

## **АКТИВНІСТЬ ДЕКОНСЕРВОВАНОЇ СПЕРМИ БАРАНІВ, ЗАМОРОЖЕНОЇ У РОЗРІДЖУВАЧАХ З РІЗНИМ ВМІСТОМ ЖОВТКА**

**І. В. Лобачова**, кандидат сільськогосподарських наук,  
старш. наук. співроб.

ORSID: 0000-0001-5837-8530

Інститут тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова  
«Асканія-Нова» - Національний науковий селекційно-генетичний  
центр з вівчарства  
вул. Соборна, 1, смт Асканія-Нова, Каховський р-н,  
Херсонська обл., 75230, Україна  
e-mail: ascitsr\_priemnaya@ukr.net

Надійшла 29.04.2022

**Мета.** Дослідити активність та динаміку рухливості деконсервованої сперми баранів після її заморожування у розріджувачах з різним вмістом жовтка. **Методи.** По 0,5 мл кожного еякуляту послідовно у 2 етапи змішували з розріджувачами з утворенням кінцевої концентрації жовтка 2,5 і 10% (варіант 1) або 5 і 10% (варіант 2) за об'ємом. Розріджену сперму фасували у пайєти (0,25 мл), витримували 30 хвилин за температури 4–5 °С і заморожували у парах азоту за мінус 55–65 °С. Після відтавання вміст пайєти оцінювали за активністю і переносили у 1 мл розчину, склад якого повторював склад середовища першого етапу розрідження, але не містив кріопротектора. Активність деконсервованої сперми перевіряли кожну годину. **Результати.** Як для варіанту 1, так і для варіанту 2 зменшення кількості жовтка не вплинуло вірогідно на якість сперми після еквілібрації, але погіршило її здатність протистояти заморожуванню – показник активності після розморожування становив – 3,47±0,17 проти 2,42±0,14 бали (10% проти 2,5%) та 4,00±0,31 проти 2,80±0,38 (10% проти 5%) ( $p < 0,05$ ). Динаміка активності сперми, яка містила 10% жовтка, в процесі її наступної витримки демонструвала більш швидке падіння. Разом з тим, не спостережено суттєвої різниці у тривалості часу, протягом якого розморожені спермі проявляли ознаки руху між варіантами. **Висновок.** Зменшення концентрації

жовтка курячого яйця у розрідженій спермі баранів з 10% до 5 або до 2,5% призводить до вірогідного погіршення показника її активності після відтавання, але сприяє покращенню динаміки активності деконсервованої сперми баранів в процесі її наступної витримки.

**Ключові слова:** вівчарство, відтворення, сперма, кріоконсервація.

**DOI:** <https://doi.org/10.33694/2617-0787-2022-1-15-104-114>

UDC 636.32/.38:636.082.453.53

## **ACTIVITY OF RAM SPERM FROZEN IN SOLUTIONS WITH VARIOUS YOLK CONTENT AFTER THAWING**

**I. V. Lobachova**, Candidate of Agricultural Sciences,  
Senior Researcher

ORSID: 0000-0001-5837-8530

“Ascania Nova” Institute of Animal Breeding in the Steppe Regions  
Named after M. F. Ivanov - National Scientific Selection-Genetics  
Center for Sheep Breeding

1, Soborna Street, Askania Nova, Kakhovka district,  
Kherson region, 75230, Ukraine  
e-mail: [ascitsr\\_priemnaya@ukr.net](mailto:ascitsr_priemnaya@ukr.net)

**Purpose.** To investigate the activity and dynamics of motility of thawed ram sperm after freezing in diluents with different egg yolk content.

**Methods.** 0.5 ml of each ejaculate was mixed by 2 stages with 1.5 ml diluents to a final yolk concentration of 2.5 and 10% v/v (Var. 1) or 5 and 10% v/v (Var. 2). Diluted semen was packed in straws (0.25 ml), kept for 30 minutes at a temperature of 4–5 °C and frozen in nitrogen vapor at minus 55–65 °C. After thawing, the content of straws was evaluated for activity and mixed with 1 ml of solution, the composition of which repeated the composition of the medium of the first stage of dilution, but did not contain cryoprotectant. The activity of thawed semen was tested every hour. **Results.** For both variants, the reduction of yolk content did not significantly affect the quality of sperm after equilibration, but deteriorated its ability to resist freezing – the activity after thawing was – 3.47±0.17 vs. 2.42±0.14 points (for 10% vs. 2.5%) and 4.00±0.31 vs. 2.80±0.38 (for 10% vs. 5%) ( $p<0.05$ ). The dynamics of sperm activity, which contained 10% of the yolk, in the process of its subsequent storage showed a faster decline. However, there was no significant

*difference between variants in the length of time during which thawed spermatozoa showed signs of movement. **Conclusions.** Reducing the concentration of chicken egg yolk in diluted ram semen from 10% to 5 or 2.5% leads to a probable deterioration of its activity after thawing, but improves the dynamics of the activity of thawed sperm during its subsequent storage.*

**Keywords:** sheep breeding, reproduction, sperm, cryopreservation.  
**DOI:** <https://doi.org/10.33694/2617-0787-2022-1-15-104-114>

**Постановка проблеми.** Одним з напрямів удосконалення технології глибокого заморожування сперми є оптимізація складу розріджувачів, основним призначенням яких є оберігання клітин від пошкоджень холододовими чинниками. До речовин, що здатні зменшувати негативний вплив низьких температур, належать фосфоліпіди та ліпопротеїди з низькою щільністю [Medeiros S.M.O. et al., 2002; Purdy P.H., 2006], які в значній кількості містяться у яєчному жовтку, зібраному молоці, бобах сої тощо [Gil J. et al., 2003]. З перерахованих найбільш доступним є яєчний жовток, що обумовило його широке використання при компоновці криозахисних розчинів [Ptáček M. et al., 2018].

Поряд з речовинами, які впливають позитивно, яєчний жовток містить компоненти, що можуть діяти негативно. Так, деякі складові жовтка здатні реагувати з секретами бульбовидних залоз сперми, що мають тригліцилгліцерол-гідролазну активність, провокувати руйнування мембран і пригнічення рухливості сперміїв [Pellicer-Rubio M.T. and Combarous Y., 1998].

Для прояву захисної дії жовток за звичай додають до розчинів у кількості, за якої його кінцевий вміст у розрідженій спермі становить біля 10–20 % [Hafez B., Hafez E.S.E., 2000]. Але за високої концентрації вплив компонентів, що чинять негативний вплив, може перебільшити позитивну дію криопротектантів. Очевидним шляхом усунення цього є зниження концентрації жовтку у розріджувачі.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Багатьма дослідженнями показано позитивний вплив високих концентрацій жовтка на функціональні показники розмороженої сперми. Так, у роботі Far M.F. із співавт. найліпші результати рухливості демонстрували спермії баранів, які заморожували у розчині з 20 %-ним вмістом жовтка, у порівнянні з 10 та 15 %-ю концентрацією [Forouzan Far F. et al., 2007]. Спермії баранів після розрідження розчином з 20 відсотками жовтка виявили кращу активність після відтавання у порівнянні зі зразками, до яких додавали 5 %-й розчин

[Acharya M. et al, 2020]. Використання розріджувача з 20 %-ю концентрацією жовтка сприяла кращим показникам рухливості та життєздатності розморожених сперміїв цапів у порівнянні з 3%-ю [Mukul Anand et al., 2017].

В інших досліджах виявлено негативний вплив збільшеного вмісту жовтка. Так, при зберіганні розрідженої сперми баранів за температури 4 °C найкращі показники рухливості, життєстійкості та функціональної інтегрованості виявлено при 10 %-вій концентрації жовтка у порівнянні з 20 %-ю [Azizunnesa et al., 2014]. У досліджах Garde J.J. із співавторами зменшення вмісту жовтка у розріджувачі з 20 % до 5 % поліпшило індекс рухливості та цілісність акросом сперміїв газелі [Garde J.J. et al., 2008]. У досліді Stuart C.C. із співавт. заморожування сперми альпакі у розчині з 5%-м вмістом жовтка показало кращі результати після розморожування проти варіантів з 10 та 20 %-ю концентрацією. При цьому найгіршими були показники у зразків з найбільш високим вмістом жовтка [Stuart C.C. et al., 2019].

Кріозахисну дію жовтка пов'язують з присутністю ліпопротеїдів з низької щільності, що здатні приєднуватись до цитоплазматичної мембрани сперміїв і укріплювати її [Polge C. et al., 1970; Graham J.K., Foote R.H., 1987].

Негативний вплив жовтка пов'язують у першу чергу з присутністю в ньому ліпопротеїдів високої щільності, які здатні провокувати вихід холестеролу з мембран, зменшуючи кріостійкість останніх, а також ініціювати передчасну капацитацію та акросомну реакцію. Негативну дію може чинити і взаємодія жовтка з деякими компонентами сім'яної плазми. Так, фосфоліпаза A2, що міститься у нативній спермі і є продуктом секреції бульбоуретральних залоз, здатна гідролізувати фосфотидилхолін жовтка на жирні кислоти та лизофосфатидилхолін. Останній діє на мембрани як детергент і провокує їх розрідження [Upreti G.C. et al. 1999]. Є також дані, що компоненти жовтка здатні пригнічувати дихання сперміїв [Hu J.H. et al., 2011] і скорочувати її живучість.

У зв'язку з усім наведеним поставлено питання вивчити як позначиться зменшення концентрації жовтка у кріопротекторному розчині на кінетичні показники та дослідити живучість сперми баранів після її деконсервації.

**Мета.** Дослідити активність та динаміку рухливості деконсервованої сперми баранів після її заморожування у розріджувачах з різним вмістом жовтка та наступного розморожування і зберігання за фізіологічної температури.

**Матеріал і методика досліджень.** У досліді використано сперму дорослих баранів-плідників асканійської тонкорунної породи, яку одержували на штучну вагіну один раз на добу два рази на тиждень. Робота проведена у травні–червні.

Загальна процедура підготовки та заморожування сперми складалася з наступних етапів: 1) 0,5 мл свіжоотриманої сперми додавали 0,5 мл розчину першого етапу розріджування, підігрітого до температури 37 °С, 2) флакон зі спермою ставили на сухий рушник для охолодження до кімнатної температури (18–20 °С) і витримували протягом 10 хвилин; 3) до розчину додавали 1 мл розчину другого етапу розріджування; 4) кінцевий розчин зі спермою фасували у пайети об'ємом 0,25 мл. Відразу після наповнення пайети переносили у пластмасовий бокс, на дні якого знаходилися касети з льодом. Висота розміщення пайет над касетами становила 1,5 см. Бокс щільно закривали кришкою. Через 30 хвилин еквілібрації по одній пайеті кожного варіанту використовували для тестування якості вміщеної в неї сперми, інші переносили на фторопластову пластину, яку попередньо охолоджували у парах зрідженого до температури мінус 55–65 °С. Після 10-хвилинної витримки в парах пайети занурювали у зріджений азот. Розморожування здійснювали прямим зануренням пайет у воду з температурою 37 °С. Рухливість сперми визначали за 10-бальною шкалою суб'єктивно під мікроскопом при збільшенні 100х.

Ефект впливу зменшення концентрації жовтку курячого яйця на показники деконсервованої сперми вивчено 2-ма дослідями.

Дослід 1 проведений за принципом «поділених еякулятів», для чого 0,5 мл нативної сперми на першому етапі розрідження змішували з розчином з однією кінцевою концентрацією жовтка, а 0,5 мл того ж самого еякуляту – розріджувачем аналогічного складу, але з іншою концентрацією жовтка. Досліджено 2 пари варіантів концентрації жовтку у розрідженій спермі: 1) 2,5 та 10 % за об'ємом – варіанти 1-2,5 та 1-10 (n=48), 2) 5 та 10 % – варіанти 2-5 та 2-10 (n=10). Кінцева концентрація гліцерину у підготовленій для заморожування спермі для усіх варіантів становила 2,5 % за об'ємом. Вміст інших компонентів розріджувачів був однаковим за асортиментом і несуттєво різнився за концентрацією між варіантами. Результати дослідіу представлені числовими значеннями показника активності деконсервованої сперми.

Дослідом 2 вивчено характер зберігання рухливості деконсервованими сперміями в процесі їх наступної витримки. Для цього 0,2 мл вмісту однієї з пайет, заморожених за вище вказаними

варіантами, після розморожування переносили у 1 мл розчину, склад якого повторював склад розчину першого етапу розріджування, але не містив кріопротектору. Отриману суміш у скляному флаконі переносили у термостат і тримали за температури 37 °С. Зразки тестували на наявність активності з періодом в 1 годину до повного зникнення ознак руху. Результати дослідів представлені графічно.

Статистичне обчислення даних здійснювали за загально прийнятими алгоритмами ANOVA з використанням математичного апарату програми «Excel» пакету «Microsoft Office». Вірогідність (p) відмінності показників оцінювали за критерієм Стьюденту ( $t_d$ ) [Лакин Г.Ф., 1990].

**Результати досліджень.** Результати дослідів 1 наведені у таблиці 1. Як видно, за обох варіантів зменшення кількості жовтка не вплинуло вірогідно на якість сперми після еквілібрації, але погіршило її здатність протистояти заморожуванню – показник активності після деконсервації був меншим ( $p < 0,05$ ).

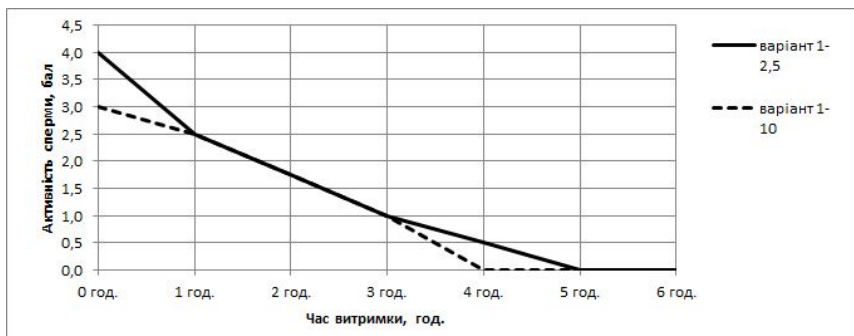
**Таблиця 1. Показники сперми, яку піддавали заморожуванню у розчинах з різним вмістом жовтка, у досліді 1**

Варіант	Кінцевий вміст жовтка, %	n	Активність сперми, бал		
			нативної	еквілібро-ваної	розмороженої
варіанти 1					
1-2,5	2,5	48	7,63±0,25 <sup>a</sup>	5,63±0,42 <sup>a</sup>	2,42±0,14 <sup>a</sup>
1-10	10,0	48	7,63±0,25 <sup>a</sup>	5,96±0,25 <sup>a</sup>	3,47±0,17 <sup>b</sup>
варіанти 2					
2-5	5,0	10	7,60±0,45 <sup>a</sup>	7,00±0,35 <sup>a</sup>	2,80±0,38 <sup>a</sup>
2-10	10,0	10	7,60±0,45 <sup>a</sup>	6,00±0,59 <sup>a</sup>	4,00±0,31 <sup>b</sup>

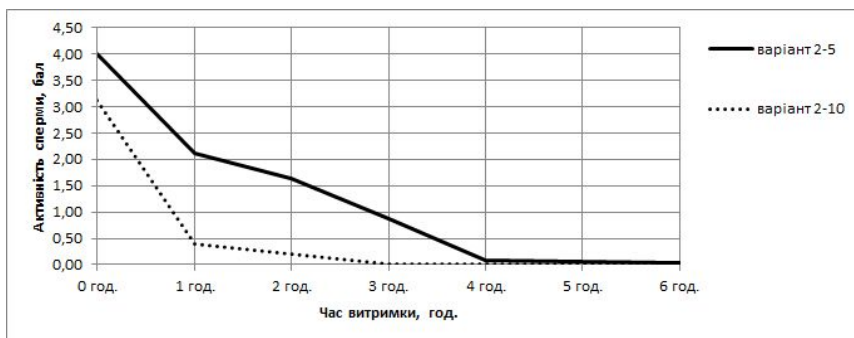
Результати дослідів 2 представлені графіками на рисунках 1 і 2. Слід відмітити, що при цьому різниця показника активності щойно розмороженої сперми між варіантами була дещо відмінна від такої у досліді 1. Так, активність сперми, яку піддали заморожуванню за варіантом 1-2,5, становила 4,0±0,0 проти 3,0±0,0 бали за варіантом 1-10. Після заморожування за варіантами 2-5 та 2-10 ці показники становили 4,0±0,4 та 3,1±0,1 бали відповідно. Тобто, у досліді 2 використання розріджувача з меншою концентрацією жовтка було більш ефективним ( $p > 0,05$ ). Найбільш ймовірною причиною такої відмінності від результатів дослідів 1 було те, що у досліді 2

використовували сперму від інших баранів і їх кількість була малою, що могло сприяти прояву впливу індивідуальних характеристик.

Результати досліді 2 свідчать, що зменшення концентрації жовтка обумовило певне збільшення тривалості часу, протягом якого розморожені спермії проявляють ознаки руху. При цьому за кінцевої концентрації жовтка 2,5 % збільшення було більш помітним (рис. 1). Але, таке подовження не можна вважати достатнім та задовільним.



**Рисунок 1. Динаміка активності деконсервованої сперми, яку заморозували за варіантами 1-2,5 та 1-10, у досліді 2**



**Рисунок 2. Динаміка активності деконсервованої сперми, яку заморозували за варіантами 2-5 та 2-10, у досліді 2**

У попередніх дослідіх з визначення виживаності нами встановлено, що в аеробних умовах свіжоотримана сперма баранів після розрідження розчинами, що не містять кріопротекторів, здатна

до 8–12 годин підтримувати свою рухливість на рівні 5–7 балів. Графік активності при цьому має вигляд майже пологого плато. Також через 2–4 години витримки часто спостерігаються ознаки суперактивації. Припускаємо, що така підтримка відбувається за рахунок активації аеробного дихання. У даному досліді умови витримки забезпечували вільний доступ кисню. Але динаміка активності мала спадаючий вигляд. Такий характер зміни рухливості свідчить про те, що спермії в процесі витримки використовували ті речовини, що були накопичені ними ще до еякуляції. А ось речовини із оточуючого середовища або не потрапляли всередину клітин, або їх утилізація була заблокована. Слід зважати на те, що деконсервовані спермії крім попереднього впливу кріочинників піддавалися також дії гліцерину, який був складовою кріопротекторного розчину і залишався в зразках, хоча і в малій концентрації. Як показали наші попередні досліді, саме гліцерин обумовлює падаючий характер зміни рухливості свіжоотриманих розріджених сперміїв. Найбільш вірогідним поясненням негативного впливу гліцерину, на нашу думку, є порушення діяльності мітохондрій. Разом з тим, порівняння характеристик графіків 1 і 2 показує, що присутність великої кількості жовтка може завдавати додаткової негативної дії. Зважаючи на здатність ліпопротеїдів жовтка прикріплюватися до фосфоліпідів мембран, можливою причиною негативної дії збільшеної концентрації жовтка може бути обмеження доступу речовин з навколишньої рідини в цитоплазму за рахунок утворення більш щільного бар'єру на зовнішньої поверхні мембрани сперміїв.

Результати даного дослідження співпадають з результатами робіт, в яких встановлено позитивну дію високих концентрацій жовтка на рухливість розморожених сперміїв [Far M.F. et al., 2007; Acharya M. et al, 2020]. Разом з тим, виявлений характер зміни активності деконсервованих сперміїв в процесі їх наступної витримки може підтверджувати встановлену іншими дослідниками здатність компонентів жовтка пригнічувати дихання сперміїв [Hu J.H. et al., 2011].

**Висновки.** 1. Зменшення концентрації жовтка курячого яйця у розрідженій спермі баранів з 10% до 5 та 2,5% призводить до вірогідного погіршення показника її активності після відтавання.

2. Зменшення концентрації жовтка курячого яйця у розрідженій спермі баранів з 10% до 5% сприяє покращенню динаміки активності деконсервованої сперми баранів в процесі її наступної витримки, але не впливає помітно на час, протягом якого розморожені спермії виявляють ознаки руху.



## Список використаної літератури

1. Acharya, M., J. Burke and R. Rorie. 2020. Effect of semen extender and storage temperature on motility of ram spermatozoa. *Advances in Reproductive Sciences*, 8:14–30. doi: 10.4236/arsci.2020.81002
2. Azizunnesa, Begum Fatema Zohara, FaridaYeasmin Bari and Md Golam Shahi Alam. 2014. Effects of proportion of egg yolk and preservation time on chilled semen from indigenous rams. *GSTF International Journal of Veterinary Science (JVet)*, 1(1):18–26. doi: 10.5176/0000-0003\_1.1.3
3. Forouzan Far, M., M. Fazilati, S.M. Hoseini, F. Moulavi, M. Hajian, S. Asadollah Salehi, A. Rabiei, M.H.N. Esfahani. 2007. Investigation of different glycerol and egg yolk concentration on freezing bakhtiari ram semen. *ASJ*, 5 (18):17–25. <http://anatomyjournal.ir/article-1-461-en.html>
4. Garde, J.J., A. del Olmo, A.J. Soler, G. Espeso, M. Gomendio and E.R.S. Roldan. 2008. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Anim. Repr. Sci.*, 108:384–401.
5. Gil, J., N. Lundeheim, L. Soderquist and H. Rodriguez-Martinez. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59:1241–1255.
6. Graham, J.K. and R.H. Foote. 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiol.* 24:42-52.
7. Hafez, B. and E.S.E. Hafez. 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins.
8. Hu, J.H., Z.L. Jiang, R.K. Lv, Q.W. Li, S.S. Zhang, L.S. Zan, Y.K. Li and X. Li. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 62:83-87.
9. Medeiros, C.M.O., F. Forell, A.T.D. Oliveira and J.L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 57:327–344.
10. Mukul Anand, Gunjan Baghel and Sarvajeet Yadav. 2017. Effect of egg yolk concentration and washing on sperm quality following cryopreservation in Barbari buck semen. *Journal of Applied Animal Research*, 45:1, 560-565, doi: 10.1080/09712119.2016.1232265
11. Pellicer-Rubio, M.T. and Y. Combarrous. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.*, 112:95–105.
12. Polge, C., S. Salamon and I. Wilmot. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 87:424-428.
13. Ptáček, M., M. Stadnikova, F. Savvulidi and L. Stadnik. 2018. Ram semen cryopreservation using egg yolk or egg yolk-free extenders: preliminary results. *Scientia agriculturae bohemia*, 50, 2019 (2): 96–103. doi: 10.2478/sab-2019-0014
14. Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 215–225.

15. Stuart, C.C., J.L. Vaughan, C.M. Kershaw, S.P. de Graaf and R. Bathgate. 2017. Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific Reports*, 9:12826. doi:10.1038/s41598-019-49203-z
16. Upreti, G.C., E.L. Hall, D. Koppens, J.E. Oliver, R. Vishwanath. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PL A2) and PL A2 inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 56:107–121.

## References

1. Acharya, M., J. Burke and R. Rorie. 2020. Effect of semen extender and storage temperature on motility of ram spermatozoa. *Advances in Reproductive Sciences*, 8:14–30. doi: 10.4236/arsci.2020.81002
2. Azizunnesa, Begum Fatema Zohara, FaridaYeasmin Bari and Md Golam Shahi Alam. 2014. Effects of proportion of egg yolk and preservation time on chilled semen from indigenous rams. *GSTF International Journal of Veterinary Science (JVet)*, 1(1):18–26. doi: 10.5176/0000-0003\_1.1.3
3. Forouzan Far, M., M. Fazilati, S.M. Hoseini, F. Moulavi, M. Hajian, S. Asadollah Salehi, A. Rabiei, M.H.N. Esfahani. 2007. Investigation of different glycerol and egg yolk concentration on freezing bakhtiari ram semen. *ASJ*, 5 (18):17–25. <http://anatomyjournal.ir/article-1-461-en.html>
4. Garde, J.J., A. del Olmo, A.J. Soler, G. Espeso, M. Gomendio and E.R.S. Roldan. 2008. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Anim. Repr. Sci.*, 108:384–401.
5. Gil, J., N. Lundeheim, L. Soderquist and H. Rodriguez-Martinez. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59:1241–1255.
6. Graham, J.K. and R.H. Foote. 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiol.* 24:42-52.
7. Hafez, B. and E.S.E. Hafez. 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins.
8. Hu, J.H., Z.L. Jiang, R.K. Lv, Q.W. Li, S.S. Zhang, L.S. Zan, Y.K. Li and X. Li. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 62:83-87.
9. Medeiros, C.M.O., F. Forell, A.T.D. Oliveira and J.L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 57:327–344.
10. Mukul Anand, Gunjan Baghel and Sarvajeet Yadav. 2017. Effect of egg yolk concentration and washing on sperm quality following cryopreservation in Barbary buck semen. *Journal of Applied Animal Research*, 45:1, 560-565, doi: 10.1080/09712119.2016.1232265
11. Pellicer-Rubio, M.T. and Y. Combarrous. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fert.*, 112:95–105.

12. Polge, C., S. Salamon and I. Wilmut. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 87:424-428.
13. Ptáček, M., M. Stadnikova, F. Savvulidi and L. Stadnik. 2018. Ram semen cryopreservation using egg yolk or egg yolk-free extenders: preliminary results. *Scientia agriculturae bohémica*, 50, 2019 (2): 96–103. doi: 10.2478/sab-2019-0014
14. Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 215–225.
15. Stuart, C.C., J.L. Vaughan, C.M. Kershaw, S.P. de Graaf and R. Bathgate. 2017. Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific Reports*, 9:12826. doi:10.1038/s41598-019-49203-z
16. Upreti, G.C., E.L. Hall, D. Koppens, J.E. Oliver, R. Vishwanath. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PL A2) and PL A2 inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 56:107–121.