УДК 577.217:612.398.192;612.616 http://doi.org/10.15407/animbiol20.03.043

ЗНАЧЕННЯ ПРОТЕЇНІВ ПЛАЗМИ СПЕРМИ ССАВЦІВ У ЗАБЕЗПЕЧЕННІ ПРОЦЕСІВ ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ ТА ЗБЕРЕЖЕННІ ЗАПЛІДНЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ СПЕРМІЇВ

С. Б. Корнят
rjhyzn@ukr.net

Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

У статті узагальнено літературні дані про біохімічні механізми дії сполук білкової природи, амінокислот та протеїнів у спермі самців ссавців. Показана їхня роль у підтриманні процесів життєдіяльності сперміів і їх запліднювальної здатності. Розглянуто основні джерела надходження білків та сполук білкової природи до сім'яної плазми та їхній вплив у різній кількості і співвідношеннях на якісні показники сперміів та збереження ними запліднювальної здатності у статевих шляхах самців та самиць, поза організмом, за розбавлення їх синтетичними середовищами, за короткотривалого зберігання, присутності їх при кріоконсервуванні та розмороженні сперміів, їх наявність при запліднені. Показано значення вмісту протеїнів у кормах самців для забезпечення отримання від них еякулятів з повноцінними сперміями, що важливо для отримання повноцінного за якісними та кількісними показниками потомства. Розглянуто джерела надходження речовин білкової природи у спермопровід придатка сім'яника, їхній вміст у навколоспермальному середовищі та значення для підтримання процесів життєдіяльності сперміів. Описано дослідження, які стосуються вмісту протеїнів та їхніх складників у плазмі сперми самців ссавців після еякуляції, динаміка змін, їхній вплив на життєздатність і запліднювальну здатність сперміів та білкових сполук синтетичного і природного походження, введених у плазму після еякуляції чи синтетичне середовище для розбавлення. Також розглянуто використання сполук білкової природи та протеїнів різного походження у середовищах, які застосовуються для заморожування і розморожування сперми та їх позитивний вплив на спермії. На основі літературних даних обґрунтовано значення вказаних речовин у слизовій матки або середовищі для запліднення, зокрема на здатність сперміів проникати в яйцеклітину.

За розглянутими публікаціями зроблено висновок про важливість використання амінокислот, пептидів та протеїнів у середовищах для розбавлення, зберігання у рідкому стані, кріоконсервування і розморожування сперми самців ссавців для забезпечення високої виживаності і запліднювальної здатності сперматозоїдів.

Ключові слова: ССАВЦІ, ПРОТЕЇНИ, ПЕПТИДИ, АМІНОКИСЛОТИ, СПЕРМА, СПЕРМІЇ, ПЛАЗМА СПЕРМИ, СІМ'ЯНИК, ПРИДАТОК СІМ'ЯНИКА

SIGNIFICANCE OF MAMMALS SPERM PLASMA PROTEINS FOR MAINTAINING OF SPERMATOZOA VIABILITY AND PRESERVATION OF FERTILIZING ABILITY

S. B. Kornyat
rjhyzn@ukr.net

Institute the Animal Biology NAAS,
38 Vasyl Stus str., Lviv 79034, Ukraine

The article summarizes the literature data on the biochemical mechanisms of the action of the proteins and amino acids in the semen of mammalian males and their role in maintaining the processes of sperm life and fertilizing ability. The main sources of protein and protein compounds of the seminal plasma and their influence in different quantities and qualities signs on the sperms function and their preserving ability in the genital tract of males and females, outside the body, when diluted with synthetic media, short-term storage, their presence in cryopreservation and deconservation mediums of sperm, the presence of fertilization place are considered. The protein content in males is shown to ensure that ejaculates from quality sperm are obtained from them, which will enable them to obtain a high quality and quantitative expression of offspring. The ways of input of substances of protein nature in the epipidymis of the testicles, their content in it and the significance for sperm life are considered. The studies concerning the content of proteins and their components in semen

plasma of mammalian males after ejaculation, the dynamics of changes, their effect on the viability and fertilizing ability of sperms and protein compounds of synthetic and natural origin introduced into plasma or the environment which was not there during ejaculation has been described. Also, the use of protein compounds and proteins of various origin in the media used in frozen and defrosted sperm and their positive effect on sperm in this case are considered. The significance of the presence of these substances in the uterine mucus or the environment for fertilization is considered in the ability of sperm to penetrate into the egg and to fertilize it.

Based on the publications reviewed, the author concludes about the importance of using amino acids, peptides and proteins in diluent media, liquid storage, cryopreservation and defrosting medium of semen of male mammals to ensure more complete preservation of the primary purpose of sperm — the ability to fertilize the egg.

Keywords: MAMMALS, PROTEINS, PEPTIDES, AMINO ACIDS, SPERM, SPERMATOZOAS, SPERM PLASM, TESTIS, TESTIS EPIDIDYMIS

ЗНАЧЕНИЕ ПРОТЕИНОВ ПЛАЗМЫ СПЕРМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ОБЕСПЕЧЕНИИ ПРОЦЕССОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ И СОХРАННОСТИ ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СПЕРМИЕВ

С. Б. Корнят
rjhyzn@ukr.net

Институт биологии животных НААН,
ул. В. Стуса, 38, г. Львов, 79034, Украина

В статье обобщены литературные данные о биохимических механизмах действия соединений белковой природы, аминокислот и протеинов в сперме самцов млекопитающих и показана их роль в поддержании процессов жизнедеятельности сперматозоидов и их оплодотворяющей способности. Рассмотрены основные источники поступления протеинов и соединений белковой природы в семенной плазме и их влияние в различных количествах и соотношениях на функционирование сперматозоидов и сохранение ими оплодотворяющей способности в половых путях самцов и самок, вне организма, при разбавлении их синтетическими средами, при кратковременном хранении, присутствии их при криоконсервировании и деконсервировании спермиев, наличие при оплодотворении. Показано значение содержания протеинов в кормах самцов для обеспечения получения от них эякулятов с качественными спермиями, что даст возможность получения полноценного в качественном и количественном выражении потомства. Рассмотрены пути поступления веществ белковой природы в придаток семенника, их содержание в нем и значение для жизнедеятельности сперматозоидов. Описаны исследования касающиеся содержания протеинов и их составляющих в плазме спермы самцов млекопитающих после эякуляции, динамика изменений, их влияние на жизнеспособность и оплодотворяющую способность спермиев и белковых соединений синтетического и природного происхождения, введенных в плазму спермы. Также рассмотрено использование соединений белковой природы и протеинов разного происхождения в средах, которые применяются при замораживании и размораживании спермы, и их положительное влияние на сперматозоиды. На основании исследований ряда авторов рассмотрено значение наличия указанных веществ в слизи матки или среды для оплодотворения на способность сперматозоидов проникать в яйцеклетку и оплодотворять ее.

На основе рассмотренных публикаций сделан вывод о важности использования аминокислот, пептидов и протеинов в средах для разбавления, хранения в жидком состоянии, криоконсервирования и размораживания спермы самцов млекопитающих для обеспечения более полноценного сохранения основного назначения спермиев — способности к оплодотворению яйцеклетки.

Ключові слова: МЛЕКОПИТАЮЩИЕ, ПРОТЕИНЫ, ПЕПТИДЫ, АМИНОКИСЛОТЫ, СПЕРМА, СПЕРМИИ, ПЛАЗМА СПЕРМЫ, СЕМЕННИК, ПРИДАТОК СЕМЕННИКА

У багатьох країнах світу штучне осіменіння тварин в останні десятиріччя значно витісняє з виробництва природне парування завдяки своїм незаперечним перевагам, головною з яких є одержання приплоду кращої якості з меншими затратами праці та ресурсів. Наприклад, осіменіння свиноматок у Європі та Північній Америці зазвичай здійснюється розбавленою і охолодженою спермою кнурів. Біля 99 % осіменінь свиноматок проводять спермою, яку зберігали в рідкому стані в день взяття чи зберігали від одної до п’яти діб за темпера-

тури 15–20 °С і транспортували до місця осіменіння [67]. До 85 % всіх осіменінь свиноматок у світі проводять в день взяття сперми чи на наступний день. Сперму кнурів, яка була попередньо кріоконсервована, використовують для осіменіння свиноматок менше 1 % від загальної кількості осіменінь, що зумовлено більшими затратами часу і роботи для розмороження та нагрівання її до температури тіла, а також внаслідок нижчої результативності осіменіння (нижчий відсоток запліднених свиноматок від осіменених, кількість народжених живих поросят та середня маса їх тіла). Тому такий метод зберігання сперми у свинарстві здебільшого використовується за експорту/імпорту або з метою покращення генофонду віддалених стад [19]. Проте з кожним роком спостерігається збільшення кількості осіменіння свиноматок попередньо замороженою спермою.

З огляду на це, актуальною проблемою залишається розроблення нових та вдосконалення наявних середовищ для розбавлення, зберігання, кріоконсервування і розмороження сперми ссавців, які би мали максимальну спермозберігальну і спермостимулювальну дію та позитивний вплив на запліднення сперміями яйцеклітин. З часу перших спроб штучного осіменіння тварин, зроблених І. І. Івановим у 1926–1927 рр. і продовжених у 1930–1936 рр. В. К. Мілованoвим, який запропоновав перші розбавники (глюкозо-сульфатний і глюкозо-тартратний), мало що змінилося у підходах до цієї проблеми [41]. У цих роботах було показано, що сперматозоїди у розбавленій спермі самців сільськогосподарських тварин можуть залишатися живими і зберігати запліднювальну здатність довше, ніж у нативній.

Розбавлення сперми самців, яка в подальшому має бути використана для штучного осіменіння самиць, забезпечує не тільки збільшення об'єму еякуляту, що має значення при осіменінні кількох самок (або кількох десятків чи сотень — залежно від виду тварини) одним еякулятом, а й створення захисного середовища для сперміїв поза організмом самців. Тому синтетичні середовища мають мати фізико-хімічні і біологічні властивості, які б сприяли продовженню життя сперміїв порівняно з нерозбавленим еякулятом і максимальному збереженню їхньої запліднювальної здатності. Проте взяття, розбавлення, транспортування і зберігання розбавленої сперми пов'язані з охолодженням сперміїв до 20 °С за досить короткий час та зміною складу і властивостей міжклітинного середовища [40]. Це, у свою чергу, має більший чи менший негативний вплив на життєздатність сперміїв та, відповідно, їхню здатність до запліднення.

Тому склад середовищ і вдосконалення їх рецептів різними компонентами залишається актуальним. Одне з головних місць займають сполуки білкової природи: амінокислоти, пептиди і протеїни та їхнє значення в міжспермальному середовищі для забезпечення життєздатності, рухливості і запліднювальної здатності сперміїв, що й буде темою нашої роботи. Також до складу середовищ дослідники чи виробники вводять неорганічні речовини, які містять Сульфур чи сульфгідрильні групи, обмін яких в організмі тварин тісно пов'язаний з обміном протеїнів та сполук білкової природи. Розбавлена сперма зберігається в охолодженому стані, що сповільнює метаболічні процеси у сперміях, капацитацію та сприяє тривалішому збереженню цілісності акросоми [32]. Проте зміни складу плазми сперми і морфології сперміїв все ж відбуваються протягом зберігання і в цьому обміні речовин важливу роль відіграє наявність та вид сполук білкової природи у міжспермальному середовищі.

Вплив вмісту білкових речовин у кормах самців тварин на якість їхньої сперми. Сульфгідрильні складники сперми кнурів, такі, як глутатіон і ерготіонеїн, відіграють важливу роль у захисті сперміїв кнурів від окисних пошкоджень [70]. За додавання в раціон кнурам преміксу з поліненасиченими жирними кислотами відбулося зростання у сім'яній плазмі вмісту протеїну, ерготіонеїну, антипероксидної активності і глутатіону. Окрім цього, спостерігалася вища рухливість сперміїв протягом чотирьох днів зберігання в різних розбавниках, але за умови додавання до розбавника ліпопротеїнів, екстрагованих з жовтка курячих чи страусиних яєць. Без їх додавання активність сперміїв була нижчою, ніж у контролі [68]. Глутатіон (L-γ-глутаміл-L-цистеїнгліцин) є найпоширенішим небілковим тіолом клітин ссавців, де

він присутній у концентраціях 0,5–10 ммоль/л. Клітинний глутатіон відіграє важливу роль у багатьох біологічних процесах, зокрема синтезі протеїнів, ДНК і транспорті амінокислот, але особлива його роль полягає у захисті клітин від окиснення, оскільки сульфгідрильна група є сильним нуклеофілом і надає захист від пошкоджень внаслідок дії оксидантів, електрофілів і вільних радикалів [38]. Проте вміст глутатіону, Сульфуру, активність глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази у спермі кнурів є набагато меншими порівняно зі спермою самців інших видів тварин і, окрім цього, більшість тіолів у сперміях і сім'яній плазмі є у зв'язаному з протеїнами стані [74].

Відмічено також позитивний взаємозв'язок між вмістом протеїнів у сім'яній плазмі кнурів та її антиоксидантною активністю [69]. Встановлено, що додавання в раціон самців L-карнітину (бетаїн-γ-аміно-β-оксимасляна кислота) збільшує концентрацію і рухливість сперміїв в еякулятах у самців багатьох видів тварин. У самців ссавців L-карнітин присутній у високій концентрації в придатках сім'яників та сперміях, де він має важливе значення для забезпечення мітохондрій ацильними групами при формуванні ацилКоА як субстрату для окисних процесів, які забезпечують енергію для руху сперміїв. Щоденне додавання до раціону кнурам протягом 10 тижнів 250 мг L-карнітину мало позитивний вплив на частку морфологічно нормальних сперміїв — 69,17±11,51 у контрольних тварин проти 93,55±3,04 у дослідних ($P \leq 0,01$), що було поєднане зі зменшенням кількості сперміїв з дистальними краплями — 26,20±5,77 у контрольних тварин проти 1,50±0,60 у дослідних ($P \leq 0,01$). Відносна кількість прогресивно рухливих сперміїв також була вищою у кнурів за додавання L-карнітину — 35,27±7,75 у контрольних тварин проти 0,52±9,31 у дослідних. З огляду на ці дані, автори зробили висновок, що карнітин сприяє звільненню дистальних крапель і покращує кінетику сперміїв [50].

У кнурів з низьким вмістом у плазмі сперми протеїну молекулярною масою 70 кДа встановлена тенденція до зниження якісних і кількісних показників (концентрація сперміїв, рухливість сперміїв, вміст нормальних та патологічних форм сперміїв, а також відсоток сперміїв з проксимальними та дистальними плазматичними вкрапленнями). Також відмічається зниження зазначених показників сперми та вміст протеїну у сперміях кнурів під час теплого сезону року за підвищення температури навколишнього середовища, що зумовлює зменшення споживання корму [31].

Протеїни придатку сім'яника та їхній вплив на якість спермопродукції самців. Спермії самців ссавців при проходженні через придаток сім'яника зазнають структурної перебудови: зміни складу та потенціалу мембран, конденсації хроматину, набуття здатності до руху [66]. Протеїни, які секретуються епітелієм придатка сім'яників, вважаються такими, які є необхідними і мають виняткове значення для дозрівання сперміїв [14, 28], та зберігання у хвості придатка [3]. Протеїни, які секретуються придатками, є фізіологічно важливими і для самців [77] і для самок [10] ссавців. Також ці протеїни можуть визначати важливі елементи запліднювальної здатності сперміїв [13]. Кілька сотень протеїнів було ідентифіковано в епідидимальній рідині з різних частин придатку цапів [10]. Протеїни, присутні у рідині придатків, сформовані з протеїнів сім'яників, протеїнів придатка, продуктів протеолізу наявних у рідині придатків сім'яників протеїнів, деякою мірою — протеїнів мертвих сперміїв.

Вміст протеїнів у сперміях цапів суттєво ($P \leq 0,05$) зростав при їх просуванні від головки до хвоста придатка. Водночас в епідидимальній рідині рівень протеїнів зменшувався з 3,5 до 1,8 мг/мл ($P \leq 0,05$) при просуванні від головки до хвостової частини. Зі спермальних мембран було екстраговано протеїнів більше від сперміїв, які були в хвостовій частині придатка, ніж від тих, які перебували у тілі чи головній частині придатка. Суттєве зростання вмісту протеїнів у сперміях при їх просуванні з головки до хвостової частини придатка сім'яника вказує на абсорбцію протеїнів сперміями з епідидимальної рідини [15].

Функція придатків сім'яників самців ссавців для сперміїв може бути поділена на декілька загальних категорій: концентрування сперміїв, які утворюються; функціональне дозрівання; зберігання в неактивному (нерух-

ливому) стані до еякуляції; усунення дегенерованих чи мертвих сперміїв; забезпечення сприятливих умов для збереження сперміїв живими; транспорт міоїдними клітинами; захист; підтримування кров'яного епідидимального бар'єру. Дослідники фокусують увагу на змінах впродовж дозрівання сперміїв, що стосуються інтегральних протеїнів плазматичної мембрани сперміїв, які безпосередньо забезпечують взаємодію між спермієм та яйцеклітиною. Традиційно вважалося, що зміни у протеїнах плазматичної мембрани сперміїв обмежуються простим зв'язуванням чи усуненням протеїнів або взаємодією з присутніми протеазами, глікозилазами чи глікотрансферазами. Проте придаток сім'яника може також вивільняти секреторні продукти через апікальні міхурці та ін'єктувати інтегральні мембранні протеїни з епідидимусомами, які з'єднуються з плазматичною мембраною. Придаток також активує розщеплення низки ензимів, присутніх на мембрані сперміїв, сприяючи модифікації ними протеїнів на спермальній мембрані [37]. Просування та перебування сперміїв у придатку у кнурів може тривати до 13 діб. Найбільше часу займає перебування у хвостовій частині придатка [45].

Низка дослідників пов'язують зміни у складі мембранних ліпідів, протеїнів та іонів з обміном між екстра- та інтрацелюлярним середовищем сперміїв, що спостерігається при епідидимальному транзиті [24, 71, 57]. Цілісність плазматичної мембрани сперміїв є необхідною умовою для перебігу метаболізму в спермії та збереження їхніх функцій [27], проте дозрівання епідидимальних сперміїв охоплює значні зміни в певних зонах мембрани, насамперед внаслідок модифікації в її білковому складі. Деякі з цих модифікацій пов'язані чи випливають з дуже специфічних протеолітичних процесів, які призводять до зникнення чи перерозподілу протеїнів між різними зонами мембрани сперміїв [47].

Встановлено, що у кнурів низка протеїнів, які секретує слизова оболонка придатку сім'яників, зв'язуються з мембраною сперміїв під час їхнього перебування в ньому і залишаються на ній аж до процесу запліднення [12]. Епідидимальні протеїни можуть змінювати характеристики спермальної мембрани сперміїв внаслідок обміну протеїнами між спермії і навколишнім середовищем і зміною складу протеїнів мембрани. Цей епідидимальний вплив досягається завдяки протеїнам з транспортною здатністю зв'язуватися з мембраною чи протеїнам з ензимною активністю. Кілька протеїнів — таких, як клустерин чи холестеролзв'язаний протеїн, який був ідентифікований у самців багатьох видів тварин, входить в гідрофобну зв'язуючу активність. Протеїн клустерин є протеїном, який найбільше секретується в епідидимус і становить 25–30 % від загальної секреції протеїнів придатку у кнурів [72]. Моношар епітеліальних клітин з придатка сім'яників за інкубації зі спермії кнура, взятими з придатка *in vitro*, створює сприятливе середовище для виживання та рухливості останніх [5]. Епітеліальні клітини з різних частин придатка сім'яника мають властивість синтезувати протеїни, які позитивно впливають на спермії [80, 72], а культури епідидимальних клітин мають такий самий позитивний вплив на рухливість сперміїв і цілісність мембрани внаслідок секреції протеїнів та взаємодій з епітеліальними клітинами придатку. Також встановлено низку глікопротеїнів, які синтезуються в епідидимусі і абсорбуються поверхнею плазматичної мембрани сперміїв [13, 25, 34].

Епідидимальна секреція протеїнів призводить до початку специфічних змін дозрівання сперміїв, необхідних для запліднення [5]. Це відкриття призвело дослідників до фокусування на протеїнах плазматичної мембрани і епідидимальної рідини, їх змін протягом епідидимального транзиту, механізму цих змін і їхнього впливу на плодючість тварин. Також дослідниками було встановлено, що головні протеїни епідидимальної рідини дуже різні в різних ділянках придатку сім'яника [24, 13].

Глікопротеїни є одними з найважливіших сполук, синтезованих і секретованих епітеліальними клітинами придаткових статевих залоз самців ссавців, які відіграють важливу роль у процесах запліднення. Серед придаткових статевих залоз кнурів міхурцеві залози дуже розвинені і секретують 80–90 % загальних протеїнів сім'яної плазми, але деякі дослідники встановили, що в них є різні цукрові залишки глікопротеїнів. Біохімія лецитину по-

казує, що міхурцеві залози кнурів синтезують і активно секретують: N- та O-глікопротеїни з фукозою, N-ацетилгалактозамін, β-D-галактоза-β1→3-D-N-ацетилгалактозамін, манозу, галактоза-β1→4- N-ацетилглюкозамін, D-N-ацетилглюкозамін та нейромінові кислі залишки. Фукоза, маноза, N-ацетилгалактозамін, галактоза, N-ацетилглюкозамін та нейрамінові кислі залишки зазвичай присутні в інтегрованих у спермії протеїнах, які також називаються спермадгезинами; ці протеїни мають важливі значення у взаємодіях гамет, капацитації сперміїв та реакціях імуномодуляції. Обидва α- та β-D-N-ацетилгалактозаміну залишки можуть також бути присутні в муринових глікопротеїнах. Зв'язані олігосахариди роблять ці протеїни надзвичайно стійкими до протеолізу, що може відбуватися у сім'яній плазмі, та постачають змазку епітеліальній поверхні, захищаючи її від мікробної агресії [4].

Рідина придатка також містить такі ензими, як лактатдегідрогеназа, гліколітичні і амінотрансферази, які включені у цитоплазматичні краплі чи вивільняються протягом дегенеративних процесів за старіння сперміїв. Більшість протеїнів, які синтезуються і виділяються завдяки придатку, перебувають під контролем стероїдних гормонів [55, 9].

Протеїни плазми сперми та їхній зв'язок з якісними показниками сперміїв самців ссавців. Протеїни, синтезовані у придатку сім'яника, виділяються зі сперміями при еякуляції і є складниками плазми сперми, яка є для них міжклітинним середовищем, що важливо для підтримання процесів життєдіяльності у сперміях та набування ними змін, необхідних для підготовки їх до запліднення та проведення самого запліднення. У спермі самців тварин та чоловіків плазма сперми виконує функцію антиоксидантного захисту і містить значну кількість антиоксидантів, які захищають спермії від окиснювального стресу, компенсуючи нестачу ендоплазматичних ензимів [49]. Функція протеїнів плазми сперми охоплює їхню участь в регуляції капацитації, створенні резерву сперми в яйцепроводах, модуляції імунної відповіді матки і транспорті сперми у статевих шляхах самок, а також взаємодії і злитті гамет [76]. Протеїни спермальної плазми мають широку дію, а деякі з них є відповідальними за запліднення. Загальна кількість протеїнів у плазмі сперми кнурів становить 30–60 г/л, чоловіків — 25–55 г/л [59].

Реакції фосфорилювання та дефосфорилювання, які каталізуються кіназами і фосфатазами, відіграють важливу роль у процесах запліднення у ссавців. Плазма сперми кнурів характеризується високою активністю кислої фосфатази. Кисла фосфатаза, ізольована з рідини сім'яних міхурців, має високу каталітичну активність до фосфотирозину і олігопептиду — сполук, які містять залишки фосфотирозину [84]. У кнурів завдяки фосфориляції та дефосфориляції низькомолекулярні протеїни сім'яної плазми утворюють комплекси і фосфопротеїни масою 55 та 68 кДа, що за об'єднання зі сперміями сприяють прояву їхніх біологічних властивостей [83]. Додавання плазми сперми до капацитованих сперміїв зменшувало рівень фосфорилювання тирозину протеїнів у спермі чоловіків і баранів [46, 75].

Особливо низький вміст протеїнів відмічено у сперміях відразу після еякуляції та розбавлення свіжоотриманої сперми. Набування сперміями стійкості до холодового шоку після інкубації за кімнатної температури низка дослідників пояснюють адсорбцією протеїнів плазми сперми мембранами сперміїв [11, 42, 43, 85]. Зміни, які відбуваються в інкубованих сперміях за набування ними стійкості до холодового шоку, остаточно нез'ясовані. Холодовий шок сперміїв під час охолодження чи заморожування здебільшого пов'язують зі змінами в ліпідному складі мембрани [81]. Внаслідок різних температур плавлення окремих ліпідних компонентів мембран сперміїв частини мембрани можуть за охолодження роз'єднуватися, що призводить до механічного руйнування протеїнів клітинних мембран, змінюючи їхню структуру і проникність [16, 6, 58].

Спермії кнура набували стійкості до холодового шоку після інкубації *in vitro* за температури 30 °C. На розвиток стійкості сперми до холодового шоку протягом інкубації впливали ступінь розбавлення та pH розбавника. Крім того, спермії у цільному еякуляті були чутливішими до холодового шоку порівняно зі сперміями, взятими та інкубованими у другій,

спермонасиченій, багатій білковими сполуками фракції еякуляту [51, 53].

Для стійкості сперміїв до впливів зовнішнього середовища має значення також і вміст протеїнів у плазматичній мембрані та синтетичному середовищі для зберігання сперми, незважаючи на те, що їхній вміст в мембранах набагато нижчий порівняно з вмістом ліпідів. Це тому, що мембранні протеїни стійкіші до зниження температури, ніж ліпіди, і за зростання співвідношення протеїнів до ліпідів у мембранах сперміїв виявлене відчутне зниження негативної дії на них низьких температур [44, 8]. При капацитації сперміїв, яка за природного парування проходить у статевих шляхах самок, відбувається реорганізація мембранних протеїнів [82].

Встановлено, що чутливість сперміїв кнура до охолодження зростала зі збільшенням ступеня розбавлення від 1:2 до 1:10, що відмічено за вивчення впливу ступеня розбавлення, вмісту плазми сперми та складу середовища для розрідження сперми на чутливість сперматозоїдів до холодового шоку і набування стійкості до охолодження впродовж 30 хв інкубації, яку оцінювали за морфологією акросоми і рухливістю сперміїв. Крім того, спермії при ступені розбавлення сперми 1:6 і 1:10 перед інкубацією виявилися чутливішими до холодових пошкоджень, ніж спермії у спермі, розбавленій 1:2 перед інкубацією, а тоді додатково розбавленій після інкубації до ступеня 1:6 чи 1:10 і безпосередньо перед холодовим ударом. Спермії, перед інкубацією відмиті від плазми сперми, виявилися стійкішими до охолодження після 5-годинної інкубації, ніж після 1-годинної інкубації. Це вказує на те, що набування стійкості до охолодження протягом інкубації є також і внутрішньою здатністю сперміїв. Проте плазма сперми надавала сперміям кнура додаткового захисту від пошкодження холодом. Заміщення сім'яної плазми трис-лактозним розбавником з вмістом від 2 до 4 % казеїну захищало акросоми сперміїв від пошкодження охолодженням, але не зменшувало несприятливої дії холоду на рухливість сперміїв [52].

Дослідженнями сперми кнурів з визначенням впливу часу інкубації за кімнатної температури, складу розріджувача і ступеня розбавлення на цілісність акросоми і рухливість сперміїв під час зберігання сперми за 5 °С встановлено, що зберігання нативної сперми за температури 24–26 °С від 1,25 до 7,25 год перед охолодженням збільшувало кількість сперміїв з непошкодженою акросомою і їхню рухливість протягом зберігання за температури 5 °С порівняно зі спермою, яку інкубували за температури 24–26 °С впродовж 0,25 год перед розбавленням і охолодженням. Оптимальним часом інкубування сперми кнурів за кімнатної температури виявився період близько 6 год. Глюкозо-жовтково-бікарбонатний розбавник (глюкоза, бікарбонат натрію, яєчний жовток) завдяки білковим сполукам яєчного жовтка забезпечував цілісність акросоми і рухливість сперміїв краще, ніж розбавники BL1 (глюкоза, цитрат натрію дигідрат, бікарбонат натрію, хлорид калію) і BL2 (глюкоза, трис, моногідрат цитринової кислоти) за умови однакового вмісту антибіотиків у середовищах. Не було суттєвих відмінностей між розрідженням 1:3 та 1:6 за розбавлення сперми глюкозо-жовтково-бікарбонатним середовищем після інкубації за кімнатної температури від 4,25 до 7,25 год. Розбавлення сперми цим середовищем впродовж інкубаційного періоду не покращувало показник цілісносності акросоми сперміїв та їх рухливості протягом зберігання за 5 °С, що вказує на головну роль протеїнів плазми порівняно з протеїнами середовища [54].

Було встановлено негативну кореляцію ($P<0,001$) між ступенем розбавлення сперми кнурів і параметрами рухливості сперміїв та зниження рухливості сперміїв внаслідок зменшення їхньої кількості у дозі. Спермодоза з $1,1\times10^9$ клітин мала нижчий відсоток рухливих сперміїв після 72 год зберігання, ніж доза з $2,2\times10^9$ клітин. У дозі з вмістом $0,6\times10^9$ клітин суттєве зниження відбувалося вже після 24 год інкубування. Це пояснюється зниженням загальної концентрації протеїнів у спермодозі від початкової величини у сім'яній плазмі. Ступінь її розбавлення також корелював ($P<0,05$) з рухливістю сперміїв до 168 год зберігання; це свідчить, що розбавлення компонентів сім'яної плазми є критичним для високого ступеня розбавлення сперми [7].

За центрифугування та промивання сперми чоловіків у міжспермальному середо-

вищі значно зменшується рівень протеїнів плазми сперми. Це й було основною причиною збільшення рівня продукування активних форм кисню і перебігу процесів пероксидації, особливо при повторних циклах, які застосовуються для підготовки сперми до замороження, що може спричинити значне зниження рухливості сперміїв і фрагментацію ДНК [49].

Протеїни сім'яної плазми здатні взаємодіяти з піхвовим, шийковим, матковим секретами та епітелієм для ініціації ряду змін в імунній реактивності самок [48, 60, 62, 63].

Значення протеїнів середовищ для розбавлення і зберігання сперми у підтриманні якісних показників сперміів. Адсорбовані протеїни сприяють зміні співвідношення протеїнів до ліпідів у плазматичній мембрані сперміів самців і, відповідно, підвищенню їхньої стійкості за охолодження. Тому одним з методів, який застосовується для корекції величини співвідношення протеїнів до ліпідів у плазматичних мембранах сперміів самців тварин і чоловіків, є включення до складу синтетичних середовищ для розбавлення сперми протеїнів, пептидів чи амінокислот, які були б здатні утворювати комплекси з компонентами мембран сперміів. Сірковмісні амінокислоти, зокрема цистин, відіграють важливу роль у стабілізації просторової форми білкової молекули, зв'язуючи її дисульфідними зв'язками [30]. Додавання глутатіону або цистеїну до розбавленої до 1:5 сперми кнура покращувало виживання сперміів впродовж зберігання та проникнення сперміів в яйцеклітину за проведення процедури запліднення *in vitro* [21]. Додавання L-цистеїну гідрохлориду до середовища для зберігання сперми кнурів у кількості 200 мг/л показало позитивний вплив на виживаність сперміів та цілісність ДНК [73]. У свою чергу, цистеїн та N-ацетил-цистеїн є попередниками внутрішньоклітинного біосинтезу глутатіону [39]. Тому додавання глутатіону, цистеїну і гіпотаурину до середовища для розбавлення і зберігання сперми може збільшувати термін її виживання, зберігання цілісності акросоми та проникнення сперматозоїдів у яйцеклітину при заплідненні *in vitro*. Додавання до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів 1,27 мМ гідрохлориду цистеїну зберігало структуру хроматину сперміів. За *in vitro* витримки сперміів чоловіка, бугая чи кнура у середовищі з синтетичним пептидом, утвореним з 60 амінокислот, було отримано збільшення відсотку зв'язування сперміів з оболонкою яйцеклітини, тобто вони мали би мати більшу запліднюючу здатність, зокрема і після кріоконсервування [2]. Введення глутатіону та глутатіонтрансферази у середовище для культивування сперміів дало зниження рівня продукування пероксидів і альдегідів та сповільнило рівень апоптозу, що сприяло кращому її збереженню [1, 56]. За введення в середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» бичачого сироваткового альбуміну (БСА) у поєднанні з цистеїном, цистином, метіоніном чи глутатіоном на третій день інкубування отримано на 14–29 % вищу активність сперміів, ніж у контролі [35]. Тому важливе місце серед сполук білкової природи, які вносять у середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів, займають сірковмісні амінокислоти та протеїни з високим вмістом цих сполук або амінокислоти, що містять сульфгідрильні групи, які допомагають стабілізувати мембрану сперміів під час зберігання і охолодження та запобігають ранній капацитації [33].

Використання білкових сполук у кріоконсервуванні сперми. Значне зниження запліднювальної здатності сперміів самців ссавців після замороження і розмороження також пов'язується з суттєвим зменшенням вмісту сірковмісних амінокислот у сперміях внаслідок цієї процедури, тоді як додавання глутатіону до середовища для відтавання сперми кнурів поліпшувало її запліднювальну здатність [22, 23]. Також встановлено, що фосфорилювання акросомального протеїну сперміів кнурів залежить від рівня холодового пошкодження сперміів. Включення глутатіону у розріджувач для сперми кнурів підвищує рухливість і виживаність сперміів після розмороження [22, 23]. Додавання 10 і 20 % плазми сперми до розмороженої сперми кнурів спричинило помітне зменшення відсотку капацитованих сперміів. Такий вплив не проявлявся за використання середовищ з яєчним жовтком [78, 79].

Вплив протеїнів статевих шляхів самок на якість сперміів. Відомо, що у статевих

шляхах самок ссавців введена сперма може зберігати здатність до запліднення протягом кількох днів [30, 61, 64]. В яйцепроводах самок ссавців на апікальній поверхні плазматичної мембрани виявлено протеїн, який зв'язується зі сперміями, а за його додавання у плазму сперми підвищується виживання спермиїв. Цей вплив є дозозалежним, тобто зі збільшенням вмісту протеїну підвищується виживання спермиїв у вказаному середовищі. Автори зробили висновок про те, що цей протеїн є частиною біологічного механізму забезпечення виживання спермиїв в яйцепроводах [18]. Показано також дозозалежне посилення життєздатності сперми кнурів завдяки розчинній фракції протеїнів апікальної плазматичної мембрани. Проте цей позитивний вплив не проявлявся після додавання денатурованих протеїнів [17, 20, 29]. Також встановлено, що епітеліальні клітини яйцепроводів здатні синтезувати протеїн, що зумовлює зменшення рухливості та прискорює підвищення внутрішньоклітинного pH сперматозоїдів [26, 65].

Висновки

Отже, з наведених даних можна зробити висновок про важливість та фізіологічну роль білкових компонентів у плазмі сперми ссавців у сперміогенезі та механізмах запліднення яйцеклітини. Якість та кількість спермопродукції прямо пропорційно корелює з рівнем і складом протеїнового живлення самців ссавців. Від рівня секреції протеїнів придатком сім'яника та наявності їх у плазмі сперми залежить якість, життєздатність та запліднювальна здатність еякульованих спермиїв. Також наявність компонентів білкової природи є важливою для розбавлення, зберігання в рідкому стані, кріоконсервування та розмороження сперми самців ссавців.

1. Agostinellia E., Przybytkowskib E., Averill-Batesb D. Glucose, glutathione and cellular response to spermine oxidation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, vol. 20, issue 5, pp. 649–656. DOI: 10.1016/0891-5849(95)02149-3.

2. Amann R. P., Hammerstedt R. H., Shabanowitz R. B. Exposure of Human, Boar, or Bull Sperm to a Synthetic Peptide Increases Binding to an Egg-Membrane Substrate. *Journal of Andrology*, 1999, vol. 20, no. 1, pp. 34–41. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1999.tb02493.x.

3. Arangasamy A., Singh L. P., Ahmed N., Ansari M. R., Ram G. C. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma protein and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*., 2005, vol. 90, issue 3–4., pp. 243–254. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.12.014.

4. Badia E., Pinart E., Briz M. D., Pastor L. M., Sancho S., Garcia-Gil N., Kadar E., Bassols J., Pruneda A., Coll M. G., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S. Lectin histochemistry of boar vesicular glands. Abstracts. *Theriogenology*, 2005, vol. 63, no. 2, pp. 366–367.

5. Bassols J., Kádár E., Briz M., Pinart E., Sancho S., Garcia-Gil N., Badia E., Pruneda A., Bussalleu E., Yeste M., Casas I., Dacheux J. L., Bonet S. Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures. Evaluation of boar sperm maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 2005, vol. 64, issue 9, pp. 1995–2009. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.027.

6. Belous A. M., Bondarenko V. A. Structural changes in biological membranes upon cooling. Kyiv, Naukova Dumka, 1982, 256 p. (in Russian)

7. Bößenrodt K., Müller K., Stähr B. Effect of an increasing dilution rate on *in vitro* quality of liquid preserved boar semen. *Theriogenology*, 2008, vol. 70, issue 8, pp. 1392–1393. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.055.

8. Brandts J. F. Heat effects on protein and enzymes. In: *Theriogenology*. London, Acad. Press, 1967, pp. 25–72.

9. Chauvin T. R., Criswold M. D. Androgen-regulated genes in the murine epididymis. *Biology of Reproduction*, 2004, vol. 71, issue 2, pp. 560–569. DOI: 10.1095/biolreprod.103.026302.

10. Cheema S., Bansal A. K., Bilaspuri G. S., Gandotra V. K. Correlation on between the protein profile(s) of different regions of epididymis and their contents in goat buck. *Animal Science Papers and Reports*, 2011, vol. 29, no. 1. pp. 75–84.

11. Crabo B. G. Post-testicular sperm maturation and its importance to deep freezing of boar semen. Proc. 1st Intern. Conf. On Deep Freezing of Boar Semen, Upsala, 1985, pp. 17–37.

12. Dacheux F., Oble S., Venien A., Dacheux J. L. Purification and localization of a 27 kDa epididymal glycoprotein of the boar sperm surface. In: Bacetti B., ed. *Comparative spermatology 20 years after*. Raven Press, 1992, pp. 465–469.

13. Dacheux J. L., Castella S., Gatti J. L., Dacheux F. Epididymal cell secretory activies and the role of protein in boar sperm maturation. *Theriogenology*, 2005, vol. 63, issue 2, pp. 319–341. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.015.

14. Dacheux J. L., Dacheux F. Protein secretion in the epididymis. Ed. by B. Robaire, B. T. Hinton. *The epididymis: From Molecules to clinical practice: A comprehensive*. Survey of the Efferent Ducts. The Epididymis and the Vas Deferents, New York, Kluwer Academice, Plenum Publishers, 2002, pp. 151–168.

15. Dacheux J. L., Gatti J. L., Castella S., Metayer S., Fouchecourt S., Dacheux F. The epididymal pro-

teome. In: Hinton B., Turner T., eds. *Epididymis III: the third international conference on the epididymis*. Charlottesville, Virginia, The Van Doren Company, 2003, pp. 115–122.

16. De Leeuw F. E., Colenbrander B., Vekleij A. J. The role membrane damage plays in cold shock and fertility injury. *Reprod. Domest. Anim.*, 1990, suppl. 1, pp. 95–104.

17. Elliott R. M. A., Duncan A., Watson P. F., Holt W. V., Fazeli A. R. Peripheral bound membrane proteins are involved the maintenance of boar sperm viability by oviductal apical plasma membrane preparations *in vitro*. *Molecular Biology of the cell*, 2001, vol. 12, p. 117a.

18. Elliott R. M. A., Lloyd R. E., Fazeli A., Sostaric E., Georgiou A. S., Satake N., Watson P. F., Holt W. V. Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein on boar and bull spermatozoa. *Reproduction*, 2009, vol. 137, issue 2, pp. 191–203. DOI: 10.1530/REP-08-0298.

19. Eriksson B. M., Peterson H., Rodríguez-Martínez H. Field Fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*, 2002, vol. 58, issue 6, pp. 1065–1079. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)00947-0.

20. Fazeli A. R., Elliott R. M. A., Duncan A. F., Moore A., Watson P. F., Holt W. V. *In vitro* maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations. *Reproductions*, 2003, vol. 125. no. 4, pp. 509–517. DOI: 10.1530/reprod/125.4.509.

21. Funahashi H., Sano T. Select antioxidant improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. *Theriogenology*, 2005, vol. 63, issue 6, pp. 1605–1616. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.06.016.

22. Gadea J., Sellés E., Marco M. A., Coy P., Matás C., Romar R., Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced gluthatione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 2004, vol. 62, issue 3–4, pp. 690–701. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2003.11.013.

23. Galantino-Homer H., Modelski M., Dobrinski I. A quantative biochemical marker for cold shock damage to porcine sperm. *Theriogenology*, 2008, vol. 70, issue 3, p. 577. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.05.013.

24. Gatti J.-L., Castella A. F., Dacheux F., Ecroyd H., Métayer S., Thimon V., Dauchex J.-L. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, 2004, vol. 82–83, pp. 321–339. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.05.011.

25. Gatti J. L., Druart X., Syntin P., Gúerin Y., Dacheux J.-L., Dacheux F. Biochemical characterization of two ram cauda epididumal maturation-dependent sperm glycoproteins. *Biol. Reprod*., 2000, vol. 62, issue 4, pp. 950–958. DOI: 10.1095/biolreprod62.4.950.

26. Georgiou A. S., Sostaric E., Wong C. H., Snijders A. P., Wright P. C., Moore H. D., Fazeli A. Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Molecular and cellular proteomics*, 2005. vol. 4, no. 11, pp. 1785–1796. DOI: 10.1074/mcp.M500119-MCP200.

27. Harrison R. A. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *Journal of Reprod. Fertil. Suppl*., 1997. vol. 52, pp. 195–211.

28. Hinton B. T., Pallaino M. A., Rudolph D., Cabus J. C. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 1995, vol. 7, no. 4, pp. 731–745. DOI: 10.1071/RD9950731.

29. Holt W. V., Elliott R. M. A., Fazeli A., Satake N., Watson P. F. Validation of an experimental strategy for studying surface-exposed protein involved in porcine sperm oviduct contact interactions. *Reproduction, Fertility and Development*, 2005, vol. 17, no. 7, pp. 683–692. DOI: 10.1071/RD05070.

30. Holt W. V., Elliott R. M. A., Fazeli A., Sostaric E., Georgiou A. S., Satake N., Rathalincam N., Watson P. F. Harnessing biology of the oviduct for the benefit of artificial insemination. *Society of Reproduction and Fertility*, 2006, vol. 62, pp. 247–259.

31. Huang S. Y., Kuo Y. H., Lee Y. P., Tsou H. L., Lin. E. C., Ju C. C., Lee W. C. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Animal Reproduction Science*, 2000, vol. 63, issue 3–4, pp. 231–240. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00175-5.

32. Huo L. J., Yue K. Z., Yang Z. M. Characterization viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during *in vitro* storage at different ambient temperatures. *Reprod. Fertil. Dev*., 2002, vol. 14, no. 8, pp. 509–514. DOI: 10.1071/RD02035.

33. Johnson L. A., Weitze K. F., Fiser P., Maxwell W. M. C. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci*., 2000, vol. 62, issue 1–3, pp. 143–172. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00157-3.

34. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev. Reprod*., 1998, vol. 3, no. 2, pp. 86–95. DOI: 10.1530/ror.0.0030086.

35. Kornyat S. B. Sperm activity after addition to boar sperm extender organic sulfur-containing compounds. *Scientific herald "Ascania-Nova"*, 2012, issue 5, part 2, pp. 248–252. (in Ukrainian)

36. Leninger A. *Fundamentals of Biochemistry*. In 3 vol. vol. 1, Moscow, Mir, 1985, 367 p. (in Russian)

37. Marengo S. R. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science*, 2008, vol. 105, issue 1–2, pp. 52–63. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.018.

38. Meister A., Anderson M. E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 1983, vol. 52. pp. 711–760. DOI: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.

39. Meister A., Tate S. S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu. Rev. Biochem.*, 1976, vol. 45, pp. 559–604. DOI: 10.1146/annurev.bi.45.070176.003015.

40. Melnyk Yu. F. *Instruction on artificial insemination of pigs*. Kyiv, Agrarian Science, 2003, 56 p. (in Ukrainian)

41. Milovanov V. K. *Biology of reproduction and artificial insemination of animals*. Moscow, Publ. of agricultural literature, magazines and posters, 1962, 696 p. (in Russian)

42. Moore H. D. M., Hibbitt K. G. Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence seminal vesicular proteins. *J. Reprod. Fertil.*, 1977, vol. 50, no. 2, pp. 349–352. DOI: 10.1530/jrf.0.0500349.

43. Moore H. D. M., Hibbitt K. G. The binding of labeling basic proteins by boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 1976, vol. 46, no. 1, pp. 71–76. DOI: 10.1530/jrf.0.0460071.

44. Nauk V. A. *Structure and functions of sperm of agricultural animals in cryopreservation*. Kishinev, Shtiinca, 1991, 200 p. (in Russian)

45. Olson G. E., Nagdas S. K., Winfrey V. P. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: Robaire B., Hinton B. T., eds. *The epididymis: From Molecules to clinical practice: A comprehensive survey of the Efferent Ducts*. The Epididymis and the Vas Peferents, New York, Kluwer Academice, Plenum Publishers, 2002, pp. 371–387.

46. Pérez-Pé R., Grasa P., Fernández-Juan M., Peleato M. L., Cebrián-Pérez J. Á., Muiño-Blanco T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold shocked ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, vol. 61, issue 2, pp. 226–233. DOI: 10.1002/mrd.1152.

47. Phelps B. M., Koppel D. E., Primakoff P., Myles D. G. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J. Cell. Biol.*, 1990, vol. 111, no. 5, pp. 1839–1847. DOI: 10.1083/jcb.111.5.1839.

48. Poiani A. Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecol. and Sociol.*, 2006, vol. 60, issue 3, pp. 289–310. DOI: 10.1007/s00265-006-0178-0.

49. Potts R. J., Notarianni L. J., Jefferies T. M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat. Res*., 2000, vol. 447, issue 2, pp. 249–256. DOI: 10.1016/S0027-5107(99)00215-8.

50. Pruneda A., Pinart E., Briz M. D., Sancho S., Bussalleu E., Yeste M., Casas I., Fàbrega A., Barrera X., Mas G., Bonet S. Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of Pietrain boars. *Theriogenology*, 2008, vol. 70, issue 8, p. 1387. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.044.

51. Pursel V. G., Johnson L. A., Rampacek G. B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci*., 1972, vol. 34, issue 2, pp. 278–283. DOI: 10.2527/jas1972.342278x.

52. Pursel V. G., Johnson L. A., Schulman L. L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci*., 1973, vol. 37, issue 2, pp. 528–531. DOI: 10.2527/jas1973.372528x.

53. Pursel V. G., Johnson L. A., Schulman L. L. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci*. 1972, vol. 35, issue 3, p. 580–584. DOI: 10.2527/jas1972.353580x.

54. Pursel V. G., Schulman L. L., Johnson L. A. Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5 °C. *J. Anim. Sci*., 1973, vol. 37, issue 3, pp. 785–789. DOI: 10.2527/jas1973.373785x.

55. Raeside J. L., Christie H. L., Renaud R. L. Androgen and estrogen metabolism in the reproductive tract and accessory sex gland of the domestic boar (*Sus scrofa*). *Biol. Reprod*., 1999, vol. 61, issue 5, pp. 1242–1248. DOI: 10.1095/biolreprod61.5.1242.

56. Rao A. V., Shaha C. Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. *Free Radic. Biol. Med*., 2000, vol. 29, issue 10, pp. 1015–1027. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00408-1.

57. Robaire B., Hermo L. Efferents ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press, 1988, pp. 999–1089.

58. Robertson L., Watson P. F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J. Reprod. Fertil*., 1986, vol. 77, no. 1, pp. 177–185. DOI: 10.1530/jrf.0.0770177.

59. Rodríguez-Martínez H., Kvist U., Ernerudh J., Sanz L., Calvete J. J. Seminal plasma proteins: what role do they play? *American Journal of Reproduction Immunology*, 2011, vol. 66, issue s1, pp. 11–22. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x.

60. Rodríguez-Martínez H., Kvist U., Saravia F., Wallgren M., Roca J., Vazquez I. M., Calvete J. J. The physiological roles of the boar ejaculate. In: H. Rodríguez-Martínez, J. L. Vallet, A .J. Ziecik (eds.). *Control of Pig Reproduction*. VIII, Nottingham, UK, Nottingham University Press, 2009, pp. 1–21.

61. Rodríguez-Martínez H. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 2007, vol. 68, suppl. 1, pp. S138–S146. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.03.018.

62. Rodríguez-Martínez H., Saravia F., Wallgren M., Martinez E. A., Sanz I., Roca J., Vazquez I. M., Calvete J. J. Spermadhesin PSP-I / PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *Journal of Reprod. Immunol*., 2010, vol. 84, issue 1, pp. 57–65. DOI: 10.1016/j.jri.2009.10.007.

63. Rodríguez-Martínez H., Saravia F., Wallgren M., Roca J., Peña F. J. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 2008, vol. 70, issue 8, pp. 1242–1250. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.007.

64. Rodríguez-Martínez H., Saravia F., Wallgren M., Tienthai P., Johannisson A., Vázquez J. M., Martínez E., Roca J., Sanz I., Calvete J. J. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 2005, vol. 63, issue 2, pp. 514–535. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.028.

65. Satake N., Elliott R. M. A., Watson P. F., Holt W. V. Sperm selection and competition in pigs may by medi-

ated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *Journal of Experimental Biology*, 2006, vol. 209, part 8, pp. 1560–1572. DOI: 10.1242/jeb.02136.

66. Shostya A. M. Role of active oxygen forms in spermatogenesis regulation and fertilization in mammals. *Ukrainian Biochemistry Journal*, 2009, vol. 81, no. 1, pp. 14–22. (in Ukrainian)

67. Singleton W. L. State of art in artificial insemination of pigs in the United States. *Theriogenology*, 2001, vol. 56, issue 8, pp. 1305–1310. DOI: 10.1016/S0093-691X(01)00631-8.

68. Strzeżek J., Frazer L., Kuklińska M., Dziekońska A., Lecewicz M. Effect of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidant on biochemical characteristics of boar semen. *Reproductive Biology*, 2004, vol. 4, no. 3, pp. 271–287.

69. Strzeżek J., Lapkiewicz S., Lecewicz M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim. Sci. Papers Rep.*, 1999, vol. 17, no. 4, pp. 181–188.

70. Strzeżek J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reproductive Biology*, 2002, vol. 2, no. 3, pp. 243–266.

71. Sullivan R., Saez L., Girouard J., Frenette G. Role of exosome in sperm maturation during the transit along the male reproduction tract. *Blood Cells Molecular Discovery*, 2005, vol. 35, issue 1, pp. 1–10. DOI: 10.1016/j.bcmd.2005.03.005.

72. Syntin P., Dacheux F., Druart X., Gatti J. L., Okamura N., Dacheux J. L. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol. Reprod*., 1996, vol. 55, issue 5, pp. 956–974. DOI: 10.1095/biolreprod55.5.956.

73. Szcześniak-Fabiańczyk B., Bochenek M., Smorąg Z., Ryszka F. Effect of antioxidant added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reproductive Biology*, 2003, vol. 3, no. 1, pp. 81–87.

74. Ting-Kai L. I. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 1975, vol. 12, issue 5, pp. 641–646. DOI: 10.1095/biolreprod12.5.641.

75. Tomes C. N., Carballada R., Moses D. F., Katz D. F., Saling P. M. Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phospsorylation. *Mol. Hum. Reprod*., 1998, vol. 4, issue 1, pp. 17–25. DOI: 10.1093/molehr/4.1.17.

76. Töpfer-Petersen E., Ekhlasi-Hundrieser M., Kirchhoff C., Leeb T., Sieme H. The role of stallion seminal plasma proteins in fertilization. *Anim. Reprod. Sci*., 2005, vol. 89, issue 1–4, pp. 159–170. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.018.

77. Troedsson M. H., Desvousges A., Alghamdi A. S., Dahms B., Dow. C. A., Hauna I., Valesco R., Collahan P. T., Macpherson M. J., Pozor M., Buhi W. C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim. Reprod. Sci*., 2005, vol. 89, issue 1–4, pp. 171–186. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2005.07.005.

78. Vadnais M. L., Kirkwood R. N., Sprecher D. J., Chou K. Effect of extender, incubation temperature and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim. Reprod. Sci*., 2005, vol. 90, issue 3–4, pp. 347–354. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2005.02.007.

79. Vadnais M. L., Roberts K. P. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. *J. Androl*., 2007, vol. 28, issue 3, pp. 416–422. DOI: 10.2164/jandrol.106.001826.

80. Vreeburg J. T., Holland M. K., Cornwall G. A., Rankin T. L., Orgebin Crist M. C. Secretion of epididymal proteins and their interactions with spermatozoa. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy)*, 1991, vol. 75, pp. 171–173.

81. Watson P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: Rath D. Johnson L. A., Weitze K. F. (eds.). Boar Semen Preservation. III Proc. 3rd Int. Conf. Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, August, 1995, *Reprod. Domest. Anim*. Blackwell, Berlin, 1996, vol. 31, pp. 135–140.

82. Witte T. S., Shäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2007, vol. 102, no. 3–4, pp. 181–193. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2007.07.007.

83. Wysocki P., Strzeżek J. Preliminary studies on phosphoproteins of boar spermatozoa. *Article in Theriogenology*, 2005, vol. 63, pp. 365–366.

84. Wysocki P., Strzeżek J. Purification and characterization of a protein tyrosine acid phosphatase from boar seminal vesicle glands. *Theriogenology*, 2003, vol. 59, issue 3–4, pp. 1011–1025. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)01121-4.

85. Yashisa Y., Mutsuo O. Localization of the sperm coating antigen on boar spermatozoa. *Jap. J. Zootechn. Sci*., 1973, vol. 44, no. 1, pp. 75–78.