

ВИЖИВАНІСТЬ ДЕКОНСЕРВОВАНОЇ СПЕРМИ БАРАНІВ У РОЗЧИНАХ З РІЗНИМ ВМІСТОМ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНУ

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, Чаплинський р-н,
Херсонська обл., 75230, Україна
e-mail: ascitsr_priemnaya@ukr.net

Надійшла 11.06.2020

Мета. Дослідити спроможність β-циклодекстрину (β-ЦД) вплинути на виживаність сперміїв після їх розморожування. **Методи.** Сперму, заморожену у пайстах за скороченим способом, розморожували і переносили у 1,0 мл розчинів з 0,0 (контроль), 0,01, 0,1 та 1,0 мг/мл β-ЦД. Потім по 0,25 мл кожного отриманого розчину зі спермою переносили у нову пайсту, решту залишали у флаконі. Пайсти та флакони витримували за температури 37 °С, активність сперми в них визначали кожний час до повного припинення руху сперміїв. **Результати.** За однакового типу фасування різниці між показниками виживаності та абсолютної виживаності сперміїв у розчинах з різним вмістом β-ЦД не виявлено. Виживаність сперміїв, фасованих у пайсти, у розчинах з різним вмістом β-ЦД варіювала від 1,06 до 1,17 год., абсолютна виживаність – від 4,35 до 4,76 у.о., для зразків у флаконах – від 2,06 до 2,33 год. та від 7,06 до 7,51 у.о. відповідно. Різниця між показниками різних типів фасування невірогідна. **Висновок.** Доповнення розчину β-циклодекстрином у концентрації 0,01–1,0 мг/мл не чинить впливу на виживаність та абсолютну виживаність деконсервованої сперми баранів.

Ключові слова: вівчарство, відтворення, сперма, розморожування, циклодекстрин.

DOI: <https://doi.org/10.33694/2415-3958-2020-1-5-83-91>

RAM SPERM SURVIVAL in SOLUTIONS with VARIOUS β -CYCLODEXTRIN CONTENT

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, Chaplynka district,

Kherson region, 75230, Ukraine

e-mail: ascitsr_priemnaya@ukr.net

Aim. To study the ability of β -cyclodextrin (β -CD) to impact on the sperm survival after thawing. **Methods.** Sperm frozen in straws by the shortened method was thawed and transferred into 1.0 ml of solutions with 0.0 (control), 0.01, 0.1 and 1.0 mg/ml β -CD. Then 0.25 ml of each obtained solution with sperm was transferred into a fresh straw, the residue was left in a vial. Straws and vials were kept at a temperature of 37 °C, sperm activity was determined every hour until the movement of sperm was completely stopped. **Results.** With the same type of packaging, no significant difference was found between the survival and the absolute survival rates of sperm in solutions with different contents of β -CD. The survival of sperm packaged in straws in solutions with different contents of β -CD varied from 1.06 to 1.17 hours, the absolute survival rate – from 4.35 to 4.76 units, for samples in vials – from 2.06 to 2.33 hours and from 7.06 to 7.51 units, respectively. The difference between the values of the various types of packaging was non-significant. **Conclusions.** Solution supplement with β -cyclodextrin at a concentration of 0.01–1.0 mg/ml does not impact on the survival and the absolute survival of the thawed ram sperm.

Keywords: sheep breeding, reproduction, sperm, thawing, cyclodextrin.

DOI: <https://doi.org/10.33694/2415-3958-2020-1-5-83-91>

**ВЫЖИВАЕМОСТЬ ДЕКОНСЕРВИРОВАННОЙ
СПЕРМЫ БАРАНОВ В РАСТВОРАХ С РАЗЛИЧНЫМ
СОДЕРЖАНИЕМ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА**

И. В. Лобачева, кандидат сельскохозяйственных наук,
старш. науч. сотруд.
ORSID 0000-0001-5837-8530

Институт животноводства степных районов имени М. Ф. Иванова
«Аскания-Нова» - Национальный научный селекционно-
генетический центр по овцеводству
ул. Соборная, 1, пгт. Аскания-Нова, Чаплинский р-н,
Херсонская обл., 75230, Украина
e-mail: ascitsr_priemnaya@ukr.net

Цель. Изучить способность β -циклодекстрина (β -ЦД) повлиять на выживаемость спермиев после их размораживания. **Методы.** Сперму, замороженную в пайетах по сокращенному способу, размораживали и переносили в 1,0 мл растворов с 0,0 (контроль), 0,01, 0,1 и 1,0 мг/мл β -ЦД. Затем по 0,25 мл каждого полученного раствора со спермой переносили в новую пайету, остаток оставляли во флаконе. Пайеты и флаконы выдерживали при температуре 37 °С, активность спермы в них определяли каждый час до полной остановки движения спермиев. **Результаты.** При одинаковом типе фасовки значимой разницы между показателями выживаемости и абсолютной выживаемости спермиев в растворах с различным содержанием β -ЦД не обнаружено. Выживаемость спермиев, фасованных в пайеты, в растворах с различным содержанием β -ЦД варьировала от 1,06 до 1,17 час, абсолютная выживаемость – от 4,35 до 4,76 у.о., для образцов во флаконах – от 2,06 до 2,33 час и от 7,06 до 7,51 у.о. соответственно. Разница между показателями различных типов фасовки недостоверная. **Выводы.** Дополнение раствора β -циклодекстрином в концентрации 0,01–1,0 мг/мл не оказывает влияния на выживаемость и абсолютную выживаемость деконсервированной спермы баранов.

Ключевые слова: овцеводство, воспроизводство, сперма, размораживание, циклодекстрин.
DOI: <https://doi.org/10.33694/2415-3958-2020-1-5-83-91>

Постановка проблемы. Кріоконсервація сперми з її наступним тривалим зберіганням є сучасним прийомом збільшення обсягів та подовження тривалості використання генетично цінних плідників. Але процедура заморожування згубно впливає на спермії, погіршуючи її запліднювальну здатність. Тому пошук прийомів покращення якості деконсервованих спермій є актуальним питанням.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Існує два типи підходів поліпшення стану розморожених сперміїв, які різняться часом застосування. Перші використовують під час заморожування сперми для зменшення впливу кріочинників на клітинні компартаменти. Другі застосовують після розморожування і їх дія спрямована на поновлення та посилення обмінних процесів в деконсервованих сперміях.

Одним з чинників погіршення якості клітин є порушення структури цитоплазматичної мембрани [1]. Так, відомо, що при заморожуванні відбувається втрата поліненасичених ліпідів і холестеролу [2], зміна проникливості мембран для води та іонів [3]. Також, фосфоліпіди, які додають у кріопротекторні розчини, здатні утворювати стійкі комплекси з фосфоліпідами мембран, порушуючи склад останніх [4]. Постає питання, чи можна покращити якість сперміїв додаванням до розчину речовин неліпідної природи, які здатні впливати на мембранні структури клітин.

Однією з речовин, які можуть приєднуватись до компонентів мембран, є β -циклодекстрин (β -ЦД) – циклічний олігомер із 7-х молекул глюкози. Зовнішня границя цієї сполуки гідрофільна, а внутрішнє ядро - гідрофобне [5], що уможлиблює прикріплення речовини до фосфорних залишків та проникнення в ліпідний шар мембран. Така здатність речовини навела на думку щодо її використання при заморожуванні клітин. Але результати виявилися суперечливими. Так, в деяких дослідах доповнення кріопротекторного розчину β -циклодекстрином покращувало якість сперми баранів [6], в інших вірогідно погіршувало [7]. Позитивний вплив β -циклодекстрину показано при заморожуванні сперми мишей [8], негативний – сперміїв бугаїв [9]. При вивченні дії β -ЦД встановлено, що його додавання до розчину перед заморожуванням здатне посилити вихід холестерину із мембран сперміїв [10], яке майже повністю припиняється при заміні циклодекстрину його комплексом з холестерином [11].

Виявлені особливості дії β -ЦД у складі розчинів для заморожування обумовили інтерес до вивчення здатності цієї речовини вплинути на життєздатність сперміїв при внесенні у розчин після їх розморожування.

Мета статті. Дослідити виживаність деконсервованих сперміїв баранів у розчинах з різним вмістом β -ЦД.

Матеріал та методика досліджень. У досліді використано кріоконсервовану сперму баранів-плідників асканійської тонкорунної породи, яку заморожували у пайетах за «скороченим» способом з використанням цукрозо-цитратно-гліцерино-жовткових розбавлю-

вачів серій А11 та А12. Дослід включав три повтори, в кожному з яких використано заморожену сперму 3-х різних баранів.

Для визначення впливу β -ЦД одночасно розморожували по 4 пайети (по 0,25 мл кожна), які містили кріоконсервовану сперму, отриману одним еякулятом від одного плідника і піддану однаковій процедурі заморожування. Вміст пайет переносили у 4 скляні флакони, які містили по 1 мл контрольного або експериментальних розчинів. Після оцінювання активності по 0,25 мл кожного отриманого розчину переносили у нову пайету, решту залишали у флаконі. Вільний отвір пайети закривали пластиковою кулькою, флакон гумовою пробкою. Флакони та пайети переносили у термостат, який підтримував температуру 37 °С. Активність сперміїв в пайетах та флаконах перевіряли кожну годину до повного припинення руху. При перевірці активності сперми, фасованої у пайети, кінчик із кулькою відкидали, а для тесту відокремлювали 1-1,5 см з вільного кінця пайети. Залишок герметизували новою кулькою. Як основу контрольного та експериментальних розчинів для розбавлення розмороженої сперми при першому повторі використано розчин ШО7, при другому – ШО8, третьому – ШО9. Концентрація β -ЦД в експериментальних розчинах становила 0,01, 0,1 та 1,0 мг/мл. Виживаність встановлювали за часом, після якого активність сперми зменшувалась до 0,5 бала. Абсолютну виживаність обраховували за формулою: $\text{Абс.виж.} = A_0 + \sum A_n$, де A_0 – показник активності сперми після розморожування перед розбавленням, A_n – показник активності розбавленої сперми після n годин витримки.

Результати досліджень. За однакового типу фасування вірогідної різниці ані за показником виживаності, ані за абсолютною виживаністю сперміїв, підданих розбавленню розчинами з дослідженими концентраціями β -ЦД, не виявлено (табл. 1). Це може свідчити як про відсутність впливу речовини на компоненти цитоплазматичної мембрани, так і про незадіяність цих компонентів у процесах, які сприяють посиленню виживаності сперміїв.

Разом з тим, спостережено помітну, але невірогідну різницю за виживаністю та абсолютною виживаністю сперміїв, розбавлених розчинами однакового складу, але фасованих та витриманих у різних емностях. Зокрема, спермії, які витримували у флаконах, проявляли ознаки активності довше, ніж фасовані у пайети. Це свідчить про те, що спермії після розморожування зберігали здатність до аеробного дихання. Відсутність залежності від наявності та концентрації β -ЦД показує, що ця речовина не змінювала надходження кисню до цитоплазми деконсервованих сперміїв.

Таким чином, доповнення β -циклодекстрином розчину з деконсервованою спермою не вплинуло на її виживаність. Можливо це було обумовлено тим, що після розморожування спермії не відокремлювали від криопротекторного розчину. Останній містив жовток курячого яйця, фосфоліпіди якого здатні утворювати стійкі конгломерати з фосфоліпідами цитоплазматичної мембрани сперміїв і могли завадити приєднанню β -ЦД.

Таблиця 1. Кінетичні показники деконсервованої сперми баранів, підданої витримці у розчинах з різним вмістом β -ЦД

Концентрація β -ЦД, мг/мл	Форма витримки	n	Активність нативної сперми, бал	Активність сперми при розморожуванні, бал	Вживаність, год.*	Абс. виж., у.о.*
0,0	пайєта	9	7,83±0,35	3,39±0,42	1,06±0,37	4,58±1,08
0,01	пайєта	9	7,83±0,35	3,56±0,34	1,17±0,40	4,76±1,05
0,1	пайєта	9	7,83±0,35	3,44±0,36	1,06±0,37	4,35±0,90
1,0	пайєта	9	7,83±0,35	3,56±0,31	1,11±0,39	4,43±0,84
0,0	флакон	9	7,83±0,35	3,39±0,42	2,33±0,79	7,41±2,22
0,01	флакон	9	7,83±0,35	3,56±0,34	2,11±0,82	7,51±2,30
0,1	флакон	9	7,83±0,35	3,44±0,36	2,33±0,68	7,21±1,82
1,0	флакон	9	7,83±0,35	3,56±0,31	2,06±0,69	7,06±1,84

Примітка. * - показники колонки не мають вірогідної різниці.

Відомо, що додавання β -ЦД може ініціювати вихід неетерифікованого холестерину з цитоплазматичних мембран сперміїв [12]. Це відбувається з причини нейтралізації β -ЦД фосфатних залишків мембран. Але виходом холестерину із мембран супроводжується процес капітації сперми [13]. Тож виникає питання, чи доцільно використовувати β -ЦД поодиночі, який може ініціювати передчасну капітацію та зміну властивостей поверхні мембран і тим заважати сперміям долати цервікальний слиз. Можливо доцільно застосовувати β -ЦД у поєднанні з речовинами, які сприяють зміцненню мембран та усуненню фосфоліпідів жовтка з їх поверхні. На таку можливість вказують результати використання β -ЦД у поєднанні з холестеролом, за якого вміст холестерину в мембранах сперміїв баранів в процесі заморожування не тільки не зменшувався, а й навіть збільшувався [14]. Позитивно впливає і поєднання β -ЦД з вітаміном Е [15]. Подальші дослідження мають бути спрямовані на пошук речовин, які б на основі використання здатності β -ЦД контактувати зі

структурними елементами мембран сприяли б зміцненню та поновленню цитоплазматичних мембран деконсервованих спермійв.

Висновок. Доповнення розчину β -циклодекстрином у концентрації 0,01–1 мг/мл не чинить впливу на виживаність та абсолютну виживаність деконсервованої сперми баранів.

Список використаної літератури

1. Holt W.V., Head M.F., North R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.*, 1992; 46(6):1086–1094. doi: 10.1095/biolreprod46.6.1086.

2. Pini T., Leahy T., de Graaf S.P. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology*, 2018; 118:172–181. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.06.006.

3. Oldenhof H., Friedel K., Sieme H., Glasmacher B., Wolkers W.F. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 2010; 61:115–122. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.06.002.

4. Ollero M., Bescós O., Cebrián-Pérez J.A., Muño-Blanco T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing -thawing process. *Theriogenology*, 1998; 49(3):547–555. doi:10.1016/S0093-691X(98)00006-5.

5. Hu Jinlian. Shape Memory Polymers and Textiles. Woodhead Publishing Series in Textiles. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England. Published in North America by CRC Press LLC, 6000 Broken Sound Parkway, NW. 2007; 345 p.

6. Benhenia K., Lamara A., Fatmi S., Iguer-Ouada M. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Ruminant Research*, 2016; 141:29–35. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.06.009.

7. Batissaco L., de Arrudab R.P., Alves M.B.R., Torres M.A., Lemes K.M., Prado-Filho R.R., de Almeida T.G., de Andrade A.F.C., Celeghini E.C.C. Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram semen with low freezability. *Reprod. Biol.*, 2020; 20:14–24. doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.002.

8. Movassaghi S., Saki G., Javadnia F., Panahi M., Mahmoudi M., Rhim f. Effects of methyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on cryosurvival of spermatozoa from C57BL/6 mouse. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 2009; 12:19–25. doi:10.3923/pjbs.2009.19.25.

9. Lee Seunghyung, Lee Yong-Seung, Lee Sang-Hee, Yang Boo-Keun, Park Choon-Keun. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the viability and acrosome damage of sex-sorted sperm in frozen-thawed bovine semen. *J. Biol. Res.-Thessaloniki*, 2016; 23(5). doi:10.1186/s40709-016-0043-x.

10. Águila L., Arias M.E., Vargas T., Zambrano F., Felmer R. Methyl- β -cyclodextrin improves sperm capacitation status assessed by flow cytometry

analysis and zona pellucida-binding ability of frozen/thawed bovine spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 2015; 50(6):931–938. <https://doi.org/10.1111/rda.12611>.

11. Longobardi V., Albero G., De Canditiis C., Salzano A., Natale A., Balestrieri A., Neglia G., Campanile G., Gasparrini B. Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. *Theriogenology*, 2017; 89:359–364. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.048.

12. Cross N.L. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 53(1):92–98. [doi:10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<92::AID-MRD11>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<92::AID-MRD11>3.0.CO;2-Q).

13. Cross N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, 1998; 59(1):7–11. [doi:10.1095/biolreprod59.1.7](https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.7).

14. Mocé E., Purdy Ph.H., Graham J.K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010; 118:236–247. [doi:10.1016/j.anireprosci.2009.06.013](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.013).

15. Benhenia K., Rahab H., Smadi M.-A., Benmakhlof H., Lamara A., Idres T., Iguer-Ouada M. Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 2018; 195:266–273. [doi:10.1016/j.anireprosci.2018.06.004](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.004).

References

1. Holt W.V., Head M.F., North R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.*, 1992; 46(6):1086–1094. [doi:10.1095/biolreprod46.6.1086](https://doi.org/10.1095/biolreprod46.6.1086).

2. Pini T., Leahy T., de Graaf S.P. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology*, 2018; 118:172–181. [doi:10.1016/j.theriogenology.2018.06.006](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.006).

3. Oldenhof H., Friedel K., Sieme H., Glasmacher B., Wolkers W.F. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 2010; 61:115–122. [doi:10.1016/j.cryobiol.2010.06.002](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.06.002).

4. Ollero M., Bescós O., Cebrián-Pérez J.A., Muiño-Blanco T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing -thawing process. *Theriogenology*, 1998; 49(3):547–555. [doi:10.1016/S0093-691X\(98\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00006-5).

5. Hu Jinlian. Shape Memory Polymers and Textiles. Woodhead Publishing Series in Textiles. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England. Published in North America by CRC Press LLC, 6000 Broken Sound Parkway, NW. 2007; 345 p.

6. Benhenia K., Lamara A., Fatmi S., Iguer-Ouada M. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Ruminant Research*, 2016; 141:29–35. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.06.009.

7. Batissaco L., de Arrudab R.P., Alves M.B.R., Torres M.A., Lemes K.M., Prado-Filho R.R., de Almeida T.G., de Andrade A.F.C., Celeghini E.C.C. Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram semen with low freezability. *Reprod. Biol.*, 2020; 20:14–24. doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.002.
8. Movassaghi S., Saki G., Javadnia F., Panahi M., Mahmoudi M., Rhim f. Effects of methyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on cryosurvival of spermatozoa from C57BL/6 mouse. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 2009; 12:19–25. doi:10.3923/pjbs.2009.19.25.
9. Lee Seunghyung, Lee Yong-Seung, Lee Sang-Hee, Yang Boo-Keun, Park Choon-Keun. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the viability and acrosome damage of sex-sorted sperm in frozen-thawed bovine semen. *J. Biol. Res.-Thessaloniki*, 2016; 23(5). doi:10.1186/s40709-016-0043-x.
10. Águila L., Arias M.E., Vargas T., Zambrano F., Felmer R. Methyl- β -cyclodextrin improves sperm capacitation status assessed by flow cytometry analysis and zona pellucida-binding ability of frozen/thawed bovine spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 2015; 50(6):931–938. https://doi.org/10.1111/rda.12611.
11. Longobardi V., Albero G., De Canditiis C., Salzano A., Natale A., Balestrieri A., Neglia G., Campanile G., Gasparini B. Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. *Theriogenology*, 2017; 89:359–364. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.048.
12. Cross N.L. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 53(1):92–98. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<92::AID-MRD11>3.0.CO;2-Q.
13. Cross N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, 1998; 59(1):7–11. doi:10.1095/biolreprod59.1.7.
14. Mocé E., Purdy Ph.H., Graham J.K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010; 118:236–247. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.06.013.
15. Benhenia K., Rahab H., Smadi M.-A., Benmakhlouf H., Lamara A., Idres T., Iguer-Ouada M. Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 2018; 195:266–273. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.06.004.