

© Г. В. Максим'юк, Д. З. Воробець

УДК 636.082.43:591.463.11

**Г. В. Максим'юк, Д. З. Воробець**

## СТАНДАРТИЗОВАНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ПОЛІМОРФІЗМУ І ДЕСТРУКЦІЇ СПЕРМАТОЗОЇДІВ У НАТИВНІЙ ТА КРІОКОНСЕРВОВАНІЙ СПЕРМИ

Львівський національний медичний університет

ім. Данила Галицького МОЗ України (м. Львів)

Дана робота є фрагментом наукової теми "Дослідження функціонально-метаболических резервів стрес - лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції", номер держреєстрації №0111U000121.

**Вступ.** Відомо, що ефективність процесу запліднення яйцеклітин значною мірою залежить від стану структури акросоми та цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів [4, 5]. Однак, впроваджені у практику способи їх оцінки не дозволяють об'єктивно визначити ступінь деструктивного впливу на клітину чинників індукованої (ендо-) та прямої (екзогенної) дії [7, 8]. Тому сподіваємося, що розроблена методика контролю за станом структури сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми, зацікавить наукових співробітників та практичних спеціалістів лабораторій підприємств кріобіологічного і біотехнологічного профілю, науково-виробничих центрів держплемресурсів, науково-дослідних установ, вищих закладів освіти, контролюючих організацій, тощо.

**Метою роботи** було ввести у науково-дослідне і практичне виконання лабораторій відповідного профілю сучасні, об'єктивні методи контролю за станом структури сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми.

**Об'єкт і методи дослідження.** Сперма та сперматозоїди людини і тварин. Для проведення досліджень застосовують такі засоби вимірювальної техніки, допоміжне обладнання, реактиви і матеріали: ваги аналітичні; мікроскоп електронний; мікроскоп біологічний; рН-метр (іонометр); центрифуга; лічильник лабораторний для підрахунку лейкоцитарної формули (СЛ-1); полівінілформальдегід (ПВФА); хлороформ (СНCl<sub>3</sub>); натрію веронал (С<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Na); натрію ацетат (СН<sub>3</sub>СООNa • 3H<sub>2</sub>O); кислота осмієва (OsO<sub>4</sub>); кислота соляна (HCl); сахароза (С<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>); спирт етиловий (С<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH); вода дистильована; пробірки центрифужні або флакони 5 і 25 см<sup>3</sup>; скельця покривні; скельця предметні; скло шліфоване для виготовлення ножів ультра-мікромних; контейнери для зберігання скелець; сіточки предметні (бленди); ковпаки скляні; палички скляні; папір для етикеток; папір фільтрувальний лабораторний; колби мірні місткістю 500 см<sup>3</sup>; стакани хімічні місткістю 300 см<sup>3</sup> і 500 см<sup>3</sup>; піпетки мірні (1,0 і 0,1 см<sup>3</sup>); пінцети очні; скальпель; промивалка; груша гумова; вата; рушник.

### Порядок виконання робіт.

**1. Виготовлення і монтаж плівок-підкладок з сіточками (блендами).** Для виготовлення

плівок-підкладок 0,35 г ПВФА розчиняють у 100 см<sup>3</sup> бідистильованого хлороформу. Плівку-підкладку формують на поверхні шліфованого скла. Скло ретельно миють ватним тампоном, змоченим мильним розчином. Мило зі скла перший раз змивають водою з-під крану, другий – бідистильованою водою. Вимите скло витирають сухим, чистим рушником. Залишені на склі ворсинки і пил здувають струменем повітря з гумової груші. Підготовлене таким чином скло на 1/3 довжини занурюють у спеціальний закритий циліндр, який на 1/3 висоти заповнений 0,35 %-вим розчином ПВФА. Через 15-20 с його акуратно виймають з розчину і впродовж 10-15 с тримають у вільному від рідини закритому просторі циліндра. За час витримання скла у випарах хлороформу на його поверхні утворюється тонка, майже непомітна неозброєним оком, плівка-підкладка.

Для того, щоб плівку-підкладку зняти зі скла і перенести на воду, її розрізають скальпелем по периметру утвореного на поверхні шліфованого скла прямокутника. Скло, з розрізаною під кутом 45 плівкою, обережно занурюють у бідистильовану воду, якою до країв заповнений хімічний стакан. При занурюванні скла у воду сили поверхневого натягу води знімають плівку зі скла. Відокремлена плівка-підкладка має вільно плавати на поверхні води. Бленди на виготовленій плівці розміщують пінцетом з такого розрахунку, щоб у кожному з 5-7 сформованих рядів було по три сіточки.

Для перенесення плівки з блендами на предметне скло його нижню частину обережно з'єднують з меншою стороною прямокутника плівки і швидко, але не дуже різко, під кутом 45 занурюють у воду. Внаслідок виконаних маніпуляцій плівка з сіточками рівномірно лягає на скло, яке висушують під скляним ковпаком і переносять у закриті контейнери для зберігання.

**2. Виготовлення маточного і фіксуєчого розчинів.** Маточний розчин готують у мірній колбі місткістю 500 см<sup>3</sup>. В колбу вливають 200-300 см<sup>3</sup> бідистильованої води, в якій розчиняють 14,714 г вероналу натрію (С<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Na, медінал) і 9,714 г ацетату натрію (СН<sub>3</sub>СООNa • 3H<sub>2</sub>O). Внесені у воду компоненти розчину розмішують скляною паличкою і, після їх повного розчинення, бідистильованою водою доводять об'єм розчину до мітки 500 см<sup>3</sup>. Виготовлений маточний розчин зберігають у холодильнику за температури 2-4 оС.

З маточного розчину готують фіксуєчий розчин. Для цього в чистий, виготовлений з темного скла, шліфований хімічний посуд місткістю 20-30

см<sup>3</sup> піпеткою вносять 5,0 см<sup>3</sup> маточного розчину, 5,0 см<sup>3</sup> 0,1 н НСІ, 2,5 см<sup>3</sup> бідистильованої води і 12,5 см<sup>3</sup> 2,0 %-ого розчину осміевої кислоти (OsO<sub>4</sub>). На 1,0 см<sup>3</sup> фіксуючого розчину додають 45 мг сахарози. Кінцева концентрація іонів водню (рН) фіксуючого розчину має становити 7,4. Отриманий розчин використовують для фіксації тканин (ізольованих клітин) організму теплокровних тварин.

**3. Підготовка проб до досліджень.** Мікропіпеткою від свіжоотриманих еякулятів, а також після їх розрідження, еквілібрації та розморожування, у центрифужну пробірку (флакон) відбирають по 0,1 см<sup>3</sup> сперми, до якої доливають по 2-3 см<sup>3</sup> фіксуючого розчину. Сперму з розчином витримують протягом 20-30 хв за температури 18-20 оС і впродовж 5 хв за 800 г відокремлюють сперматозоїди від фіксатора шляхом центрифугування. Зафіксовані і відцентрифуговані клітини двічі промивають бідистильованою водою, використовуючи кожного разу вказаний режим роботи центрифуги.

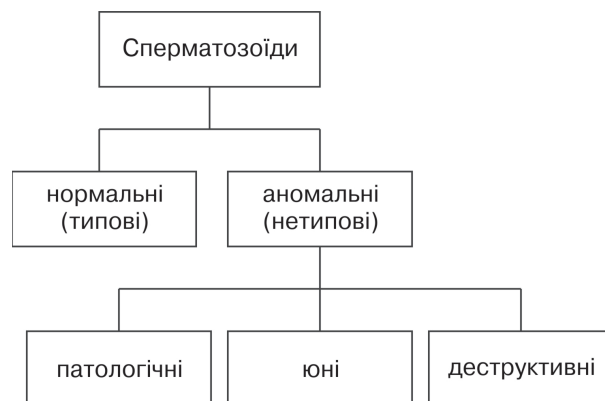
Оптимальну концентрацію сперматозоїдів у пробах сперми (млрд/см<sup>3</sup>) визначають візуально методом світлової мікроскопії. Дистильовану воду у пробірки (флакони) доливають поступово. Для нанесення зразків проб на бленди у флакони з оптимальною концентрацією сперматозоїдів вводять спеціально загострену скляну паличку, якою суспензію клітин переносять на предметне скельце. Кожну дослідну пробу наносять на три сіточки. Порядок їх розміщення на склі нумерують. Результати досліджень занотовують у лабораторному журналі.

Підготовлені проби поміщають під скляний ковпак і, після випаровування залишків води, переносять у закриті контейнери для зберігання (термін зберігання до двох років) або зразу ж приступають до досліджень.

#### 4. Визначення поліморфізму сперматозоїдів.

Для визначення співвідношень кількості статевих клітин у спермі популяцію сперматозоїдів неоднакової форми ділять на дві групи (рис. 1). До першої групи відносять нормальну (типову), до другої – аномальну (нетипову) форму. Характерною ознакою сперматозоїдів типової форми є те, що вони, незважаючи на дію ендо- та екзогенних чинників впливу, зберігають нормальну форму головки, шийки, тіла і хвоста, а також цілісність акросоми та цитоплазматичної мембрани. Акросома таких сперматозоїдів щільно прилягає до головки, цитоплазматична мембрана - до всіх ділянок клітини і має чітко окреслену межу її зовнішньої поверхні.

До підгрупи патологічних сперматозоїдів відносять гігантські, карликові, двотілі і двоголові клітини з характерними змінами головки, шийки, тіла і хвоста. Їх нормальна, видовжена і звужена від апікального до базального краю головки, деформована в ширину і довжину або змінена на малу чи велику кулю, шийка - без плавного переходу до тіла, тіло - зменшене і товсте або видовжене і тонке, хвіст - роздвоєний або редукований. Перераховані ознаки залежать від ступеня негативного впливу на них



**Рис. 1. Поліморфізм сперматозоїдів у пробах сперми.**

ендо- та екзогенних факторів, які зумовлені спадковими хворобами і мутагенами.

Друга підгрупа - юні або незрілі форми клітин. Їх ідентифікація пов'язана з наявністю особливої цитоплазматичної крапельки. В період дозрівання (формування запліднювальної здатності) сперматозоїдів вона поступово пересувається від головки до хвоста.

До третьої підгрупи належать клітини з деструктивними змінами акросоми і цитоплазматичної мембрани. Вони утворилися внаслідок прямої дії на клітину ендо- та екзогенних чинників впливу. Акросома таких клітин набухає і сповзає з головки, яка поступово вакуолізується і розпадається. Хвостова частина загинається, закручується в кільця різної форми (доволі часто у спіраль). Тіло і хвіст - розпадаються на осьові нитки.

Визначення поліморфізму сперматозоїдів у пробах сперми здійснюють методом електронної мікроскопії. Розміщений на предметному столику патрон з об'єктом дослідження штангами кульових ручок об'єктивної лінзи рухають так, щоб висвітлені на екрані ряди квадратів сіточок пересувалися зліва направо. Після досягнення крайнього квадрата переходять на нижній ряд і продовжують переміщення у протилежному напрямку. Лейкоцитарним лічильником три рази підряд відраховують по 100 клітин типової і нетипової форми. Сумарну кількість сперматозоїдів (n=100) приймають за 100 %-ів, кількість окремо взятих типових або нетипових форм – за x. За складеними рівняннями знаходять кількість типових і нетипових форм сперматозоїдів (табл. 1).

**Інтерпретація визначень.** Визначена кількість сперматозоїдів типової та нетипової патологічної, юної і деструктивної форми у свіжоотриманій спермі високої якості становить 80, 7, 3, 10 %, розріджених – 76, 7, 3, 14 %, еквіліброваних – 63, 7, 3, 27 %, розморожених – 36, 7, 0, 57 %-ів, відповідно. Однак, оскільки в процесі криоконсервації сперми кількість сперматозоїдів типової форми зменшується, патологічної не змінюється, юної зменшується до нуля (цитоплазматична крапелька у розмороженій спермі зникає), а деструктивної збільшується, то для визначення впливу умов розрідження, еквілібрації і розморожування на клітину до уваги беруть тільки кількість сперматозоїдів типової форми у

## МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

Таблиця 1

**Співвідношення сперматозоїдів типової і нетипової форм у спермі, %**

| Сперматозоїди | Сперма        |            |               |             |
|---------------|---------------|------------|---------------|-------------|
|               | свіжоотримана | розріджена | еквілібрована | розморожена |
| Типові        | 80            | 76         | 63            | 36          |
| Патологічні   | 7             | 7          | 7             | 7           |
| Юні           | 3             | 3          | 3             | 0           |
| Деструктивні  | 10            | 14         | 27            | 57          |
|               | $x_1^*$       | $x_2^*$    | $x_3^*$       | $x_4^*$     |

**Примітка:** \*  $x_1, x_2, x_3, x_4$  – кількість типових та нетипових патологічних, юних і деструктивних форм сперматозоїдів у нативній (свіжоотриманій), розрідженій, еквіліброваній та розмороженій спермі, відповідно.

свіжоотриманій ( $x_1$ ), розрідженій ( $x_2$ ), еквіліброваній ( $x_3$ ) та розмороженій ( $x_4$ ) спермі.

**Приклад розрахунків.** Співвідношення кількості сперматозоїдів типової форми у пробах сперми обчислюють за складеними рівняннями. Підраховану суму сперматозоїдів свіжоотриманої або нативної ( $80+7+3+10 = 100$ ), розрідженої ( $76+7+3+14 = 100$ ), еквіліброваної ( $63+7+3+27 = 100$ ) і розмороженої ( $36+7+57 = 100$ ) сперми приймають за 100 %, кількість шуканих форм – за  $x$ , а саме:

100 сперматозоїдів – 100 %

80, 76, 63 або 36 сперматозоїдів –  $x_1, x_2, x_3$  або  $x_4$   
за формулами рівнянь

$$x_1 = \frac{80 \cdot 100}{100}$$

$$x_2 = \frac{76 \cdot 100}{100}$$

$$x_3 = \frac{63 \cdot 100}{100}$$

$$x_4 = \frac{36 \cdot 100}{100}$$

знаходять кількість сперматозоїдів типової форми у свіжоотриманій, розрідженій, еквіліброваній та розмороженій спермі. Аналогічним чином шукають кількість сперматозоїдів патологічної, юної або деструктивної форми.

### 5. Визначення деструкції сперматозоїдів.

**5.1. Визначення абсолютних показників втрат сперматозоїдів типової форми.** Визначення негативного впливу умов заморожування сперми на акросому і цитоплазматичну мембрану сперматозоїдів проводять у два етапи (**табл. 2**).

На першому етапі визначають абсолютні показники прямого впливу умов розрідження ( $A^1_{\text{п}}$ ), еквілібрації ( $A^2_{\text{п}}$ ), розморожування ( $A^3_{\text{п}}$ ) та їх сумарного впливу ( $A_{\text{с}}$ ) за повний цикл технологічного процесу. З цією метою від вираженої у відсотках кількості типових форм сперматозоїдів у свіжоотриманій спермі ( $x_1$ ) віднімають визначену їх кількість після розрідження ( $x_2$ ) і знаходять число втрачених клітин типової форми.

Таблиця 2

**Вплив етапів кріоконсервації на акросому і цитоплазматичну мембрану сперматозоїдів, %**

| Сперматозоїди | Абсолютні показники впливу кріоконсервації |                                |                                |                              |
|---------------|--|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
|               | прямий                                     |                                |                                | Сумарний                     |
|               | розрідження                                | еквілібрація                   | розморожування                 |                              |
| Типові        | 4  | 13                             | 27                             | 44                           |
|               | $A^1_{\text{п}} = x_1 - x_2^*$             | $A^2_{\text{п}} = x_2 - x_3^*$ | $A^3_{\text{п}} = x_3 - x_4^*$ | $A_{\text{с}} = x_1 - x_4^*$ |

**Примітка:** \*  $x_1-x_2, x_2-x_3, x_3-x_4$  – кількість клітин із зміненою структурою після розрідження, еквілібрації і розморожування сперми;  $x_1-x_4$  – за повний цикл кріоконсервації (від одержання до розморожування сперми);  $A^1_{\text{п}}$  – абсолютний показник прямого впливу умов розрідження,  $A^2_{\text{п}}$  – еквілібрації,  $A^3_{\text{п}}$  – розморожування,  $A_{\text{с}}$  – абсолютний показник сумарного впливу умов кріоконсервації.

**Інтерпретація визначень.** Аналіз визначеної кількості сперматозоїдів із зміненою акросомою і цитоплазматичною мембраною свідчить про те, що після розрідження сперми тільки 4 % клітин

типової форми зазнають деструктивних змін. Відсоток втрат сперматозоїдів вказаної форми після еквілібрації і розморожування сперми становить 13 % і 27 %, відповідно. За період від отримання до

розморожування сперми цілісність акросоми і цитоплазматичної мембрани втрачають 44 %-ки клітин.

**Приклад розрахунків.** Визначені згідно з формулами:  $A^1_n = 80 - 76$ ,  $A^2_n = 76 - 63$ ,  $A^3_n = 63 - 36$ ,  $A_c = 80 - 36$  абсолютні втрати статевих клітин типової форми після розрідження сперми, еквілібрації, розморожування (прямий вплив) та від отримання до

розморожування (сумарний вплив) становлять 4, 13, 27 і 44 %-ки сперматозоїдів, відповідно.

**5.2. Визначення відносних показників втрат сперматозоїдів типової форми.** Визначені відносні показники прямого і сумарного впливу умов технології заморожування на акросому і цитоплазматичну мембрану сперматозоїдів дозволяють

Таблиця 3

**Вплив етапів кріоконсервації на акросому і цитоплазматичну мембрану сперматозоїдів, %**

| Сперматозоїди | Відносні показники впливу кріоконсервації       |   |   |   |
|---------------|---|---|---|---|
|               | прямий  |   |   | сумарний                                  |
|               | розрідження                                     | еквілібрація                                    | розморожування                                  |   |
|               | 9   | 29  | 61  | 55  |
| Типові        | $V^1_n = \frac{(x_1-x_2) \cdot 100^*}{x_1-x_4}$ | $V^2_n = \frac{(x_2-x_3) \cdot 100^*}{x_1-x_4}$ | $V^3_n = \frac{(x_3-x_4) \cdot 100^*}{x_1-x_4}$ | $V_c = \frac{(x_1-x_4) \cdot 100^*}{x_1}$ |

**Примітка:**  $x_1-x_2$ ,  $x_2-x_3$ ,  $x_3-x_4$  – кількість клітин із зміненою структурою після розрідження, еквілібрації і розморожування сперми;  $x_1-x_4$  – за повний цикл кріоконсервації (від одержання до розморожування сперми);  $V^1_n$  – відносний показник прямого впливу умов розрідження,  $V^2_n$  – еквілібрації,  $V^3_n$  – розморожування,  $V_c$  – відносний показник сумарного впливу умов кріоконсервації.

оцінити вплив кожного наступного етапу на попередній (табл.3).

Для цього кількість втрачених клітин типової форми ( $x_1-x_4$ ) приймають за 100 %. Після розрідження ( $x_1-x_2$ ), еквілібрації ( $x_2-x_3$ ) або розморожування ( $x_3-x_4$ ) – за  $x$ . Із складених рівнянь знаходять вплив на сперматозоїди кожного наступного етапу щодо попереднього. Аналогічно визначають сумарний вплив умов кріоконсервації. Для цього початкову кількість клітин типової форми ( $x_1$ ) приймають за 100%, деструктивної ( $x_1-x_4$ ) – за  $x$ .

**Інтерпретація визначень.** Наведені розрахунки свідчать, що ступінь негативного впливу умов розрідження сперми на статеві клітини становить 9%. На етапі еквілібрації він збільшується в 3 рази (29%), після розморожування – в 2 рази (61 %). За повний цикл кріоконсервації його величина становить 55%-ки. Це означає, що кількість сперматозоїдів із зміненою структурою акросоми і цитоплазматичної мембрани у розмороженій спермі в 11 разів більша, ніж у розрідженій.

**Приклад розрахунків.** Визначені згідно з формулами:

$$V^1_n = \frac{4 \cdot 100}{44}$$

$$V^2_n = \frac{13 \cdot 100}{44}$$

$$V^3_n = \frac{27 \cdot 100}{44}$$

$$V_c = \frac{44 \cdot 100}{80}$$

відносні втрати клітин типової форми після розрідження, еквілібрації, розморожування (прямий вплив) та від отримання до розморожування сперми (сумарний вплив) становлять 9, 29, 61, 55 %-ки сперматозоїдів, відповідно.

Всі реактиви мають бути кваліфікації х.ч. або ч.д.а. Дозволяється використовувати інші засоби виміральної техніки, допоміжне обладнання, реактиви і матеріали, які за якістю та характеристиками не гірші за наведені.

За кінцевий результат приймають отриману з трьох визначень ( $n=3 \cdot 100$ ) середньоарифметичну величину (М). Похибка результатів визначень не повинна перевищувати  $\pm 10$  %.

**Список літератури**

1. Линник Т.П. Влияние осмотичности криозащиты среды на сохранение спермиев петуха при кріоконсервировании / Т.П. Линник, В.И. Грищенко, А.Б. Артеменко, А.В. Терещенко // Проблемы кріобиологии. – 2000. – №2. – С. 86-93.
2. Козловський І.В. Стан репродуктивної функції у хворих крипторхізмом / І.В. Козловський // Урологія. – 2000. – №2. – С. 65-69.
3. Blom E. Ocena morfologiczna wad plemnicow buhaja. Zmiany patologiczna plemnicow w Swietle nowich badan / E. Blom // Med. Wet. – 1981. – V.37, № 3. – S. 129 –137.
4. Cerolini S. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen / S. Cerolini, A. Maldjian, F. Pizzi, T.M. Gliozzi // Reproduction. – 2001. – V.121. – P. 395-401.
5. Gamete physiology / ed. by Asch R., Balmaceda J., Johnston I.. – USA: Norvell, 1990. – 354 p. – ISBN 1878601024.
6. Mortimer Sh.T. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa / Sh.T. Mortimer, W.M. Maxwell // Reproduction. – 2004. – V.127. – P. 285-291.
7. Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen / P.F. Watson // Animal reproduction science. – 2000. – V.60. – P. 481-492.
8. Manual for the Examination of Human Semen Cervical Mucus interaction / H.Barratt; World Health Organisation, WHO Laboratory. – Cambridg : University press, 1992. – 27 p.

УДК 636.082.43:591.463.11

### **СТАНДАРТИЗОВАНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ПОЛІМОРФІЗМУ І ДЕСТРУКЦІЇ СПЕРМАТОЗОЇДІВ У НАТИВНІЙ І КРІОКОНСЕРВОВАНІЙ СПЕРМІ**

**Максим'юк Г.В., Воробець Д. З.**

**Резюме.** Науковим співробітникам, аспірантам і практичним спеціалістам лабораторій підприємств кріобіологічного і біотехнологічного профілю, вищих закладів освіти, науково-виробничих центрів держплемресурси та контролюючих установ для організації ефективного контролю за станом структури сперматозоїдів пропонуємо використовувати розроблену нами сучасну, об'єктивну методику визначення ступеня деструкції і поліморфізму статевих клітин в еякулятах нативної сперми, після її розрідження, еквілібрації та деконсервації заморожених спермодоз.

**Ключові слова:** сперма, сперматозоїди, акросома, цитоплазматична мембрана, поліморфізм і деструкція клітин, електронна мікроскопія.

УДК 636.082.43:591.463.11

### **СТАНДАРТИЗИРОВАННАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ПОЛИМОРФИЗМА И ДЕСТРУКЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ НАТИВНОЙ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ**

**Максимюк Г.В., Воробец Д. З.**

**Резюме.** Научным сотрудникам, аспирантам и практическим специалистам лабораторий предприятий кробиологическогоибиотехнологическогопрофиля,высшихучебныхзаведений,научно-производственных центров госплемресурсов и контролирующих учреждений с целью организации эффективного контроля за состоянием структуры сперматозоидов предлагаем использовать разработанную нами современную, объективную методику определения степени деструкции и полиморфизма половых клеток в еякулятах нативной спермы, после ее разбавления, эквilibрации и деконсервации замороженных спермодоз.

**Ключевые слова:** сперма, спермии, акросома, цитоплазматическая мембрана, полиморфизм и деструкция клеток, электронная микроскопия.

UDC 636.082.43:591.463.11

### **The Standardized Method Of Determining The Degree Of Polymorphism And Destruction Of Spermatozoa In Native And Cryopreserved Sperm**

**Maksymjuk H.V., Vorobets D.Z.**

**Summary.** We have developed a modern, objective method for determining the degree of destruction and polymorphism of germ cells in the native semen ejaculates after their dilution, equilibration and depreservation of the frozen sperm. The method is offered to researchers, graduate students and professionals in laboratories of the biotech and cryobiological profile companies, higher education institutions, research and production centers and controlling institutions.

**Key words:** sperm, spermatozoa, acrosome, cytoplasmic membrane, polymorphism and destruction of cells, electron microscopy.

Стаття надійшла 01.10.2011 р.