T, Yano A, Nagasawa K, et al. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J Reprod Dev*. 2006;52(6):685–93.
66. Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*. 1974;39(6): 1144–9.
67. Parkening TA, Tsunoda Y, Chang MC. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J Exp Zool*. 1976;197(3):369–74.
68. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 1992;29(2):255–66.
69. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949;164(4172):666.
70. Poulos A, Darin Bennett A, White IG. The phospholipid bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol B*. 1973; 468:541–9.
71. Ruane J, Sonnino A. The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: FAO. 2006. 188 p.
72. Ruffing NA, Steponcks PL, Pitt RE, et al. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod*. 1994;51(4):618–22.
73. Salamon SI, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62(1–3):77–111.
74. Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, et al. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*. 2014;68(2):276–80.
75. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. 2011;141(1):1–19.
76. Seidel GE Jr: Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006;65(1):228–35.
77. Shahverdi A, Rastegarnia A, Topraggaleh TR. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell J*. 2014; 16(3): 279–88.
78. Shimazaki M, Sambuu R, Sato Y, et al. Effects of orvus es paste on the motility and viability of yak (*bos grunniens*) epididymal and ejaculated spermatozoa after freezing and thawing. *CryoLetters*. 2015; 36(4): 264–9.
79. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci*. 2016; 169: 2–5.



- mation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology*. 1993;30(6):562–80.
73. Salamon SI, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62(1–3):77–111.
  74. Salmami H, Towhidi A, Zhandi M, et al. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*. 2014;68(2):276–80.
  75. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. 2011;141(1):1–19.
  76. Seidel GE, Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006; 65(1):228–35.
  77. Shahverdi A, Rastegarnia A, Topraggaleh TR. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell J*. 2014; 16(3): 279–88.
  78. Shimazaki M, Sambuu R, Sato Y, et al. Effects of orvus es paste on the motility and viability of yak (*bos grunniens*) epididymal and ejaculated spermatozoa after freezing and thawing. *CryoLetters*. 2015; 36(4): 264–9.
  79. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci*. 2016; 169: 2–5.
  80. Sieme H, Oldenhof H. Cryopreservation of semen from domestic livestock Methods. *Mol Biol*. 2015;1257:277–87.
  81. Sprícigo JF, Morais K, Ferreira AR, et al. Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*. 2014; 69(2): 256–65.
  82. Takeuchi Y, Yoshizaki G, Kobayashi T, Takeuchi T. Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. *Biol Reprod*. 2002;67(4):1087–92.
  83. Tonus C, Cloquette K, Ectors F, et al. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28(5):628–39.
  84. Walther TC, Farese RV Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(6):459–66.
  85. Wassall SR, Stillwell W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(1):24–32.
  86. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller Jr. RR Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*. 2006; 131(5): 887–94.
  87. Whittingham D, Leibo S, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*. 1972; 27; 178(4059): 411–4.
  88. Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at  $-196$  degrees C. *J Reprod Fertil*. 1977;49(1):89–94.
  89. Wirtu G, McGill J, Crawford L, et al Targeting lipid metabolism to improve oocyte cryopreservation (OCP) in domestic animals. *Trans Clin Bio*. 2013; 1(1):15–20.
  90. Woelders H, Zuidberg CA, Hiemstra SJ. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Send to Poult Sci*. 2006;85(2): 216–22.
  91. Yang CH, Wu TW, Cheng FP, et al. Effects of different cryoprotectants and freezing methods on post-thaw boar semen quality. *Reprod Biol*. 2016;16(1):41–6.
  92. Yasui GS, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K. Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. *CryoLetters*. 2008; 29(5):383–90.
  80. Sieme H, Oldenhof H. Cryopreservation of semen from domestic livestock Methods. *Mol Biol*. 2015;1257:277–87.
  81. Sprícigo JF, Morais K, Ferreira AR, et al. Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*. 2014; 69(2): 256–65.
  82. Takeuchi Y, Yoshizaki G, Kobayashi T, Takeuchi T. Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. *Biol Reprod*. 2002;67(4):1087–92.
  83. Tonus C, Cloquette K, Ectors F, et al. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28(5):628–39.
  84. Walther TC, Farese RV Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(6):459–66.
  85. Wassall SR, Stillwell W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(1):24–32.
  86. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller Jr. RR Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*. 2006; 131(5): 887–94.
  87. Whittingham D, Leibo S, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*. 1972 Oct 27;178(4059):411–4.
  88. Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at  $-196$  degrees C. *J Reprod Fertil*. 1977;49(1):89–94.
  89. Wirtu G, McGill J, Crawford L, et al Targeting lipid metabolism to improve oocyte cryopreservation (OCP) in domestic animals. *Trans Clin Bio*. 2013; 1(1):15–20.
  90. Woelders H, Zuidberg CA, Hiemstra SJ. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Send to Poult Sci*. 2006;85(2):216–22.
  91. Yang CH, Wu TW, Cheng FP, et al. Effects of different cryoprotectants and freezing methods on post-thaw boar semen quality. *Reprod Biol*. 2016;16(1):41–6.
  92. Yasui GS, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K. Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. *CryoLetters*. 2008; 29(5):383–90.