

А.С. Сейсенбаева ^{*}, С.Е. Әбдікерім , А.Д. Төлебаева ,
Г.М. Абылкасымова , А.В. Перфильева 

Физиология және генетика институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: S_akerke@mail.ru

ИТТЕРДІҢ ТҰҚЫМЫН САҚТАП ҚАЛУ ҮШІН ОЛАРДЫҢ ГЕРМОПЛАЗМАСЫН КРИОКОНСЕРВАЦИЯЛАУ ӘДІСТЕРІНЕ ӘДЕБИ ШОЛУ

Соңғы бірнеше онжылдықта үй жануарларының жүздеген экзотикалық түрлері мен тұқымдары жоғалды. Сондықтан қауіп төнген басқа жануарлардың жойылып кетуін болашақта болдырмау үшін және олардың аман қалуын қамтамасыз ету үшін құтқару стратегияларын әзірлеу және оларды қолдану өте маңызды. Жойылып кету қаупі төнген жабайы және үй жануарларының тұқымын сақтап қалудың бір жолы – олардың гаметаларының криобанкін құрастыру болып табылады. Қазіргі уақытта осы мақсатта жойылып бара жатқан жануарлардың генетикалық материалын сақтау үшін жануарлардың сперматозоидтарын, ооциттерін, эмбриондарын және аналық без ұлпасын криоконсервациялау әдістерін пайдалану қарқынды дамып келеді. Иттердің (*Canis lupus familiaris*) гаметалары мен жыныс бездерін криоконсервациялауда баяу мұздату және витрификациялау әдістері қолданылады. Бұл әдеби шолудың мақсаты осы криоконсервациялау әдістері туралы жаңа мәліметтер беру. Мұнда криоконсервациялау кезінде аталған жасушалар мен ұлпалардың құрылысына әсер ететін криозақымдану түрлері және зақымдану әсерлерінен жасушалардың функциональді бұзылыстары мен оларды болдырмаудың стратегиялық тәсілдері қарастырылады. Жасушаларды жеке және ұлпа түрінде криоконсервациялаудың ұқсастықтары мен айырмашылықтары, сондай-ақ криоконсервациялаудың белгілі бір түрін таңдаудың дәлелдемелері мен негізгі принциптері анықталады. Өртүрлі талдау аспектілері мен бұл жануарлардың жасушаларын криоконсервациялаудағы кедергілер мен жақсы нәтиже алынған тұстары талқыланады. Бұл ұсынылған мәліметтер өз кезегінде болашақта осы әдістердің тиімді шешімдерін құрастыру үшін пайдалы болуы мүмкін.

Түйін сөздер: иттер, гамета, криоконсервациялау, сперматозоид, ооцит, жыныс бездері, криопротекторлар, баяу мұздату, витрификациялау.

A.S. Seisenbayeva^{*}, S.E. Abdikerim, A.D. Tolebayeva,
G.M. Abylkassymova, A.V. Perfilyeva

Institute of Physiology and Genetics, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: S_akerke@mail.ru

Literature review of cryopreservation methods for dog germoplasm to preserve their breed

Many hundreds of exotic species and domestic animal breeds have been lost over the course of the last few decades. Therefore, it is very important to develop and apply rescue strategies to ensure the other animals threatened with extinction to ensure their survival for the future. One way to protect the endangered species of wild and domestic animals is to the creation of cryobanks of their gametes. Currently, to achieve this goal, the use of cryopreservation methods for sperm, oocytes, embryos and ovarian tissues of animals is rapidly developing to preserve the genetic material of endangered species. Slow freezing and vitrification methods are used in cryopreservation of dog gametes and gonads (*Canis lupus familiaris*). The purpose of this review is to provide new data on these cryopreservation methods. Here we consider the types of cryoinjury that affect the structure of these cells and tissues during cryopreservation, as well as functional disorders of cells from the effects of damage and strategic ways to protect them will be discussed. Differences and similarities between single cell or tissue cryopreservation will be highlighted, together with the evidence and basic principles of choosing a particular type of cryopreservation. The analysis of different aspects that still hamper the success of cryopreservation these animals' cells can help clarify where research is most needed. The data provided, in turn, can contribute to the development of effective solutions to these methods in the future.

Keywords: dogs, gamete, cryopreservation, sperm, oocyte, gonads, cryoprotectors, slow freezing, vitrification.

А.С. Сейсенбаева*, С.Е. Әбдікерім, А.Д. Толебаева,
Г.М. Абылкасымова, А.В. Перфильева
Институт физиологии и генетики, Алматы, Казахстан
*e-mail: S_akerke@mail.ru

Литературный обзор методов криоконсервации гермоплазмы собак для сохранения их породы

За последние несколько десятилетий были потеряны сотни экзотических видов и пород домашних животных. С целью предотвращения подобной участи других животных, находящихся под угрозой вымирания, крайне важно разработать и применить стратегии спасения, чтобы обеспечить их выживание в будущем. Одним из способов сохранения исчезающих видов диких и домашних животных является создание криобанка из их гамет. В настоящее время для достижения этой цели быстро развивается использование методов криоконсервации спермы, ооцитов, эмбрионов и тканей яичников животных для сохранения генетического материала находящихся под угрозой исчезновения. При криоконсервации гамет и гонад собак (*Canis lupus familiaris*) используются методы медленного замораживания и витрификации. Целью данного литературного обзора является предоставление данных об этих методах криоконсервации. Здесь рассматриваются типы криоповреждений, влияющих на функцию и структуры клеток при криоконсервации, и стратегические подходы к их предотвращению. Будут выделены различия и сходства между криоконсервацией отдельных клеток или тканей, а также доказательства и основные принципы выбора определенного типа криоконсервации. Обсуждаются различные аспекты анализа и барьеры для криоконсервации клеток этих животных, а также моменты, когда были получены хорошие результаты. Предоставленные данные, в свою очередь, могут способствовать разработке эффективных решений указанных методов в будущем.

Ключевые слова: собаки, гамета, криоконсервация, сперма, ооцит, гонады, криопротекторы, медленное замораживание, витрификация.

Кіріспе

Соңғы 100 жыл ішінде біз жабайы сүтқоректі жануарлар түрлерінің тез және үздіксіз азаюына және үй жануарларының тұқымдарының таңдаусыз сұрыпталуына байланысты сұйылуына тап болдық. Бүкіл әлемде сүтқоректі жануарлардың әрбір төртінші түрінің жойылып кету қаупі бар және апта сайын орта есеппен екі үй тұқымы жойылуда [1, 2].

Қазақ халқы ежелден көшпенді өмір салтын ұстанғандықтан әртүрлі ит тұқымдарын үй жануарларын (кой, сиыр, жылқы, түйе) бағуда, аң аулауда және күзетші ретінде кеңінен қолданған. Қазақстанда кездесетін ұлттық тұқымды иттердің шығу тегі қазақ халқының ежелгі тайпаларының жылқыны қолға үйретіп мінуімен байланысты деген деректер бар. Қазіргі кезде Қазақстанда кездесетін тазы мен төбет тұқымдары зерттелуде. Бұл тұқымдарды ата-бабаларымыз көптеген ғасырлар бойы жергілікті табиғи жағдайларына бейімдеп сұрыптап алған. Соңғы бірнеше онжылдықта Қазақстанда кездесетін көптеген жергілікті ұлттық тұқымды жануарлардың жойылып бара жатқаны белгілі. Ұлттық ит тұқымдарының да популяциясының азайып бара жатқаны байқалады [3, 4]. Сондықтан генетикалық әртүрлілікті сақтау үшін, әсіресе жойылып

кету қаупі төнген түрлер мен үй жануарларының жергілікті ұлттық тұқымдарын таза күйінде сақтау бағдарламаларын құрастыру аса қажетті үрдіс болып табылады [5].

Қазіргі таңда заманауи биотехнологиялық әдістер, яғни гаметаларды криоконсервациялау биологтардың, дәрігерлердің және үй жануарларының иелерінің назарын аударуда. Ұлттық ит тұқымдарының генотипін сақтауда немесе белгілі бір генотиптердің таралуын кеңейтуге, жойылу қаупі төнген жануарлардың биоалуантүрлілігін сақтау үшін пайдаланылатын әдістердің хаттамалары жылдар бойы құрастырылуда. Бұл саладағы зерттеулер әлі де өркендеп келеді [6, 7].

Иттердің гаметаларының криобанкін құру оларда кездесетін ауру түрлерін болдырмау, мінез-құлық үйлесімсіздігі туындаған жағдайда, кенеттен өліп кетуі кезінде, синхронды емес жетілу және аталық немесе аналық ұрықтардың болмай қалу жағдайында аса қажет болады. Әртүрлі репродуктивті әдістердің жетістіктеріне қарамастан бұл түрлердің негізгі репродуктивті биологиясы туралы білімнің және жануарлардың генетикалық материалын сақтаудың стандартты хаттамаларының болмауы және тұралық айырмашылықтар шектеуші факторлар болып табылады [7, 8, 9].

Криоконсервацияланған сперматозоидтар ұрғашы иттерді ұрықтандыруға оңтайлы және селекционерлер мен бұл жануарлардың иелерінің арасында танымал әдіс болып саналады. Себебі криоконсервацияланған сперматозоидтар егер жануарлар әртүрлі жерлерде өмір сүрсе немесе бір уақытта кездесе алмаса оңтайлы уақытында пайдалануға дайын және ұзақ уақыт сақталады [10, 11]. Криоконсервацияланған сперматозоидтар белгілі бір фенотиптік сипаттары бар асыл тұқымды иттерді немесе белгілі бір жұмысқа пайдалануға байланысты жоғары қабілеті бар (мысалы, қауіпсіздік саласындағы элиталық жұмысшы иттер) құнды субъектілердің генетикалық материалын және әртүрлілігін сақтау үшін пайдалы болып саналады [9, 12].

Сонымен қатар криоконсервацияланған сперматозоидтарды қолдану ұрықтандыру дозаларын дұрыс таңдауға және генетикалық сұрыптауды жеделдету үшін пайдаланылады, яғни ұрғашы иттердің көп бөлігі бірдей эякулятпен ұрықтандырылуы мүмкін [7]. Мұндай жағдайда жануарлар арасындағы тікелей байланысқа жол берілмейтіндіктен олардың репродуктивті жыныстық жолмен берілетін ауруларының таралуын азайту үшін тиімді болып табылады. Соның ішінде, жасанды ұрықтандыру үшін сперматозоидтарды криоконсервациялау бруцеллез және герпес вирусының инфекциясы сияқты жыныстық жолмен берілетін аурулардың алдын алады және тірі жануарларға карантин кезінде қолдануға ыңғайлы [13].

Көптеген жануарлардың түрі үшін сперматозоидтарды криоконсервациялау мен жасанды ұрықтандыру немесе экстракорпоральді ұрықтандыру әдістерін пайдалану арқылы олардың фертильділігін сақтау күшті құралға айналды [14, 15]. Керісінше, аналық гаметаларды сақтау әлі де қиындық туғызуда және бұл бағытта жасалған зерттеулердің нәтижелерінің табысты болуы шектеулі [16]. Бұл криоконсервациялауға немесе экстракорпоральді ұрықтануды жүзеге асыруға қажетті ооциттердің мөлшерінің аз болуымен және криоконсервациялаудан кейін олардың өміршеңдігінің төмен болуына байланысты. Сонымен қатар көптеген жабайы жануарлар табиғи ортада репродуктивті жетілу жасына жетпей немесе эстральді цикл кезінде өліп қалатындықтан криоконсервациялауға қажет ооциттерді алу қиындық туғызады.

Сондықтан ғалымдар жойылып кету қаупі төнген түрлерді сақтаудың тағы бір жолы, яғни ооциттердің пулы көп сақталған аналық без ұлпасын криоконсервациялау бағытында зерттеу-

лер жүргізе бастады. Бұл әдіс примордиальді және біріншілік фолликулдарды көп мөлшерде сақтап, болашақта олардан ұрықтандыруға керекті ооциттерді бөліп алуға мүмкіндік береді. Аналық без ұлпасының қыртысты бөлігінде көптеген ұсақ преантральді, атап айтқанда примордиальді фолликулдар бар. Бұл фолликулдардан алынған ооциттердің көпшілігі ешқашан толық дамымайды, яғни ұрықтану қабілеті бар ооциттерді түзбейді. Осы кішкентай фолликулдардың пулын сақтау және оларды ұрықтануға қабілеті бар ооциттері бар жетілген кезеңіне дейін өсіру ұрғашы жануарлардың жасына, репродуктивті кезеңіне қарамастан фертильділігін сақтауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, аналық без ұлпасының қыртысты бөлігінде орналасқан примордиальді фолликулдардың мұздатудан кейінгі өміршеңдігінің көрсеткіші жеке жетілген ооциттерге қарағанда жақсы болып саналады. Аналық без ұлпасындағы примордиальді фолликулдарда орналасқан ооциттерді донорға ауто-трансплантациялау арқылы (адамдарда) немесе иммунодефицитті реципиенттерге ксенотрансплантациялау (жойылып бара жатқан жануарлар жағдайында) арқылы жетілдіріп, бөліп алуға болады [17, 18].

Жоғарыда аталған мәселелерді қорытындылай келе бұл мақаланың мақсаты иттердің гаметаларын криоконсервациялау саласындағы жетістіктер мен туындайтын мәселелерге қатысты алынған негізгі нәтижелерге шолу және болашақ зерттеулер мен перспективаларға сипаттама беру болып табылады.

1. Иттердің сперматозоидтарын криоконсервациялау

Жануарлардың сперматозоидтарын криоконсервациялау мұздату ерітіндісіне глицерин мен тауықтың сары уызын криопротектор ретінде қосудың пайдасының белгілі болуынан бастап кең таралды. 1969 жылы мұздатылған сперматозоидтармен жасанды ұрықтандыру әдісінің сәтті өтуінен [19] бастап криоконсервациялау хаттамалары мен қолданылатын ерітінділерді зерттеуде көптеген жетістіктерге қол жеткізілді [20]. Сперматозоидтарды криоконсервациялау үшін үш түрлі мұздату әдістері қолданылады: дәстүрлі мұздату әдісі, бағытталған мұздату және витрификациялау.

1.1 Дәстүрлі мұздату әдісі

Дәстүрлі мұздату әдісі бағдарламаланған және бағдарламаланбаған дәстүрлі мұздату деп екіге бөлінеді, оның ішінде қолмен мұздату әді-

сі ең көп қолданылады [9]. Бағдарламаланбаған дәстүрлі әдісте сұйытылған сперматозоидтармен толтырылған 0,25 немесе 0,5 мл пластикалық криотүтікшелерді сұйық азот буларында (LN_2) 4-5 см биіктікте 15 минуттан аспайтын уақытқа (мұнда 10 минут ұсынылады) ұстап, мұздатылған соң сұйық азотқа батырады. Мұздату жылдамдығы $\sim 60^\circ\text{C}/\text{мин}$. Бағдарламаланған дәстүрлі мұздату әдісінде арнайы биомұздатықыш аппараты қолданылады. Өртүрлі температура диапазоны үшін өртүрлі мұздату/қатыру жылдамдығы енгізілген бағдарлама арқылы осы аппаратта мұздатылып алынған криотүтікшелер артынша сұйық азотқа LN_2 батырылады. Мұздату бағдарламасы жануарлардың түріне байланысты мұздатылып/ерітілген сперматозоидтардың өміршеңдігінің сапасына байланысты өзгеріп отырады [21].

Бұл мұздату әдістерінде пайда болатын криозақымдану түрлерін азайту үшін мұздату жылдамдығы жоғары немесе төмен емес, оптималды болу керек. Себебі, мұздату жылдамдығы жоғары болса жасушаішілік мұз кристалдануынан болатын физикалық зақымдану туындайды. Ал егер төмен болса, жасушадан тыс мұз кристалдануына жауап ретінде шамадан тыс жасушалық дегидратациядан болатын “ерітінді әсері”, яғни осмостық зақымдану пайда болады. Дәл осындай принцип еріту жылдамдығына да қатысты, себебі температураның критикалық диапазонындағы төмен еріту жылдамдығы (-60°C - -15°C) мұздың қайта кристалдануына байланысты (кіші мұз кристалдары деформацияланған немесе үлкенірек мұз кристалдарын қалыптастыру үшін агрегациялануы) сперматозоидтарға осмостық зақым келтіреді. Мұндай жағдайда криопротекторлар жасушадан тез шыға алмайтындықтан, жасушадан тыс судың жасуша ішіне осмостық енуіне, жасушаның ісінуіне (45-60 секунд аралығында) алып келеді [14, 21]. Мұздатылған сперматозоидты ұрықтандырудан бұрын ерітіп, ерігеннен кейін бірден ұрықтандыру керек. Криотүтікшелерді контейнерден алып тастағаннан кейін оларды LN_2 контейнеріне қайта салуға болмайды. Дегенмен, сперматозоидтарды криоконсервациялаудың сәтті өтуі жалпы мұздату ортасы мен криопротекторлардың түріне, лецитин немесе ақуыз көзі (жұмыртқаның сары уызы, соя сүті немесе төмен тығыздықтағы липопротейдтер) сияқты факторларға, сондай-ақ тамшылату, сұйылту, араластыру, орау, сақтау және тасымалдау сияқты сперматозоидтарды өңдеуге байланысты механикалық тәсілдерге байланысты [22].

Трис – жұмыртқаның сары уызы – глицерин қоспасынан тұратын буферді ит сперматозоидтарын мұздату үшін ерітінді ретінде кеңінен қолданады. Бірақ жұмыртқаның сары уызын қолдануға қарсы дәлелдер көбейіп келеді. Негізгі кемшіліктер – партиялар арасындағы құрамның өзгергіштігі және жануарлардың өртүрлі ауру қоздырғыштарымен ластануы. Соңғысы, криоконсервацияланған сперматозоидтарды халықаралық алмасу кезінде қолдануда мәселе туғызуы мүмкін. Атап айтқанда, тауық жұмыртқасының сары уызы жақында таралған құс тұмауы сияқты құстарда кездесетін эндемиялық зооноздық ауруларына байланысты биологиялық қауіпті қосылыс болып табылады [23, 24]. Сондықтан жұмыртқаның сары уызын алмастыратын балама ерітінділерді зерттеу қажет және маңызды. Қазіргі таңда сперматозоидтарды криоконсервациялау үшін өртүрлі криопротекторлар қосылған ерітінділерді жақсарту үшін өртүрлі хаттамалар зерттелуде. Белгілі немесе тіркелген ерітінділерге қант пен антиоксиданттарды қосуға немесе бар ерітінділердің компоненттерін басқа химиялық заттармен алмастыруға көптеген әрекеттер жасалды. Алайда, осы модификацияланған ерітінділерді қолдану арқылы криоконсервацияланған сперматозоидтарды жасанды ұрықтандыруға бірнеше зерттеулер ғана тырысты. Білімнің жетіспеушілігі иттерге репродуктивті биотехнология әдістерін қолданудағы негізгі қиындықтарды көрсетеді.

Мұздатылып-ерітілген сперматозоидтардың өміршеңдігінің сапасын анықтайтын негізгі параметрлеріне олардың қозғалғыштығын және цитоплазмалық мембранасы мен митохондрияның тұтастығын жатқызады. Жоғарыда сипатталғандай, жұмыртқаның сары уызы ұзақ уақыт бойы иттердің сперматозоидтарын криоконсервациялау үшін жасушаға енбейтін криопротектор ретінде қолданылып келгеніне қарамастан стандартты хаттамалар жасалмаған және аурулардың жұғу қаупі бар. Сондықтан жұмыртқа сары уызын алмастыра алатын криопротекторлар ретінде бірнеше материалдар зерттелген. Солардың ішінде тек тығыздығы төмен липопротейдтер (ТТЛ) [25] мен майсыз сүт [26] сперматозоидтардың өміршеңдігіне жақсы әсер ететін ерітінділер ретінде жақсы бағаланады. ТТЛ мұздату кезінде сперматозоидтардың мембранасында орналасқан фосфолипидтер мен холестериннің ағып кетуіне жол бермейді, керісінше олардың мембранаға қосылуына әсер етеді [25]. Иттердің сперматозоидтарын криоконсервациялау үшін майсыз сүтке қосымша глюкоза, рафи-

ноза немесе трегалоза қанттарын криопротектор ретінде пайдаланған зерттеулер бар. Мұнда глюкозаға қарағанда осылардың ішінде рафиноза мен трегалоза қанттары криоконсервациялаудан кейін сперматозоидтардың қозғалғыштығы мен орташа жылдамдығын сақтауда жақсы нәтиже көрсеткен. Сонымен қатар, лецитин, липопротеин және липосомалар жұмыртқаның сары уызын алмастыратын балама ерітінді ретінде сперматозоидтардың қозғалғыштығына жақсы әсер ететіні туралы зерттеулер белгілі [27, 28].

Ит сперматозоидтары үшін глицерин криопротекторы жасушаішілік крипротектор ретінде кең қолданылады [29]. Сонымен қатар, этиленгликоль, пропиленгликоль, диметилсульфоксид (ДМСО), метилформамид, диметилформамид, метилацетамид және NN-диметилформамид жасушаішілік криопротекторлары да жиі қолданылады [30, 31, 32, 33].

Дәстүрлі мұздату әдістерімен байланысты кемшіліктерге мыналар жатады: 1) гетерогенді мұздың пайда болуы немесе жылдамдық пен морфология тұрғысынан бақыланбайтын мұз кристалдарының өсуі, бұл сперматозоидтарды бұзады және өлтіреді, 2) жасырын жылудың тиімсіз таралуы, яғни жасушаларға механикалық зақым келтіретін мұзды фронттағы қайталанатын мұздату/еріту циклдары. Бұл кемшіліктер криоконсервацияның жаңа әдісіне, атап айтқанда бағытталған мұздату әдісіне алып келеді.

1.2 Бағытталған мұздату әдісі

Криоконсервациялаудың балама әдісі – бағытталған мұздату әдісі. Бұл әдісте көп термиялық градиент аппаратын пайдаланады [22]. Криомұздатқыш ерітіндісімен сұйытылған сперматозоидтарды 4-5°C дейін салқындатады, содан кейін алдын ала салқындатылған пробиркаларға (көлемі 5, 8, және 12 мл) құйып $\approx 0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$ мұздату жылдамдығымен қатырады. Пробиркалар сызықтық температура градиенті арқылы 5°C-тан (жылы блок) -50°C-қа дейін (суық блок) тұрақты жылдамдықпен 1 мм/сек (1,0-1,5 мм/сек) өтеді. Осыдан кейін 60 секунд ішінде сидинг жүзеге асырылады және суық блок арқылы аппараттың келесі бөлігінде пробиркалар жинау камерасына (-100°C) ауыстырылады. Содан кейін бұл пробиркалар жиналып, сақтау үшін сұйық азотқа LN_2 батырылады. Мұздатылған сперматозоидтардың сапасын бағалау үшін пробиркаларды бөлме температурасында 90 секунд ұстайды, содан кейін 60 секунд ішінде 37°C температурасында су моншасының ішіне пробиркаларды ерітуге арналған арнайы қондырғыға (Interface

Multigrad Technology) орналастырады. Saragusty J. және оның әріптестері бағытталған мұздату әдісін қолдану арқылы сперматозоидтарды үлкен көлемде мұздату кезінде сидинг қажет емес екендігін ұсынған [34]. Кейінірек құнды аталықтардың сперматозоидтарын пайдалану үшін қосарланған мұздату әдісі енгізілді. Мұнда қолдан ұрықтандыруға арналған сперматозоидтарды алдымен мұздатады, содан кейін бағытталған мұздату әдісі арқылы екінші рет қатырады [35].

Автоматты түрде байланысқан сидинг, біркелкі салқындату, жасырын жылуды тиімді тарау және сақтау үнемділігінің жоғары болуы бұл әдісті дәстүрлі мұздату әдісімен салыстырғанда тиімді және жақсы екенін көрсетеді [36]. Бұл әдіс пробиркаларды көп рет пайдалануға және сперматозоидтарды үлкен көлемде мұздатуға мүмкіндік береді. Ол өз кезегінде мұздатылып ерітілгеннен кейін сперматозоидтардың өміршеңдігінің жоғары болуына алып келеді [37]. Осы аталған әдіс арқылы сперматозоидтарды криоконсервациялау үй және жабайы жануарлар түрлерінде [38] кең ауқымда сипатталған және криотүтікшелерде мұздатылатын дәстүрлі әдіске қарағанда тиімдірек.

1.3 Витрификациялау

Витрификация – құрамында криопротекторлардың жоғары мөлшері бар ерітіндідегі биологиялық материалдарды мұз кристалдарының түзілуін болдырмау үшін төменгі температурада өте тез жылдамдықта мұздатылып шыны тәрізде күйге айналуы. Витрификацияның сәтті өту ықтималдығына әсер ететін негізгі факторлар: мұздату жылдамдығы, ерітіндінің тұтқырлығы және көлемі. Бұл қарқынды дамып келе жатқан әдіске жатады және басқа криоконсервация әдістеріне қарағанда тиімді. Себебі мұнда эквilibрация уақыты қысқа, мұздату жылдамдығы тез, қымбат мұздату аппараты қажет емес және жасушаларды физикалық зақымдайтын мұз кристалдары түзілмейді. Бұл әдіс басқа әдістермен салыстырғанда салыстырмалы түрде арзан, қолдануға ыңғайлы және көп уақытты алмайды.

Сперматозоидтарды витрификациялау әдісі алғашқы рет 1938 жылы Basile J. Luyet пен Eugene L. Nodapp ғалымдарының бақа сперматозоидтарын қатыруынан басталды. Иттерде витрификация хаттамасын қолданып жарияланған зерттеулер аз [39, 40] және иттердің сперматозоидтарын криоконсервациялау үшін көбінесе баяу мұздату әдісі жиі қолданылады. Бұл сперматозоидты витрификациялауға қолданылатын

ерітінді құрамындағы жасушаға енетін криопротекторлардың жоғарғы концентрациясынан (30-50%) туындайтын летальді осмотық әсерге байланысты. Бірақ, Isachenko V. және оның әріптестері сперматозоидтарды жасушаға енетін криопротекторларды қолданбай витрификациялап еріткеннен кейін сперматозоидтардың қозғалғыштығының криопротекторлар қосылған дәстүрлі мұздату әдісімен салыстырғанда жоғары болатынын көрсетті. Олар адамның сперматозоидтарын 0,25 мл көлеміндегі ұрықтандыру түтікшелеріне криопротекторлар қосылған дәстүрлі мұздату әдісі мен криопротекторлар қосылмаған витрификациялау (витрификациялау ерітіндісі: адам спермасына 1% адамның сары су альбумині мен 0,25 М сахароза қосылған) әдісімен салыстырды. Витрификациялау үшін 0,25 мл көлеміндегі ұрықтандыру түтікшелерін 100 мкл сперма суспензиясымен толтырып, көлемі 0,5 мл түтікшелеріне орналастырып, екі жағынан герметикалық түрде жауып сұйық азотқа батырды. Сперматозоидтардың өміршеңдігін тексеру үшін түтікшелерді 42°C температурада су моншасында 20 секунд ұстады. Мұнда екі әдісте ұқсас нәтиже көрсеткен [41]. Адам сперматозоидтарының витрификациясы он жылдан астам уақыт бойы кеңінен зерттелді және көптеген өзгертулер енгізілді [42]. Адам сперматозоидтары басқа жануарлардың сперматозоидтарымен салыстырғанда өте кішкентай және максималды криостабильділікті көрсетеді. Егер криостабильділік қасиетін төмендеу ретімен орналастырсақ келесідей схема аламыз: адамның сперматозоиды>жылқы>ит>мысық>қоян>қой>бұқа>қабан. Бұқа мен қабанның сперматозоидтары басының үлкен, жалпақ және пышақ тәрізді болуына байланысты мұздатуға төзімділігі төмен болғандықтан витрификациялау процесіне төтеп беру ықтималдығы төмен. Жалпы, сперматозоидтардың басының мөлшері мен витрификацияның сәттілігі арасында теріс корреляция байқалады [43]. Сперматозоидтарды витрификациялау әртүрлі нәтижелермен иттерде [44], мысықтарда [45] және қошқарларда [46] тіркелген. Nouri Gharaejaei және оның әріптестері сүт немесе жұмыртқаның сары уызын қосу арқылы алынған еріткіштерде витрификацияланған сперматозоидтардың өміршеңдігі мен қозғалғыштығының жақсы нәтиже көрсеткені туралы хабарлаған. Sanchez C. және оның әріптестері сахароза мен трегалозаны витрификациялау ерітіндісіне қолданып, 0,25 М сахарозаның сперматозоидтардың сапасына – өміршеңдігінің сақталуына жақсы әсер ететінін көрсеткен, бірақ акросома-

ның тұтастығы яғни қозғалғыштығы төмен болған [47]

Жоғарыда аталған көптеген зерттеулерде сұйылту ерітіндісі ретінде бөтен жануарлардың ақуыздары (сиыр сары су альбумині, сүт немесе жұмыртқаның сары уызы) қолданылды, мұндай жолмен мұздатылған сперматозоидтар халықаралық тасымалдауда қиындық туғызуы мүмкін. Иттердің сперматозоидтары туралы жақында жарияланған зерттеуде соя лецитинінің криоконсервацияланған ит сперматозоидтарының митохондриялық белсенділігіне және қозғалғыштығына, яғни өміршеңдігіне жұмыртқаның сары уызына ұқсас альтернативті әсер ететіні белгілі болды. Сонымен қатар, соя лецитині негізінде дайындалған ерітіндіде мұздатылған үлгілерде жұмыртқаның сары уызы негізінде дайындалған ерітінділермен салыстырғанда липидтердің асқын тотығуының төмен болғаны көрсетілген. Бұл өте маңызды, өйткені тотығу стрессі сперматозоидтарды криоконсервациялаудағы негізгі мәселелердің бірі болып табылады [48].

Сперматозоидтарды криоконсервациялауда бағытталған мұздату және витрификациялау әдістерінің біраз артықшылықтарына қарамастан, дәстүрлі криоконсервациялау әдісі үй жануарларының сперматозоидтарын мұздату үшін әлемдегі ең кең таралған әдіс болып саналады.

2. Иттердің ооциттері мен эмбриондарын криоконсервациялау

Аналық жыныс гаметаларының көлемі үлкен жасушалар екені белгілі. Олардың беттік ауданы үлкен және су мөлшері жоғары. Көлемдік қатынасы, *zona pellucida*, кейде жетілмеген ооцитті қоршап тұрған кумулустық жасушалар су мен криопротекторлардың жасуша мембранасына енуіне кедергі жасап, жасушада мұз кристалдарының түзілуіне байланысты ооциттердің криоконсервациясын қиындатады, мембраналар мен жасушаішілік органоидтарды зақымдайды. Оның үстіне, олардың ооплазмасында орналасқан липидтік тамшылардың едәуір мөлшері криоконсервациялауға сезімталдықты арттыруы мүмкін [49, 50]. Аталған қиындықтарға қарамастан ооциттердің криобанкін құру қазіргі кезде маңызды тақырып. Ооциттер мен эмбриондарды криоконсервациялау кезінде де екі мұздату әдісін пайдаланады: баяу мұздату және витрификациялау.

Ит ооциттері диаметрі және цитоплазмалық липидтердің жоғарғы мөлшері бойынша шошқа ооциттеріне ұқсас. Сол себептен шошқа ооциттерін криоконсервациялау үшін қолданылатын

әдіс ит ооциттеріне де жарамды болуы мүмкін. Иттердің кумулус ооцит комплексі аналық бездерден бөлініп алынған соң ДМСО (DAP213) қосылған ерітіндіде криопробиркада немесе этиленгликоль (E30S) қосылған ерітіндіде криотоп пластинкасында витрификациялағанда ерітілгеннен кейін екі әдістің арасында морфологиялық айырмашылық (59%–62%) байқалмаған [51]. Жетілмеген ит ооциттерінің цитоплазмалық мембранасының тұтастығын 44% [52] сақтай отырып витрификациялап, содан кейін мейозды қайта жаңарту арқылы ооциттерді метафаза II кезеңіне дейін дамытуға болады [53].

Эмбриондарды криоконсервациялау және оларды артынша трансплантациялау ауылшаруашылық жануарларын көбейтуге және адамдардың бедеулігін емдеуге үлкен үлес қосты. Алайда ит эмбриондарын криоконсервациялау бойынша зерттеулер аз жүргізілді және оларды тәжірибиеде қолдану түсініксіз болып қалды [54, 55]. Мүздатылған эмбриондардан иттердің алғашқы ұрпақтарының пайда болуы туралы 2011 жылы [54], ал экстракорпоральді ұрықтандыру нәтижесінде алынған ұрпақтар туралы зерттеулер 2015 жылы [17] жарияланды. Ал адамдардың ең бірінші пробиркадан алынған баланың дүниеге келуі жайлы ақпарат 40 жыл бұрын жарияланған болатын. Иттердің зиготалары мен эмбриондарын E30S ерітіндісінде витрификациялағанда олардың 80% көп бөлігі 1 жасушалы кезеңнен морулға дейін қалыпты морфологиясын көрсеткен. Алайда, криоконсервацияланған бластоцисталарды еріткеннен кейін көпшілігінде морфологиялық зақымданулар байқалған. Морфологиялық тұрғыдан қалыпты эмбриондардың өміршеңдігінің көрсеткіші 1-16 жасушада 90-100%, морулада 50% және бастоцистада 40% көрсеткен. Имплантация алдындағы иттердің эмбриондарының дифференциациясы олардың витрификациялау кезіндегі сезімталдығына әсер етеді. Сонымен қатар, ит ооциттері/эмбриондарының криоконсервациялау кезіндегі сезімталдығының жоғарылауы олардың цитоплазмасындағы липидтердің көп мөлшерде болуына байланысты болуы мүмкін. Олардың криоконсервациялауға төзімділігін арттыру үшін липидтердің мөлшерін азайту керек. Әзірше мұндай технология зерттелмеген. Ең бірінші жарияланған зерттеуде сұйық азотта сақталған 4 жасушалы морула деңгейінде сақталған 77 витрификацияланған эмбриондарды аналық реципиенттерге трансплантациялағанда бесеуі буаз болған. Олардың төртеуі 7 күшік туған (9,1%) [53]. Ал, 8-ден 16-ға дейінгі жасу-

шалық даму кезеңіндегі эмбриондарды трансплантациялағанда нәтиже 15,9% (7/44) көрсеткен [55]. Ең бірінші мүздатылған эмбрионнан алынған иттің күшіктері 4 жасушалы кезеңінде витрификацияланған 19 эмбриондарды хирургиялық жолмен аналық реципиентке трансплантациялағаннан кейін алынған [54].

Эмбриондарды криоконсервациялау және трансплантациялау әдістерін құрастыру үшін барлық сүтқоректілердің бастапқы *in vivo* эмбриональді даму кезеңдерін жақсы түсіну керек. Алайда репродуктивті ерекшеліктеріне байланысты дамудың бастапқы механизмдері, яғни ооциттердің жетілуі, ұрықтану және эмбриогенез кезеңдері басқа үй жануарларымен салыстырғанда иттерде толық зерттелмеген және бақыланбаған. Осыған қарамастан, бұл әдіс көптеген сүтқоректі жануарлардың ооциттері мен эмбриондарын қатыруға кең қолданылады.

3. Иттердің жыныс бездерінің ұлпаларын криоконсервациялау

Репродуктивті медицинада адамдардың аналық без ұлпасын криоконсервациялау арқылы фертильділікті сақтау жақсы нәтижелер көрсеткен [17]. Бірақ иттердің аналық без ұлпасын криоконсервациялау туралы зерттеулер өте аз.

Иттердің аналық без ұлпасының сәтті криоконсервациясы иммун тапшылығы бар тышқандарға мүздатылып ерітілген аналық безі ұлпасын ксенотрансплантациялаудан басталды [56]. Аналық без ұлпасын трансплантациялаудың негізгі кемшілігі реваскуляризацияның кешігуіне байланысты ишемияның әсерінен фолликулдардың жойылуы мен апоптоз үрдісінің жүруі болып табылады [57]. Иттердің аналық без ұлпасын витрификациялау [58] және ксенотрансплантациялау [59] жайлы бірнеше зерттеулер бар. Бұл зерттеулер иттердің аналық безін криоконсервациялау үшін ксенотрансплантациялау кезінде [60] көптеген фолликулдардың жойылуына қарамастан витрификациялау әдісін қолданған тиімді деп көрсетеді [61, 62]. Иттердің аналық безін витрификациялау үшін эритропозитинді қолдану ксенотрансплантациялаудан кейін фолликулдардың жойылуын азайтқан [62].

Криопротекторлардың жоғарғы концентрациясын пайдалану ооциттерге цитотоксіндік және осмостық эффект жолымен кері әсер етіп зақымдайтыны белгілі. Криопротектор қосындыларының тиімділігі жануарлардың түріне байланысты әртүрлі болады. Сондықтан әртүрлі жануарларға тиімді криопротектор түрін және

оның минимальді эффективті концентрациясын зерттеп табу негізгі хаттамаларды құрастыру үшін өте маңызды болып табылады. Мысалы, баяу мұздату әдісінде 1,3-пропандиол кеміргіштердің (*Dasyprocta aguti*) фолликулдарының ультра құрылысын сақтауда ДМСО-пен салыстырғанда жақсы көрсеткіш көрсетсе [63], ал ешкілер үшін ДМСО керісінше фолликулдардың тұтастығын сақтауда жақсы нәтиже көрсеткен [64]. Cláudio A. және оның әріптестері иттердің аналық безін баяу мұздату әдісімен криоконсервациялау үшін ДМСО мен 1,3-пропандиол криопротекторларын салыстырып зерттегенде 1,3-пропандиолға (49%) қарағанда ДМСО криопротекторын (65%) қолдану мұздатудан кейін фолликулдардың өміршілдігіне жақсы әсер еткенін хабарлаған [65]. Кейбір ғалымдар криопротекторлардың токсинділігін төмендету үшін жасушаға енбейтін синтетикалық полимер – поливинилпирролидон мен ДМСО криопротекторының қосындысын пайдалану арқылы иттердің аналық без ұлпасын витрификациялаған. Бұл зерттеуде витрификацияланған аналық без ұлпасындағы фолликулдардың өміршендігін зерттеу үшін ксенотрансплантациялау әдісі қолданылған. Нәтижесінде аталған екі криопротекторларды жеке қолданғаннан, екеуінің қосылған комбинациясын пайдалану тиімді екені белгілі болған [66].

Иттердің аналық без ұлпасын криоконсервациялау бойынша жарияланған зерттеулердің нәтижелері баяу мұздату әдісіне қарағанда витрификациялау әдісі тиімді екенін көрсетті.

Талқылау

Тіршілік ортасын сақтау түрлердің өмір сүруі үшін оларды қорғау мен өсірудің жалпы қабылданған тәсілі болып табылады. Алайда, адамның іс-әрекеті бірнеше түрлердің санының, әртүрлілігінің және таралуының төмендеуіне әкелгенін ескеру керек. Сирек кездесетін тұқымдардың, жойылып кету қаупі төнген түрлердің және коммерциялық қызығушылық тудыратын жануарлардың генетикалық материалын сақтауға мүмкіндік беру арқылы криобиология репродуктивті зерттеуде үлкен төңкеріс жасады деуге болады. Бағалы үй жануарлары мен сирек кездесетін жануарлар түрлерінің ұрық жасушаларын сақтау гаметалар криобанкін құрудың негізгі мақсаты болып табылады. Мұндай жануарларға генетикалық құндылығы жоғары ұлттық ит тұқымдарын да жатқызуға болады. Биоалуантүрлілікті сақтау үшін жауарлардың аталық және аналық

гаметалары мен эмбриондарын көп мөлшерде және көптеген донорлардан алу керек [67].

Криоконсервациялау әдістерін пайдалану арқылы сперматозоидтарды ұзақ сақтауға, алыс жерлерге стрессіз тасымалдау арқылы шығындарды азайтуға және санитарлық шектеу кезінде кедергісіз тасымалдауға болады [68]. Сперматозоидтарды криоконсервациялау үшін дәстүрлі мұздату, бағытталған мұздату және витрификациялау әдістері ұсынылады. Қазіргі таңда баяу мұздату иттердің сперматозоидтарын криоконсервациялау үшін қолданылатын стандартты әдіс болып табылады. Бұл әдіс ұзақ эквilibрациялау уақытын, арнайы ерітінділерді және күрделі құрылғыны қажет етеді және мұз кристалдарының пайда болуына байланысты температуралық және осмостық стресстер туғызып, көбінесе сперматозоидтардың зақымдалуына алып келеді. Мұз кристалдарының пайда болуынан болатын зақымдауларды болдырмаудың бір жолы – сперматозоидтарды витрификациялау [69], ол әртүрлі жануарларда және адамдарда баяу мұздату әдісіне балама ретінде зерттелген [69, 70]. Криопротекторлардың жоғарғы концентрациясын пайдалану арқылы витрификациялау кезінде мұз кристалдары пайда болмайды, жасуша сұйықтығының тұтқырлығының жоғарылауына байланысты мұздату кезінде ол әйнек тәрізді қатып қалады. Бірақ, мұз кристалдары витрификацияланған жасушаларды еріту кезінде пайда болуы мүмкін және криопротекторлардың жоғарғы концентрациясы жасушаларға токсинді әсер етіп, тотығу стресстерін туғызады. Сперматозоидтар криопротекторлардың жоғарғы концентрациясына өте сезімтал. Сперматозоидтарды криоконсервациялаудың негізгі мәселесі мұздату үрдістерінен туындайтын зақымдауларды болдырмау болып табылады. Криоконсервациялау әдісі жасушаның метоболизмдік процестерін тоқтату арқылы сақтауға бағытталған. Бұл процесс жасушаларды тірі күйінде ұзақ уақытқа сақтауға мүмкіндік берсе де мұздату және еріту кезінде туындайтын температураның төмендеуі, содан кейін жоғарылауы, әсіресе ~ -15 °C және -60°C зонасындағы температура аралық өзгерістер [71] криозақымданулар туғызып, олардың өліміне алып келуі мүмкін. Жасушалар мен ұлпаларды криоконсервациялау кезінде температураның күрт өзгеруі (температуралық стресстер), криопротекторларға байланысты осмостық немесе токсинді стресстер және негізінен тотығу стресстеріне байланысты пайда болған белсенді оттегі түрлерінің әсері олардың құрылымдық және функционалдық зақымдалуына әкеледі.

Температуралық стресс липидтердің фазалық өзгерістеріне және мембрананың функциональді күйінің өзгеруімен байланысты. Себебі мұздату және еріту кезінде мембранада фазалық бөліну, яғни сұйық күйден гель тәрізді күйге өзгеруі байқалады [72]. Бұл жағдайда мембрананың зақымдануын төмендету үшін бірнеше қадамдар жасалған. Мұздату ерітіндісіне циклодекстриннің әртүрлі концентрацияларын қосу арқылы ірі қара малдарға [73], буйвол бұқаларына [74], қойларға [75], айғырларға [76] және қабандарға [77] жасалған зерттеулерде сперматозоидтардың мұздатудан кейінгі өміршеңдігінің жақсарғаны байқалған. Криоконсервациялау кезінде туындайтын температуралық стресс сперматозоидтардың акросомасын зақымдайды [78]. Бұл сперматозоидтардың басының көлемінің өзгеруіне алып келеді. Баяу мұздату кезінде сперматозоидтарының басының кішіреюі, ал витрификациялау кезінде керісінше үлкеюі байқалған. Температуралық стрессті болдырмау үшін мұздату ерітіндісіне ақуыздар мен жасушаға енбейтін криопротекторларын қосады. Бұл заттар мұздату кезінде жасушалардың мембранасының тұтастығын сақтауға оң әсер етеді. Иттердің сперматозоидтарын криоконсервациялауда сүт, жұмыртқаның сары уызы және сахароза жиі қолданылады. Сүт пен жұмыртқа сары уызы жасушадан тыс мұз кристалдарының түзілуін болдырмайды, сперматозоидтарды жеткілікті түрде энергиямен қамтамасыз етеді және фосфаттық буфердің рөлін атқарады. Алайда, бұл заттарды қолдану мұздатылған ұрықтарды халықаралық алмасуда қолдау таппады. Сондықтан сахарозаның әртүрлі концентрацияларын тексерген зерттеулерде ит сперматозоидтарын криоконсервациялау үшін оның 0,25 М концентрациясын ерітіндіге қосу жақсы нәтиже көрсететіні анықталған [47].

Мұздату ерітіндісіне криопротекторларды қосу олардың жасушаларға ену қабілетіне байланысты *осмотық немесе токсинді стресстер* туғызады. Бұл стресстер мұз кристалдарының түзілуінің нәтижесінде мұздатылмаған фракциядағы осмотық қысымға байланысты болады. Мұндай стрессті төмендету үшін ғалымдар мұздату ерітінділеріне әртүрлі антифриздерді қосуды ұсынады. Антифриздерді әртүрлі полярлық белдеуде тіршілік ететін жануарлардан немесе суыққа төзімді өсімдіктерден бөліп алады. Мұндай зерттеу жұмыстары ірі қара малдардың, қойлардың және буйволдардың сперматозоидтарын [79, 80, 81] мұздату кезінде қолданылған. Мұздату процесінің тиімділігін арттыру үшін

мұздату жылдамдығын, криопротекторлардың түрі мен концентрациясын дұрыс тандап алу керек. Иттердің сперматозоидтарын криоконсервациялау үшін глицерин криопротекторын жиі қолданады [29, 30, 31]. Глицериннің осмотық және токсиндік әсері бар және басқа криопротекторларға қарағанда сперматозоид жасушасының мембранасынан өту қабілеті төмен [82]. Сондықтан ғалымдар глицеринді этиленгликоль криопротекторымен салыстырған. Этиленгликольдің молекулалық массасы глицеринге қарағанда кіші, ол токсинділікті төмендетіп, жасушаға ену қабілетін жоғарылатуы мүмкін [29]. Бірақ зерттеудің нәтижесі 5%, 10% этиленгликоль концентрациясын баяу мұздату кезінде қолданғанда олардың глицериннен артықшылығы жоқ екенін көрсеткен. Этиленгликольдің 10% концентрациясы сперматозоидтарға токсинді әсер еткен. Жалпы сперматозоид жасушасының құрылысының және қызметінің тұтастығына этиленгликольдің 5% концентрациясына қарағанда 5% глицерин криопротекторы жақсы әсер ететіні белгілі болды [30].

Криоконсервациялау кезінде туындайтын *тотығу стрессі* сперматозоидтарды еріткеннен кейін олардың сапасына теріс әсер ететін маңызды факторлардың бірі болып табылады. Тотығу стрессі оттегінің белсенді түрлерін өндіру мен биологиялық жүйенің оларды детоксикациялау қабілеті арасындағы дисбаланстың пайда болуынан, яғни тотықтырғыштар антиоксиданттардан асып кеткенде туындайды. Оттегінің белсенді түрлері криоконсервациялау процедурасының барлық кезеңінде пайда болады. Алайда, олардың шамадан тыс мөлшері көптеген зақымданулар туғызады. Табиғатының жоғарғы реактивтілігіне байланысты олар басқа да молекулалармен байланысып, оларды тотықтырып, нәтижесінде жасушаның құрылымдық және функциональді бұзылыстарына алып келеді. Жасушаның барлық компоненттері, сонымен қатар липидтер, ақуыздар, нуклеин қышқылдары мен қанттар тотығу стрессінің потенциалды нысаны болып табылады. Сперматозоидтарды криоконсервациялау кезінде тотығу стресрін азайту үшін оттегінің белсенді түрлерін нейтрализациялауға немесе стресстің пайда болу көздерінің деңгейін төмендетуге болады. Мұндай жағдайда ферменттік, ферменттік емес, өсімдік антиоксиданттарын немесе тотықсыздандырғыштарды пайдалануға болады. Ферменттік антиоксиданттарға супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза және глутатионредуктазасы жатады. Ал, ферменттік емес антиоксидантар-

ға С және Е витаминдері, темір сульфаты, В12 витамині, астаксантин, L-глутамин, раффиноза, трегалоза, таурин, цистеинмелатонин т.б. көптеген химиялық заттар жатады. Маја Z. және оның әріптестері ит сперматозоидтарын витрификациялайтын ерітіндіге антиоксидант ретінде 1% соя лецитинін қосу арқылы жасалған зерттеуінде мұздатудан кейін сперматозоидтардың өміршеңдігінің 59% болғанын хабарлаған. Мұнда соя лецитині альбумин және жұмыртқаның сары уызы сияқты жануарлар ақуызын алмастыратын ақуыз ретінде қолданылады. Бұл халықаралық алмасу кезінде мәселе туғызбайды. Бірақ бұл зерттеуде сперматозоид ерітінділерінің тамшыларын 33 мкл көлемінде сұйық азотқа 11 см биіктікте тамшылатып, витрификациялап, мұздатылған тамшыларды крипробиркаға салып, азотқа батырған. Бұл сұйық азотта сақталатын кейбір бактериялармен сперматозоидтардың ластануын туғызып, ұрықтандыру кезінде инфекциялардың жұғуына алып келуі мүмкін [48].

Иттерде витрификациялау хаттамасын қолдана отырып жарияланған зерттеулер өте аз [40, 44]. Сондықтан баяу мұздату әдісі әлі күнге дейін ит сперматозоидтарын криоконсервациялау үшін көп қолданылады.

Иттердің сперматозоидтарын криоконсервациялауда жануарлардың ақуыздарын қолданбау, жасушаға енетін немесе енбейтін криопротекторлардың оптимальді концентрациясын таңдап алу, эквilibрациялау уақытын дұрыс анықтау, оларды мұздату кезінде сұйық азотқа тікелей тамшылататын әдістерді пайдалану кезінде инфекциялық агенттердің жұғу мүмкіндігін ескеру және өміршеңдігін тексеру кезінде морфологиялық және қозғалғыштық қасиетінен басқа ультрақұрылымдық бағалау әдістерін пайдаланған жөн деп есептейміз. Сонымен қатар зерттеу кезінде алынған сперматозоидтардың морфологиялық өзгерістерінің нәтижелеріне қолданылған бояу әдістерімен өңдеу, микроскопты пайдалану немесе арнайы бағалау бағдарламаларының әсері де болуы мүмкін, зерттеу нәтижелерін қорытындылау кезінде бұл мәселені де ескеру қажет. Сондықтан ит сперматозоидтарын криоконсервациялау әдістерін жетілдіру әлі де зерттеуді қажет етеді.

Жануарлардың ұрықтарын сақтаудың тағы бір жолы ооциттер мен эмбриондарды криоконсервациялау әдісі репродуктивті технологияның ажырамас бір бөлігі болып табылады. Репродуктивті технологияларды иттерге қолданудың негізгі кедергісі IVM-нен (*in vitro maturation*) кейінгі жетілген ооциттер (яғни метафаза II,

МII) пайызының төмен болуы болып табылады. Қазіргі уақытқа дейін зерттелген сүтқоректі жануарлармен салыстырғанда иттердің ооциттері ерекше. Оларда овуляция жылына бір немесе екі рет жүреді және басқа сүтқоректі жануарларда овуляция кезінде бөлінген ооциттер МII стадиясында болатын болса, иттерде ооциттер мейоздық бөлінудің профаза I стадиясында болады және олар жұмыртқа жолында 60-72 сағат ішінде ядролық жетілуді аяқтайды [83]. Ооциттердің *in vitro* жетілуін жақсарту мақсатында бірнеше зерттеулер жүргізілді, алайда ит ооциттерінің ядролық жетілуі 20% аспады [84, 85]. Сұйық азотта мұздатылған және сақталған криоконсервацияланған тышқан ооциттерінен тірі ұрпақ алынғаны туралы 1977 жылы хабарланған. Кейіннен ооциттердің сәтті криоконсервациясына сүтқоректілердің басқа түрлерінде [86], соның ішінде адамдарда да [87] қол жеткізілді. Алайда иттерде *in vitro* жетілген ооциттерден алынған эмбриондарды трансплантациялау арқылы туылған күшіктер туралы хабарламалар жоқ. Иттердің ооциттерінің IVM тиімділігінің төмен болуына қарамастан ооциттерді криоконсервациялау әдісін құрастыру жойылып бара жатқан ит тұқымдарының криобанкін құруда маңызды болып табылады [84].

1970 жылы тышқандардың эмбриондарын сәтті криоконсервациялаған сәттен бастап бұл технология көптеген сүтқоректі жануарларда кеңінен таралды [88]. Басқа сүтқоректі жануарлар сияқты иттер үшін де эмбриондарды криоконсервациялау, одан кейін трансплантациялау генетикалық ресурстарды оптимальді пайдалану үшін маңызды болып саналады. Криоконсервациялаудан кейін эмбриондардың өміршеңдігіне әсер ететін факторларға мыналарды жатқызамыз: иттің тұқымы, эмбриондардың даму сатысы, шығу көзі (*in vivo* немесе *in vitro*), криоконсервациялау тәсілі, криопротекторлар және цитоплазмаишілік липидтердің мөлшері. Иттердің эмбриондарын криоконсервациялау кезінде туындайтын ең маңызды мәселелердің бірі цитоплазмадағы липидтердің көп мөлшері. Липидті тамшылар шошқалар мен сиырлардың эмбриондарында да байқалады, бірақ ит эмбриондарындағы липидтердің тығыздығы әлдеқайда жоғары [53]. Kim Y. және оның әріптестері глицерин криопротекторын пайдалану арқылы баяу мұздату әдісімен ит эмбриондарын криоконсервациялаған, бірақ олар ерігеннен кейін эмбриондардың өміршеңдігін тексермеген және ерітілген эмбриондарды ұрғашы-реципиент иттерге трансплантациялағаннан кейін ұрпақ алмаған [89]. Керісінше, Abe

Ү. және оның әріптестері ит эмбриондарын витрификациялау арқылы эмбриондардан морула сатысында 50% және бластоциста сатысында 40% өміршендігіне қол жеткізген. 2011 жылы Abe Y. және оның әріптестері криоконсервацияланған төрт жасушадан морула сатысына дейінгі эмбриондарды 9 ұрғашы-реципиенттерге хирургиялық емес жолмен цитоскоп арқылы трансплантациялау арқылы 4 реципиенттен 7 күшік алғаны туралы жариялаған [53]. Витрификацияланған эмбриондардың трансплантациялауға дейінгі дамуына кедергі келтіретін факторлардың аяғына дейін дұрыс зерттелмегеніне қарамастан иттердің эмбриондарын криоконсервациялау үшін витрификациялау әдісі тиімді болып табылады.

Ит моноэстральді полиовуляциялық маусымдық емес жануар түріне жатады. Иттердің репродуктивті физиологиясы басқа сүтқоректі жануарлардан айтарлықтай ерекшеленеді. Иттердің ооциттері аналық жыныс безінен ұрық көпіршігі сатысында овуляцияланады және жұмыртқа жолында мейоздық жетілуді аяқтайды. Осылайша, иттердің ооциттері мен эмбриондары имплантациялануға дейін репродуктивті жолда көп уақыт жұмсайды. Аталған ерекшеліктеріне байланысты иттерде ооциттердің жетілуі, ұрықтану және эмбриогенез кезеңі басқа сүтқоректілермен салыстырғанда толық зерттелмеген. Эмбриогенез уақыты, яғни овуляциядан бастап эмбриондардың жатырға имплантациялануына дейінгі уақыты анықталмаған [90].

Болашақ зерттеулерде ооциттер мен эмбриондарды криоконсервациялау әдістерін одан әрі жетілдіру үшін эмбриондардың даму жылдамдығын жақсарту керек және витрификациялау үшін тиісті эмбриональді кезеңдерін зерттеу керек. Сондай-ақ эмбриондарды трансплантациялау үшін реципиенттердің лютеиндік гормондарының (ЛГ) жоғарылауынан кейінгі қолайлы уақытты дұрыс таңдап алуды зерттеу қажет.

Аналық без ұлпасын криоконсервациялау аналық жыныс жасушаларын көп мөлшерде сақтауға болатын, соның ішінде препубертальді кезеңде өлген жануарлардың аналық жасушаларын сақтаудың жалғыз жолы болып табылады. Себебі, аналық бездің кортикальді қабатында мыңдаған примордиальді фолликулдар бар, олар жануар өлгеннен кейін бірнеше сағат өтсе де өміршендігін сақтайды. Бұл фолликулдарды алып, криоконсервациялап, болашақта ксенотрансплантациялауға [91] немесе фолликулдарды аналық безден бөліп алып ұрықтануға қабілетті

ооциттерді алу мақсатында *in vitro* өсіруге болады. Осылайша, аналық гаметаларды сақтау үшін тұтастай аналық безді, оның қыртысты бөлігін немесе жеке бөлініп алынған фолликулдарды криоконсервациялап, генофондты кеңейтуге болады. Аналық без ұлпасын криоконсервациялау үшін баяу мұздату және витрификациялау әдістерін қолданады. Аналық без ұлпасын сақтау криобиологиялық тұрғыдан қиын, себебі оның құрамына көптеген жасуша түрлері және арнайы жасушадан тыс матрикс компоненттері кіреді [18]. Алайда, криозақымдану фактілеріне қарамастан осы технология арқылы әртүрлі жануарларға жасалған зерттеулерде тышқандарда [92], егеуқұйрықтарда [93], қояндарда [17], қойларда [94] және адамдарда [61] жетілген ооциттер мен тірі туылған ұрпақтар туралы жарияланған.

Қазіргі таңда аналық без ұлпасының ксенотрансплантациясы жойылып кету қаупі төнген түрлер үшін сипатталған жалғыз мүмкіндік болып табылады. Ол көбінесе аналық без ұлпасының криоконсервациясымен біріктіріледі және осы уақытқа дейін сыналған барлық модельдерде ерітілгеннен кейін трансплантанттың және оның ішінде орналасқан примордиальді фолликулдардың өміршендігінің жақсы сақталғаны туралы зерттеулер бар [91, 95].

Болашақта әлі де жетілдіруді талап ететін әдістерге трансплантацияланған аналық без ұлпасындағы фолликулдарды антральді фолликулдарға дейін индукциялау, содан кейін ооциттердің жетілуі және экстрокорпоральді ұрықтандыру әдістері жатады.

Қорытынды

Жақын арада адамдардың іс-әрекетінің әсерінен көптеген жануарлар түрлері мен тұқымдары жойылып кетуі мүмкін. Сондықтан репродуктивті биотехнологиядағы жаңа әдістерді қалай пайдалануға болатынын қарастыру қажет. Жойылып кету қаупі төнген түрлер мен тұқымдардың соматикалық ұлпалары қазіргі кезде ұлпа банктерінде сақталған. Жойылып кеткен *Capra pyrenaica pyrenaica* сүтқоректі түрінің мұздатылған соматикалық жасушаларын клондау және репродуктивті технологияларды пайдалану арқылы ұрпақ алынғаны туралы деректер бар [96].

Тұқымдарды сақтау бағдарламалары үшін репродуктивті басқару саласындағы жетістіктерге қарамастан жабайы жануарлар мен көптеген жергілікті үй жануарлары тұқымдарының репродуктивті физиологиясы толық зерттел-

меген және мұндай жануарларға репродуктивті биотехнология әдістерін қолдану арқылы зерттелген жұмыстардың сәтті нәтижелері өте аз. Негізгі шектеуші факторларға түрлердің репродуктивті биологиясы туралы білімнің жетіспеушілігін, аналық генетикалық материалдарды сақтаудың стандартты хаттамаларының

болмауын және тұраралық айырмашылықтарды жатқызамыз.

Қаржыландыру көзі

Мақала ҚР ҒЖБМ ҒК нөмері BR21881977 мемлекеттік гранты аясында жазылды.

Әдебиеттер

1. IUCN Species Survival Commission, 2010. IUCN Red List Categories and Criteria, Version 3. 1. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
2. FAO, 2009. Domestic animal genetic diversity. Available from: <http://www.fao.org/biodiversity/geneticresources/bio-domesticanimals/en/>.
3. Perfilyeva, A. Kira Bepalova, Sergey Bepalov, Mamura Begmanova. et al. Kazakh national dog breed tazy: what do we know? // PLoS One 18. – 2023.
4. Perfilyeva A., Bepalova K., Mussabayev R., Begmanova V. et al. // Genetic diversity and origin of Kazakh Tobet Dogs. // Scientific Reports. – 2024. – Vol. 14. – P. 23137
5. Mason SJ. Current review of artificial insemination in dogs // Vet Clin North Am Small Anim Pract – 2018. – 48. – P. 567–580.
6. Nagashima JB, Sylvester SR, Nelson JL, Cheong SH, Mukai C, Lambo C, Flanders JA, Meyers-Wallen VN, Songsasen N, Travis AJ. Live births from domestic dog (*Canis familiaris*) embryos produced by in vitro fertilization // PLoS One. – 2015. – №10(12). – P. e0143930.
7. Leibo, S.P.; Songsasen, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species // Theriogenology. – 2002. – Vol. 57. – P. 303–326.
8. Linde-Forsberg, C. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen // Recent Adv. Small Anim. Reprod. – 2001. – Vol. 21 – P. 1–5.
9. Barbas, J.P.; Mascarenhas, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells // Cell Tissue Bank. – 2009. – Vol. 10. – P. 49–62.
10. Mahiddine, F.Y., Kim, M.J. Overview on the antioxidants, egg yolk alternatives, and mesenchymal stem cells and derivatives used in canine sperm cryopreservation // Animals. – 2021. – Vol. 11. – P. 1930.
11. Thomassen, R., Sanson, G., Krogenæs, A., Fougner, J.A., Andersen Berg, K., Farstad, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach // Theriogenology. – 2006. – Vol. 66. – P. 1645–1650.
12. Hesser, A., Darr, C., Gonzales, K., Power, H., Scanlan, T., Thompson, J., Love, C., Christensen, B., Meyers, S. Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility // Theriogenology. – 2017. – Vol. 87. – P. 115–123.
13. Miller, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen // Theriogenology. – 2008. – Vol. 70. – P. 463–468.
14. Luvoni, G.C.; Colombo, M. Cold case: Small animal gametes cryobanking // Theriogenology. – 2020. – Vol. 150. – P. 445–451.
15. Norton BG. The preservation of species // New Jersey: Princeton University Press. – 2014.
16. Ringleb J, Waurich R, Wibbelt G, Streich WJ, Jewgenow K. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI // Reprod Fertil Dev. – 2011. – Vol. 23. – P. 818–25.
17. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice // J Assist Reprod Genet. – 2015. – Vol. 32. – P. 1167–70.
18. Smits J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation // Hum Reprod Update. – 2010. – Vol. 16. – P. 395–414.
19. Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen // AI Digest. – 1969. – Vol. 17. – P. 6–7.
20. Belala R, Briand-Amirat L, Vinciguerra L, Tainturier D, Kaidi R, Thorin C, Michaud S, Anton M, Bencharif D. Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders // Res Vet Sci. – 2016. – Vol. 106. – P. 66–73.
21. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells // ILAR J. – 2000. – Vol. 41. – P. 187–196.
22. Arav A. Device and methods for multigradient directional cooling and warming of biological samples // US Patent 5,873,254. Interface Multigrad Technology, United States. – 1999.
23. Sánchez-Calabuig MJ, Maillou V, Beltrán-Breña P, de la Fuente Martínez J, Galera Carrillo S, Pérez-Gutiérrez JF, Pérez-Cereales S. Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders // Reprod Biol. – 2017. – Vol. 17. – P. 233–238.

24. Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Yanagimoto-Ueta Y, Asano T, Suwa Y, Suzuki H. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender // *J Reprod Dev.* – 2008. – Vol. 54. – P. 290–294.
25. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins) // *Anim Reprod Sci.* – 2010. – Vol. 119. – P. 305–313.
26. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen // *Res Vet Sci.* – 2012. – Vol. 93. – P. 440–447.
27. Beccaglia M, Anastasi P, Luvoni GC. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender // *Vet Res Commun.* – 2009. – Vol. 33. – P. 77–80.
28. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. Influence of extender, cryoperservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws // *Theriogenology.* – 1989. – Vol. 31. – P. 451–461.
29. Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation // *Theriogenology.* – 2006. – Vol. 65. – P. 1848–1858.
30. Rota A, Milani C, Romagnoli S, Zucchini P, Mollo A. Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5% glycerol or 5% ethylene glycol // *Anim Reprod Sci.* – 2010. – Vol. 118. – P. 94–97.
31. Cheema RS, Kaur S, Mavi GK, Singh AK, Honparkhe M, Gandotra VK. In vitro evaluation of Labrador dog spermatozoa cryopreserved in Tris-citric acid-fructose buffer supplemented with different combinations of extracellular and intracellular cryoprotectants // *Anim Biotechnol.* – 2021. – Vol. 32. – P. 352–365.
32. Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM. Glycerol, methylformamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation // *Reprod Domest Anim.* – 2010. – Vol. 45. – P. 214–220.
33. Hernández-Avilés C, Ruíz-Cristancho A, Vergara-Galván M, Zambrano-Varón J, Jiménez-Escobar C. The Effect of N-N-dimethylformamide on the membrane characteristics of canine spermatozoa after cryopreservation, and its relationship with post-thaw motility // *Top Companion Anim Med.* – 2020. – Vol. 38. – P. 100372.
34. Saragusty J, Osmers JH, Hildebrandt TB. Controlled ice nucleation—Is it really needed for large-volume sperm cryopreservation? // *Theriogenology.* – 2016. – Vol. 85. – P. 1328–1333.
35. Saragusty J, Gacitua H, Zeron Y, Rozenboim I, Arav A. Double freezing of bovine semen // *Anim Reprod Sci.* – 2009. – Vol. 115. – P. 10–17.
36. Arav A, Saragusty J. Directional freezing of sperm and associated derived technologies // *Anim Reprod Sci.* – 2016. – Vol. 169. – P. 6–13.
37. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation // *Mol Cell Endocrinol.* – 2002. – Vol. 187. – P. 77–81.
38. Reid CE, Hermes R, Blottner S, et al. Split-sample comparison of directional and liquid nitrogen vapour freezing method on post-thaw semen quality in white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum* and *Ceratotherium simum cottoni*) // *Theriogenology.* – 2009. – Vol. 71. – P. 275–291.
39. Hayakawa H, Yamazaki T, Oshi M, Hoshino M, Dochi O, Koyama H. Cryopreservation of conventional and sexsorted bull sperm using a directional freezing method // *Reprod Fertil Dev.* – 2007. – Vol. 19. – P. 176–177.
40. Saragusty J, Gacitua H, Pettit MT, Arav A. Directional freezing of equine semen in large volumes // *Reprod Domest Anim.* – 2007. – Vol. 42. – P. 610–615.
41. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: Effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability // *Biol Reprod.* – 2004. – Vol. 71. – P. 1167–1173.
42. Mohamed MS. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study // *Iranian J Reprod Med.* – 2015. – Vol. 13. – P. 633.
43. Isachenko E, Mallmann P, Rahimi G, et al. Vitrification technique-new possibilities for male gamete lowtemperature storage // In: Katkov II (ed). *Current Frontiers in Cryobiology*. ISBN: 978-953-51-0191-8. Croatia: IntechOpen. – 2012. – P. 41–76.
44. Sa'nchez R, Risopatro'n J, Schulz M, et al. Canine sperm vitrification with sucrose: Effect on sperm function // *Andrologia.* – 2011. – Vol. 43. – P. 233–241.
45. Vizuete G, Jime'nez E, Agu'era EI, Pe'rez-Mari'n CC. Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders // *Reprod Domest Anim.* – 2014. – №49(1). – P. e5–8.
46. Jime'nez-Rabada'n P, Garcí'a-A'lvarez O, Vidal A, et al. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders // *Cryobiology.* – 2015. – Vol. 71. – P. 85–90.
47. Caturla-Sánchez, E., Sánchez-Calabuig, M., Gutiérrez, J.F.P., Cerdeira, J., Castaño, C., Santiago-Moreno, J. Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures // *Cryobiology.* – 2018. – Vol. 80. – P. 126–129.
48. Maja Zakošek Pipan, Margret L. Casal, Nataša Šterbenc, Irma Virant Klun and Janko Mrkun. Vitrification Using Soy Lecithin and Sucrose: A New Way to Store the Sperm for the Preservation of Canine Reproductive Function // *Animals.* – 2020. – Vol. 10. – P. 653.
49. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // *Reproduction.* – 2011. – №141(1). – P.1–19.
50. Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives // *Sci China Life Sci.* – 2014. – Vol. 57. – P. 903–914.

51. Abe Y, Asano T, Ali M, Suzuki H. Vitrification of canine cumulus-oocyte complexes in DAP213 with a cryotop holder // *Reprod Med Biol.* – 2010. – Vol. 9 – P. 115–120.
52. Turathum B, Saikhun K, Sangsuwan P, Kitiyanant Y. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2010. – Vol. 8. – P. 70.
53. Abe Y, Suwa Y, Asano T, Ueta YY, Kobayashi N, Ohshima N, Shirasuna S, AbdelGhani MA, Oi M, Kobayashi Y, Miyoshi M, Miyahara K, Suzuki H. Cryopreservation of canine embryos // *Biol Reprod.* – 2011. – Vol. 84. – P. 363–368.
54. Nagashima JB, Songsasen N. Canid Reproductive Biology: Norm and Unique Aspects in Strategies and Mechanisms // *Animals.* – 2021. – №11(3). – P. 653
55. Hori T, Ushijima H, Kimura T, Kobayashi M, Kawakami E, Tsutsui T. Intrauterine embryo transfer with canine embryos cryopreserved by the slow freezing and the Cryotop method // *J Vet Med Sci.* – 2016. – Vol. 78. – P. 1137–1143.
56. Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS, Ueta YY, Matsui M, Lee JY, Suwa Y, Miyahara K, Suzuki H. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification // *J Reprod Dev.* – 2006. – Vol. 52. – P. 293–299.
57. Hariya M, Suzuki H. Incidence of apoptotic cells after vitrification in canine ovarian tissues // *J Mamm Ova Res.* – 2016. – Vol. 33. – P. 69–75.
58. Ackermann CL, Asa CS, Krisher R, Bauman K, Casey S, Lopes MD. Evaluation of follicular growth and tissue viability in vitrified/warmed domestic dog ovaries after in vitro culture // *Reprod Domest Anim.* – 2017. – №52(2). – P. 77–81.
59. Hirayama Y, Inoue K, Suzuki H. Effect of intraperitoneal administration of desialylated erythropoietin on the follicular survival in cryopreserved canine ovaries after xenotransplantation // *J Mamm Ova Res.* – 2011. – Vol. 28. – P. 143–147.
60. Wakasa I, Hayashi M, Abe Y, Suzuki H. Distribution of follicles in canine ovarian tissues and xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissues with even distribution of follicles // *Reprod Domest Anim.* – 2017. – №52(2). – P. 219–223.
61. Jivago JLPR, Paulini F, Silva RC, Araujo MS, Marinho APS, Lucci CM. Cryopreservation and characterization of canine preantral follicles // *Cryobiology.* – 2018. – Vol. 81. – P. 34–42.
62. Commin L, Buff S, Rosset E, Galet C, Allard A, Bruyere P, Joly T, Guérin P, Neto V. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse // *Reprod Fertil Dev.* – 2012. – Vol. 24. – P. 461–471.
63. Wanderley LS, Machado Luz HK, Faustino LR, Lima IMT, Lopes CAP, Silva AR, et al. Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol // *Theriogenology.* – 2012. – Vol. 77. – P. 260–7.
64. Castro SV, De Carvalho AA, Da Silva CMG, Faustino LR, Campello CC, Lucci CM, et al. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and in vitro culture of ovarian tissue // *Cell Tissue Res.* – 2011. – Vol. 346. – P. 283–92.
65. Lopes CAP, Alves AMCV, Jewgenow K, Bão SN, de Figueiredo JR. Cryopreservation of canine ovarian cortex using DMSO or 1,3-propanediol // *Theriogenology.* – 2016. – Vol. 86. – P. 1165–1174.
66. Fujihara M, Kaneko T, Inoue-Murayama M. Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 3970.
67. Wildt, D.E. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation // *ILAR J.* – 2000. – Vol. 41. – P. 228–234.
68. Peña F.J., Núñez-Martínez I., Morán J.M. Semen technologies in dog breeding: an update // *Reprod Domest Anim.* – 2006. – №41(2). – P. 21–9.
69. Kumar, A.; Prasad, J.; Srivastava, N.; Ghosh, S. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa // *Biopreservation Biobanking.* – 2019. – Vol. 17. – P. 603–612.
70. Isachenko, V.; Rahimi, G.; Mallmann, P.; Sanchez, R.; Isachenko, E. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness // *Andrology.* – 2017. – Vol. 5. – P. 1055–1063.
71. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 247. – P. 125–142.
72. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model // *J Exp Zool.* – 1993. – Vol. 265. – P. 432–437.
73. Purdy PH, Graham JK. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility // *Biol Reprod.* – 2004. – Vol. 71. – P. 522–527.
74. Rajoriya JS, Prasad JK, Ramteke SS, et al. Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa // *Anim Reprod Sci.* – 2016. – Vol. 164. – P. 72–81.
75. Moce' E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival // *Anim Reprod Sci.* – 2010. – Vol. 118. – P. 236–247.
76. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival // *Cryobiology.* – 2005. – Vol. 51. – P. 241–249.
77. Galantino-Homer HL, Zeng WX, Megee SO, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski I. Effects of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation // *Mol Reprod Dev.* – 2006. – Vol. 73. – P. 638–650.
78. Buendia P., Soler C., Paolicchi F., Gago G., Urquieta B., Perez-Sanchez F., BustosObregon E., Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-assisted system // *Theriogenology.* – 2002. – Vol. 57. – P. 1207–1218.
79. Prathalingam NS, Holt WV, Revell SG, Mirczuk S, Fleck RA, Watson PF. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw // *Theriogenology* – 2006. – Vol. 66. – P. 1894–1900.

80. Qadeer S, Khan MA, Ansari MS, et al. Evaluation of antifreeze protein III for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm // *Anim Reprod Sci.* – 2014. – Vol. 148. – P. 26–31.
81. Qadeer S, Khan MA, Shahzad Q, et al. Efficiency of beetle (*Dendroides canadensis*) recombinant antifreeze protein for buffalo semen freezability and fertility // *Theriogenology.* – 2016. – Vol. 86. – P. 1662–1669.
82. Guthrie, H.D., Liu, J., Critser, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa // *Biol.Reprod.* – 2002. – Vol. 67. – P. 1811–1816
83. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, de Lesegno CV, Chastant-Maillard S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch // *Reproduction.* – 2005. – Vol. 130. – P. 193–201.
84. Songsasen N, Wildt DE. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog // *Anim Reprod Sci.* – 2007. – Vol. 98. – P. 2–22.
85. Saikhun J, Sriussadaporn S, Thongthip N, Pinyopummin A, Kitiyanant Y. Nuclear maturation and development of IVM/IVF canine embryos in synthetic oviductal fluid or in co-culture with buffalo rat liver cells // *Theriogenology.* – 2008. – Vol. 69. – P. 1104–1110
86. Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MIB, Vajta G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes // *Cryobiology.* – 2002. – Vol. 45. – P. 91–94.
87. Tao T, Valle AD. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application // *J Assist Reprod Genet.* – 2008. – Vol. 25. – P. 287–296.
88. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to minus 196 degree C and minus 269 degree C // *Science.* – 1972. – Vol. 178. – P. 411–414
89. Kim YJ, Kim BJ, You IJ. Embryo transfer with frozen embryos in the dog // *J Vet Clin.* – 2002. – Vol. 19. – P. 73–79.
90. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, de Lesegno CV, Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. In vitro canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review // *Theriogenology.* – 2006. – Vol. 66. – P. 1685–1693.
91. Paris, M.C., Snow, M., Cox, S.L., Shaw, J.M. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? // *Theriogenology.* – 2004. – Vol. 61. – P. 277–291.
92. Kagawa, N., Kuwayama, M., Nakata, K., Vajta, G., Silber, S., Manabe, N., Kato, O. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre-antral follicles of adult mice // *Reprod. Biomed.* – 2007. – Vol. 14. – P. 693–699.
93. Wang, X., Cheng, H., Yin, H., Kim, S.S., Lin Tan, S., Gosden, R.G. Fertility after intact ovary transplantation // *Nature.* – 2002. – Vol. 24. – P. 385.
94. Gosden, R.G., Baird, D.T., Wade, J.C., Webb, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at –196 degrees C // *Hum. Reprod.* – 1994. – Vol. 9. – P. 597–603.
95. Paris, M.C.J., Schlatt, S. Ovarian and testicular tissue xenografting: its potential for germline preservation of companion animals, non-domestic and endangered species // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2007. – Vol. 19. – P. 1–12
96. Folch, J., Cocero, M.J., Chesné, P., Alabart, J.L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J.I., Sánchez, P., Echegoven, E., Beckers, J.F., Bonastre, A.S., Vignon, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning // *Theriogenology.* – 2009. – Vol. 71. – P. 1026–1034.

References

1. Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Yanagimoto-Ueta Y, Asano T, Suwa Y, Suzuki H. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender // *J Reprod Dev.* – 2008. – Vol. 54. – P. 290–294.
2. Abe Y, Asano T, Ali M, Suzuki H. Vitrification of canine cumulus-oocyte complexes in DAP213 with a cryotop holder // *Reprod Med Biol.* – 2010. – Vol. 9 – P. 115–120.
3. Abe Y, Suwa Y, Asano T, Ueta YY, Kobayashi N, Ohshima N, Shirasuna S, AbdelGhani MA, Oi M, Kobayashi Y, Miyoshi M, Miyahara K, Suzuki H. Cryopreservation of canine embryos // *Biol Reprod.* – 2011. – Vol. 84. – P. 363–368.
4. Ackermann CL, Asa CS, Krisher R, Bauman K, Casey S, Lopes MD. Evaluation of follicular growth and tissue viability in vitrified/warmed domestic dog ovaries after in vitro culture // *Reprod Domest Anim.* – 2017. – №52(2). – P. 77–81.
5. Arav A. Device and methods for multigradient directional cooling and warming of biological samples // US Patent 5,873,254. Interface Multigrad Technology, United States. – 1999.
6. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation // *Mol Cell Endocrinol.* – 2002. – Vol. 187. – P. 77–81.
7. Arav A, Saragusty J. Directional freezing of sperm and associated derived technologies // *Anim Reprod Sci.* – 2016. – Vol. 169. – P. 6–13.
8. Barbas, J.P.; Mascarenhas, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells // *Cell Tissue Bank.* – 2009. – Vol. 10. – P. 49–62.
9. Beccaglia M, Anastasi P, Luvoni GC. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender // *Vet Res Commun.* – 2009. – Vol. 33. – P. 77–80.
10. Belala R, Briand-Amirat L, Vinciguerra L, Tainturier D, Kaidi R, Thorin C, Michaud S, Anton M, Bencharif D. Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders // *Res Vet Sci.* – 2016. – Vol. 106. – P. 66–73.
11. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins) // *Anim Reprod Sci.* – 2010. – Vol. 119. – P. 305–313.

12. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen // *Res Vet Sci.* – 2012. – Vol. 93. – P. 440–447.
13. Buendia P., Soler C., Paolicchi F., Gago G., Urquieta B., Perez-Sanchez F., BustosObregon E., Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-assisted system // *Theriogenology.* – 2002. – Vol. 57. – P. 1207–1218.
14. Castro SV, De Carvalho AA, Da Silva CMG, Faustino LR, Campello CC, Lucci CM, et al. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and in vitro culture of ovarian tissue // *Cell Tissue Res.* – 2011. – Vol. 346. – P. 283–92.
15. Caturla-Sánchez, E., Sánchez-Calabuig, M., Gutiérrez, J.F.P., Cerdeira, J., Castaño, C., Santiago-Moreno, J. Vitricification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures // *Cryobiology.* – 2018. – Vol. 80. – P. 126–129.
16. Cheema RS, Kaur S, Mavi GK, Singh AK, Honparkhe M, Gandotra VK. In vitro evaluation of Labrador dog spermatozoa cryopreserved in Tris-citric acid-fructose buffer supplemented with different combinations of extracellular and intracellular cryoprotectants // *Anim Biotechnol.* – 2021. – Vol. 32. – P. 352–365.
17. Commin L, Buff S, Rosset E, Galet C, Allard A, Bruyere P, Joly T, Guérin P, Neto V. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse // *Reprod Fertil Dev.* – 2012. – Vol. 24. – P. 461–471.
18. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice // *J Assist Reprod Genet.* – 2015. – Vol. 32. – P. 1167–70.
19. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model // *J Exp Zool.* – 1993. – Vol. 265. – P. 432–437.
20. FAO, 2009. Domestic animal genetic diversity. Available from: <http://www.fao.org/biodiversity/geneticresources/bio-domesticanimals/en/>.
21. Folch, J., Cocero, M.J., Chesné, P., Alabart, J.L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J.I., Sánchez, P., Echegoven, E., Beckers, J.F., Bonastre, A.S., Vignon, X. First birth of an anima from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning // *Theriogenology.* – 2009. – Vol. 71. – P. 1026–1034.
22. Fujihara M, Kaneko T, Inoue-Murayama M. Vitricification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 3970.
23. Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM. Glycerol, methylformamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation // *Reprod Domest Anim.* – 2010. – Vol. 45. – P. 214–220.
24. Galantino-Homer HL, Zeng WX, Megee SO, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski I. Effects of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation // *Mol Reprod Dev.* – 2006. – Vol. 73. – P. 638–650.
25. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells // *ILAR J.* – 2000. – Vol. 41. – P. 187–196.
26. Gosden, R.G., Baird, D.T., Wade, J.C., Webb, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at –196 degrees C // *Hum. Reprod.* – 1994. – Vol. 9. – P. 597–603.
27. Guthrie, H.D., Liu, J., Critser, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa // *Biol.Reprod.* – 2002. – Vol. 67. – P. 1811–1816
28. Hariya M, Suzuki H. Incidence of apoptotic cells after vitricification in canine ovarian tissues // *J Mamm Ova Res.* – 2016. – Vol. 33. – P. 69–75.
29. Hayakawa H, Yamazaki T, Oshi M, Hoshino M, Dochi O, Koyama H. Cryopreservation of conventional and sexsorted bull sperm using a directional freezing method // *Reprod Fertil Dev.* – 2007. – Vol. 19. – P. 176–177.
30. Hesser, A., Darr, C., Gonzales, K., Power, H., Scanlan, T., Thompson, J., Love, C., Christensen, B., Meyers, S. Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility // *Theriogenology.* – 2017. – Vol. 87. – P. 115–123.
31. Hernández-Avilés C, Ruíz-Cristancho A, Vergara-Galván M, Zambrano-Varón J, Jiménez-Escobar C. The Effect of N-N-dimethylformamide on the membrane characteristics of canine spermatozoa after cryopreservation, and its relationship with post-thaw motility // *Top Companion Anim Med.* – 2020. – Vol. 38. – P. 100372.
32. Hirayama Y, Inoue K, Suzuki H. Effect of intraperitoneal administration of desialylated erythropoietin on the follicular survival in cryopreserved canine ovaries after xenotransplantation // *J Mamm Ova Res.* – 2011. – Vol. 28. – P. 143–147.
33. Hori T, Ushijima H, Kimura T, Kobayashi M, Kawakami E, Tsutsui T. Intrauterine embryo transfer with canine embryos cryopreserved by the slow freezing and the Cryotop method // *J Vet Med Sci.* – 2016. – Vol. 78. – P. 1137–1143.
34. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitricification and freezing in vapor: Effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability // *Biol Reprod.* – 2004. – Vol. 71. – P. 1167–1173.
35. Isachenko E, Mallmann P, Rahimi G, et al. Vitricification technique-new possibilities for male gamete lowtemperature storage // In: Katkov II (ed). *Current Frontiers in Cryobiology.* ISBN: 978-953-51-0191-8. Croatia: IntechOpen. – 2012. – P. 41–76.
36. Isachenko, V.; Rahimi, G.; Mallmann, P.; Sanchez, R.; Isachenko, E. Technologies of cryoprotectant-free vitricification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness // *Andrology.* – 2017. – Vol. 5. – P. 1055–1063.
37. Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS, Ueta YY, Matsui M, Lee JY, Suwa Y, Miyahara K, Suzuki H. Cryopreservation of canine ovaries by vitricification // *J Reprod Dev.* – 2006. – Vol. 52. – P. 293–299.
38. IUCN Species Survival Commission, 2010. IUCN Red List Categories and Criteria, Version 3. 1. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

39. Jime'nez-Rabada'n P, Garcí'a-A'lvarez O, Vidal A, et al. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders // *Cryobiology*. – 2015. – Vol. 71. – P. 85–90.
40. Jivago JLPR, Paulini F, Silva RC, Araujo MS, Marinho APS, Lucci CM. Cryopreservation and characterization of canine preantral follicles // *Cryobiology*. – 2018. – Vol. 81. – P. 34–42.
41. Kagawa, N., Kuwayama, M., Nakata, K., Vajta, G., Silber, S., Manabe, N., Kato, O. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre-antral follicles of adult mice // *Reprod. Biomed.* – 2007. – Vol. 14. – P. 693–699.
42. Kim YJ, Kim BJ, You IJ. Embryo transfer with frozen embryos in the dog // *J Vet Clin.* – 2002. – Vol. 19. – P. 73–79.
43. Kumar, A.; Prasad, J.; Srivastava, N.; Ghosh, S. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa // *Biopreservation Biobanking*. – 2019. – Vol. 17. – P. 603–612.
44. Leibo, S.P.; Songsasen, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species // *Theriogenology*. – 2002. – Vol. 57. – P. 303–326.
45. Linde-Forsberg, C. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen // *Recent Adv. Small Anim. Reprod.* – 2001. – Vol. 21 – P. 1–5.
46. Lopes CAP, Alves AMCV, Jewgenow K, Bão SN, de Figueiredo JR. Cryopreservation of canine ovarian cortex using DMSO or 1,3-propanediol // *Theriogenology*. – 2016. – Vol. 86. – P. 1165–1174.
47. Luvoni, G.C.; Colombo, M. Cold case: Small animal gametes cryobanking // *Theriogenology*. – 2020. – Vol. 150. – P. 445–451.
48. Maja Zakošek Pipan, Margret L. Casal, Nataša Šterbenc, Irma Virant Klun and Janko Mrkun. Vitrification Using Soy Lecithin and Sucrose: A New Way to Store the Sperm for the Preservation of Canine Reproductive Function // *Animals*. – 2020. – Vol. 10. – P. 653.
49. Mahiddine, F.Y., Kim, M.J. Overview on the antioxidants, egg yolk alternatives, and mesenchymal stem cells and derivatives used in canine sperm cryopreservation // *Animals*. – 2021. – Vol. 11. – P.1930.
50. Mason SJ. Current review of artificial insemination in dogs // *Vet Clin North Am Small Anim Pract* – 2018. – 48. – P. 567–580.
51. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 247. – P. 125–142.
52. Miller, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen // *Theriogenology*. – 2008. – Vol. 70. – P. 463–468.
53. Moce' E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival // *Anim Reprod Sci.* – 2010. – Vol. 118. – P. 236–247.
54. Mohamed MS. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study // *Iranian J Reprod Med.* – 2015. – Vol. 13. – P. 633.
55. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival // *Cryobiology*. – 2005. – Vol. 51. – P. 241–249.
56. Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives // *Sci China Life Sci.* – 2014. – Vol. 57. – P. 903–914.
57. Nagashima JB, Sylvester SR, Nelson JL, Cheong SH, Mukai C, Lambo C, Flanders JA, Meyers-Wallen VN, Songsasen N, Travis AJ. Live births from domestic dog (*Canis familiaris*) embryos produced by in vitro fertilization // *PLoS One*. – 2015. – №10(12). – P. e0143930.
58. Nagashima JB, Songsasen N. Canid Reproductive Biology: Norm and Unique Aspects in Strategies and Mechanisms // *Animals*. – 2021. – №11(3). – P. 653
59. Norton BG. The preservation of species // New Jersey: Princeton University Press. – 2014
60. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. Influence of extender, cryopervative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws // *Theriogenology*. – 1989. – Vol. 31. – P. 451–461.
61. Paris, M.C., Snow, M., Cox, S.L., Shaw, J.M. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? // *Theriogenology*. – 2004. – Vol. 61. – P. 277–291.
62. Paris, M.C.J., Schlatt, S. Ovarian and testicular tissue xenografting: its potential for germline preservation of companion animals, non-domestic and endangered species // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2007. – Vol. 19. – P. 1–12
63. Perfía F.J., Núñez-Martínez I., Morán J.M. Semen technologies in dog breeding: an update // *Reprod Domest Anim.* – 2006. – №41(2). – P. 21–9.
64. Perfilyeva, A. Kira Bepalova, Sergey Bepalov, Mamura Begmanova. et al. Kazakh national dog breed tazy: what do we know? // *PLoS One*18. – 2023.
65. Perfilyeva A., Bepalova K., Mussabayev R., Begmanova V. et al. // Genetic diversity and origin of Kazakh Tobet Dogs. // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol.14. – P. 23137
66. Prathalingam NS, Holt WV, Revell SG, Mirczuk S, Fleck RA, Watson PF. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw // *Theriogenology* – 2006. – Vol. 66. – P. 1894–1900.
67. Purdy PH, Graham JK. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility // *Biol Reprod.* – 2004. – Vol. 71. – P. 522–527.
68. Qadeer S, Khan MA, Ansari MS, et al. Evaluation of antifreeze protein III for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm // *Anim Reprod Sci.* – 2014. – Vol. 148. – P. 26–31.
69. Qadeer S, Khan MA, Shahzad Q, et al. Efficiency of beetle (*Dendroides canadensis*) recombinant antifreeze protein for buffalo semen freezability and fertility // *Theriogenology*. – 2016. – Vol. 86. – P. 1662–1669.
70. Rajoriya JS, Prasad JK, Ramteke SS, et al. Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa // *Anim Reprod Sci.* – 2016. – Vol. 164. – P. 72–81.

71. Reid CE, Hermes R, Blottner S, et al. Split-sample comparison of directional and liquid nitrogen vapour freezing method on post-thaw semen quality in white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum* and *Ceratotherium simum cottoni*) // *Theriogenology*. – 2009. – Vol. 71. – P. 275–291.
72. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, de Leseqno CV, Chastant-Maillard S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch // *Reproduction*. – 2005. – Vol. 130. – P. 193–201.
73. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, de Leseqno CV, Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. In vitro canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 66. – P. 1685–1693.
74. Ringleb J, Waurich R, Wibbelt G, Streich WJ, Jewgenow K. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI // *Reprod Fertil Dev*. – 2011. – Vol. 23. – P. 818–25.
75. Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 65. – P. 1848–1858.
76. Rota A, Milani C, Romagnoli S, Zucchini P, Mollo A. Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5% glycerol or 5% ethylene glycol // *Anim Reprod Sci*. – 2010. – Vol. 118. – P. 94–97.
77. Saikhun J, Sriussadaporn S, Thongthip N, Pinyopummin A, Kitiyanant Y. Nuclear maturation and development of IVM/IVF canine embryos in synthetic oviductal fluid or in co-culture with buffalo rat liver cells // *Theriogenology*. – 2008. – Vol. 69. – P. 1104–1110.
78. Sa'nchez R, Risopatro'n J, Schulz M, et al. Canine sperm vitrification with sucrose: Effect on sperm function // *Andrologia*. – 2011. – Vol. 43. – P. 233–241.
79. Sánchez-Calabuig MJ, Mailló V, Beltrán-Breña P, de la Fuente Martínez J, GaleraCarrillo S, Pérez-Gutiérrez JF, Pérez-Cereales S. Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders // *Reprod Biol*. – 2017. – Vol. 17. – P. 233–238.
80. Saragusty J, Gacitua H, Pettit MT, Arav A. Directional freezing of equine semen in large volumes // *Reprod Domest Anim*. – 2007. – Vol. 42. – P. 610–615.
81. Saragusty J, Gacitua H, Zeron Y, Rozenboim I, Arav A. Double freezing of bovine semen // *Anim Reprod Sci*. – 2009. – Vol. 115. – P. 10–17.
82. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // *Reproduction*. – 2011. – №141(1). – P.1–19.
83. Saragusty J, Osmer JH, Hildebrandt TB. Controlled ice nucleation—Is it really needed for large-volume sperm cryopreservation? // *Theriogenology*. – 2016. – Vol. 85. – P. 1328–1333.
84. Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen // *AI Digest*. – 1969. – Vol. 17. – P. 6–7.
85. Smits J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation // *Hum Reprod Update*. – 2010. – Vol. 16. – P. 395–414.
86. Songsasen N, Wildt DE. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog // *Anim Reprod Sci*. – 2007. – Vol. 98. – P. 2–22.
87. Tao T, Valle AD. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application // *J Assist Reprod Genet*. – 2008. – Vol. 25. – P. 287–296.
88. Thomassen, R., Sanson, G., Krognæs, A., Fougner, J.A., Andersen Berg, K., Farstad, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 66. – P. 1645–1650.
89. Turathum B, Saikhun K, Sangsuwan P, Kitiyanant Y. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2010. – Vol. 8. – P. 70.
90. Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MIB, Vajta G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes // *Cryobiology*. – 2002. – Vol. 45. – P. 91–94.
91. Vizuete G, Jimenez E, Agüera EI, Pérez-Marín CC. Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders // *Reprod Domest Anim*. – 2014. – №49(1). – P. e5–8.
92. Wakasa I, Hayashi M, Abe Y, Suzuki H. Distribution of follicles in canine ovarian tissues and xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissues with even distribution of follicles // *Reprod Domest Anim*. – 2017. – №52(2). – P. 219–223.
93. Wanderley LS, Machado Luz HK, Faustino LR, Lima IMT, Lopes CAP, Silva AR, et al. Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol // *Theriogenology*. – 2012. – Vol. 77. – P. 260–7.
94. Wang, X., Cheng, H., Yin, H., Kim, S.S., Lin Tan, S., Gosden, R.G. Fertility after intact ovary transplantation // *Nature*. – 2002. – Vol. 24. – P. 385.
95. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to minus 196 degree C and minus 269 degree C // *Science*. – 1972. – Vol. 178. – P. 411–414. Wildt, D.E. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation // *ILAR J*. – 2000. – Vol. 41. – P. 228–234.
96. Wildt, D.E. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation // *ILAR J*. – 2000. – Vol. 41. – P. 228–234.

Авторлар туралы мәліметтер:

Сейсенбаева Акерке Сенбаевна (автор корреспондент) – аға ғылыми қызметкер, Физиология және генетика институты (Алматы қ., Қазақстан, *e-mail: S_akerke@mail.ru).

Әбдікерім Салтанат Ержанқызы – ғылыми қызметкер, Физиология және генетика институты (Алматы қ., Қазақстан, e-mail: abdikerimse@gmail.com).

Төлебаева Анар Дүйсембекқызы – магистр, аға ғылыми қызметкер, Физиология және генетика институты (Алматы қ., Қазақстан, e-mail: tolebaeva_anara@mail.ru).

Абылкасымова Гульнар Мухтаргазыевна – Томск мемлекеттік университетінің аспиранты (Томск қ., Ресей), аға ғылыми қызметкер, Физиология және генетика институты (Алматы қ., Қазақстан, e-mail: gulyam05@mail.ru).

Перфильева Анастасия Викторовна – биология ғылымының кандидаты, ассоциированный профессор, аға ғылыми қызметкер, Физиология және генетика институты (Алматы қ., Қазақстан, e-mail: nastyaper2009@mail.ru).

Information about authors:

Seisenbayeva Akerke Senbayevna (corresponding author) – senior researcher, “Institute of Genetics and Physiology” (Almaty, Kazakhstan, *e-mail: S_akerke@mail.ru).

Abdikerim Saltanat Yerzhankyzy – junior researcher, “Institute of Genetics and Physiology” (Almaty, Kazakhstan, e-mail: abdikerimse@gmail.com).

Tolebayeva Anar Duisembekkyzy – master, senior researcher, “Institute of Genetics and Physiology” (Almaty, Kazakhstan, e-mail: tolebaeva_anara@mail.ru).

Abylkassymova Gulnar Muchtargazyevna – postgraduate student of Tomsk State University, (Tomsk, Russian Federation), senior researcher, “Institute of Genetics and Physiology” (Almaty, Kazakhstan, e-mail: gulyam05@mail.ru).

Perfilyeva Anastasiya Victorovna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, leading researcher, “Institute of Genetics and Physiology” (Almaty, Kazakhstan, e-mail: nastyaper2009@mail.ru).

Сведения об авторах:

Сейсенбаева Акерке Сенбаевна (автор-корреспондент) – старший научный сотрудник, Институт физиологии и генетики (Алматы, Казахстан, e-mail: S_akerke@mail.ru);

Әбдікерім Салтанат Ержанқызы – младший научный сотрудник, Институт физиологии и генетики (Алматы, Казахстан, e-mail: abdikerimse@gmail.com);

Төлебаева Анар Дүйсембекқызы – магистр, старший научный сотрудник, Институт физиологии и генетики (Алматы, Казахстан, e-mail: tolebaeva_anara@mail.ru);

Абылкасымова Гульнар Мухтаргазыевна – аспирант Томского государственного университета (Томск, Российская Федерация), старший научный сотрудник Института физиологии и генетики (Алматы, Казахстан, e-mail: gulyam05@mail.ru);

Перфильева Анастасия Викторовна – кандидат биологических наук, ассоциированный профессор, ведущий научный сотрудник, Институт физиологии и генетики (Алматы, Казахстан, e-mail: nastyaper2009@mail.ru).

Келіп түсті 12 наурыз 2025 жыл

Қабылданды 20 тамыз 2025 жыл