

ВПЛИВ СКОРОЧЕННЯ ТРИВАЛОСТІ ЕКВІЛІБРАЦІЇ НА ПОКАЗНИКИ ДЕКОНСЕРВОВАНОЇ СПЕРМИ БАРАНІВ

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

ORCID: 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 03.06.2021

Мета. Дослідити вплив скорочення тривалості етапу еквілібрації сперми баранів на її показники після розморожування. **Методи.** Нативну сперму після оцінювання піддавали 2-етапному розрідженню розчинами А4/1 і А4/2 у співвідношенні 1:1:1. Після фасування пайєти зі спермою (0,25 мл) переносили у термобокс з температурою 3–5 °С і еквілібрували протягом 0,5, 2 або 4 годин. Потім пайєти переносили у пари азоту, заморожували за мінус 80 °С і занурювали в азот. Після розморожування пайєти переносили у термостат (37 °С). Активність деконсервованої сперми тестували через кожну годину. **Результати.** Для зразків, етап еквілібрації яких тривав 0,5 години, після розморожування активність становила $2,80 \pm 0,68$ бали, виживаність – $3,30 \pm 0,86$ години, абсолютна виживаність – $8,32 \pm 3,56$ Абс.Од. Для сперми з тривалістю еквілібрації 2 години показники становили – $3,00 \pm 0,59$, $4,40 \pm 0,65$ і $10,58 \pm 3,60$, 4 години – $2,40 \pm 1,67$, $4,42 \pm 1,43$ і $10,29 \pm 7,80$, відповідно. При інкубації розморожених спермій ознаки їх гіперактивації спостережено у зразках з 2- та 4-годинною еквілібрацією через 3 години, у зразках з мінімальним часом еквілібрації - через 4. **Висновки.** 1. За використання розчинів А4/1 і А4/2 та 2-етапного режиму розрідження скорочення тривалості етапу еквілібрації з 4 до 0,5 годин не веде до вірогідного погіршення показників деконсервованої сперми. 2. При варіанті еквілібрації у 0,5 годин прояв гіперактивації у деконсервованих спермій відтермінується на 1 годину у порівнянні з варіантами з 2- та 4-годинною тривалістю.

Ключові слова: відтворення, сперма, еквілібрація, заморожування, активність, виживаність.

DOI: <https://doi.org/10.33694/2617-0787-2021-1-14-133-142>

THE EFFECT of the EQUILIBRATION TIME SHORTING on the POST-THAWED RAM SPERM PARAMETERS

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 investigate the effect of decreasing the equilibration duration on the ram sperm parameters after thawing. **Methods.** Fresh semen after evaluation was diluted in 2 steps by using A4/1 and A4/2 extenders to a final ratio 1:1:1. After filling the straws with sperm (0.25 mL) were carried into a thermobox with a temperature of 3–5 °C and equilibrated for 0.5, 2 or 4 hours. Then straws were transferred in the nitrogen vapor, frozen at a temperature minus 80 °C and plunged into nitrogen. After thawing the straws were transferred to the thermostat (37 °C). The activity of the thawed sperm was tested every hour. **Results.** The samples, the equilibration time of which was 0.5 hours, had the activity at level 2.80 ± 0.68 point, the survival time - 3.30 ± 0.86 hours, the absolute survival – 8.32 ± 3.56 Units. For sperm with the equilibration duration of 2 hours, the analogous parameters were -- 3.00 ± 0.59 , 4.40 ± 0.65 i 10.58 ± 3.60 , 4 hours – 2.40 ± 0.67 , 4.42 ± 1.43 i 10.29 ± 7.80 , respectively. During the incubation of thawed sperm in samples with 2 and 4 hours equilibration the signs of hyperactivation were seen after 3 hours and in samples with the minimal duration after 4 ones. **Conclusions.** 1. At using the A4/1 and A4/2 extenders and the 2-step mode of dilution the shorting of equilibration duration from 4 to 0.5 hours doesn't lead to a significant decline the parameters of thawed sperm. 2. For variant with 0.5 hour equilibration the manifestation of hyperactivity of thawed sperms delays for 1 hour in comparison with 2- and 4-hour duration.

Keywords: reproduction, sperm, equilibration, freezing, activity, survival.

DOI: <https://doi.org/10.33694/2617-0787-2021-1-14-133-142>

ВЛИЯНИЕ СОКРАЩЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЭКВИЛИБРАЦИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ДЕКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БАРАНОВ

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. Исследовать влияние сокращения продолжительности этапа эквilibрации спермы баранов на ее показатели после размораживания. **Методы.** Нативную сперму после оценивания разбавляли в 2 этапа растворами А4/1 и А4/2 в соотношении 1:1:1. После фасовки пайеты со спермой (0,25 мл) переносили в термобокс с температурой 3–5 °С и эквilibрировали в течении 0,5, 2 или 4 часа. Затем пайеты переносили в пары азота, замораживали при 80 °С и погружали в азот. После размораживания пайеты переносили в термостат (37 °С). Активность деконсервированной спермы тестировали через каждый час. **Результаты.** У образцов, эквilibрация которых длилась 0,5 часов, после размораживания активность была на уровне $2,80 \pm 0,68$ бала, выживаемость – $3,30 \pm 0,86$ часов, абсолютная выживаемость – $8,32 \pm 3,56$ Абс. Ед. Для спермы с продолжительностью эквilibрации 2 часа аналогичные показатели составили – $3,00 \pm 0,59$, $4,40 \pm 0,65$ и $10,58 \pm 3,60$, 4 часа – $2,40 \pm 1,67$, $4,42 \pm 1,43$ и $10,29 \pm 7,80$, соответственно. При инкубации размороженных спермиев признаки их гиперактивации наблюдались в образцах с 2- и 4-часовой эквilibрацией через 3 часа, в образцах с 0,5-часовой – через 3. **Выводы.** 1. При использовании растворов А4/1 и А4/2 и 2-этапного режима разбавления сокращение продолжительности эквilibрации с 4 до 0,5 часов не ведет к достоверному ухудшению показателей деконсервированной спермы. 2. При варианте эквilibрации 0,5 часов проявление гиперактивности у деконсервированных спермиев запаздывает на 1 час по сравнению с вариантами с 2- и 4-часовой продолжительностью.

Ключевые слова: воспроизводство, сперма, эквilibрация, замораживание, активность, выживаемость.

DOI: <https://doi.org/10.33694/2617-0787-2021-1-14-133-142>

Постановка проблеми. Кріоконсервація сперми є сучасним способом збереження та розповсюдження генетичного матеріалу. У вівчарстві через складну будову шийки матки використання замороженої сперми при традиційному штучному осіменінні є малоефективним, що вимагає удосконалення технології кріоконсервації. Відомо, що одним з наслідків впливу низьких температур на спермії є зміни, подібні тим, що мають місце при природній капацітації [Gillan L. et al., 1997; Ortega-Ferrusola C. et al., 2017; Peris-Frau P. et al., 2020], які, проте, не є їх аналогами [Green C.E., Watson P.F., 2001]. Ці зміни можуть бути одними з чинників погіршення виживаності сперміїв у статевих шляхах самиці та зменшення їх запліднювальної здатності [Gillan L., Maxwell W.M.C., 1999]. Досліди показали збільшення кількості сперміїв з такими порушеннями з подовженням часу еквілібрації [Rodríguez-Almeida F.A. et al., 2008]. Зважаючи на наведене, поставлено питання дослідити можливість та вплив зменшення часу еквілібрації на показники сперми баранів після розморожування.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Результати досліджень демонструють як позитивний або нейтральний вплив скорочення тривалості етапу еквілібрації, так і негативну дію цього. Зокрема в роботі Patt Jr. J. і Nath J. тривалість еквілібрації у 15 хвилин виявилася достатньою для отримання високого показника активності сперми баранів після розморожування, а її збільшення до 6 годин діяло негативно [Patt Jr. J., Nath J., 1969]. Збереження активності майже у 20 відсотків сперміїв баранів, які заморожували відразу після охолодження, спостережено Fiser P.S. і Batra T.R. [Fiser P.S., Batra T.R., 1984]. Mehdipour M. зі співавторами не виявили різниці показників сперми, яку заморожували безпосередньо після досягнення температури 5 С або ж піддавали додатковій 4-годинній еквілібрації [Mehdipour M. et al., 2016]. Позитивний вплив скорочення тривалості еквілібрації з 4 до 2 годин показано при заморожуванні сперми цапів [Sundaragaman M.N., Edwin M. J., 2008]. А ось у дослідях Pelletier P. та Gately R. скорочення часу витримки з гліцерином до 2 годин проти 4 та 8 вело до погіршення показників розмороженої сперми баранів [Pelletier P., Gately R., 2020]. У наших ранніх дослідях зменшення часу еквілібрації до 48 та 115 проти 220 хвилин погіршувало показники розмороженої сперми баранів [Лобачова І.В., 2015]. Негативний вплив скорочення процедури витримки сперміїв у

розчинах з кріопротекторами узгоджується з існуючими поглядами на еквілібрацію як процес зрівнювання внутрішньо- та позаклітинної концентрацій кріопротекторів. Разом з тим, припущено, що зміною послідовності насичення клітин можна прискорити швидкість проникнення захисних речовин у спермії, а отже і проходження етапу еквілібрації. Для цього були розроблено нові розріджувачі, використані у дослідженні.

Мета статті. Дослідити вплив скорочення тривалості етапу еквілібрації на показники сперми баранів після розморожування.

Матеріал і методика досліджень. Дослід проведено на початку травня. Нативну сперму від 5 баранів-плідників асканійської тонкорунної породи отримували на штучну вагіну і тестували за традиційними показниками. Еякуляти не змішували. Після оцінювання до 0,5 мл сперми додавали 0,5 мл розріджувача А4/1. Через 10 хвилин витримки за кімнатної температури до розчину додавали 0,5 мл розріджувача А4/2. Таким чином кінцева ступінь розрідження нативної сперми становила 1:2. Отриманий розчин відразу фасували у пайети об'ємом 0,25 мл і на пластиковій решітці переносили у термобокс, на дно якого були покладені касети з льодом. Температура повітря у місці розташування пайет становила 3–5 °С. Через 0,5, 2 або 4 години витримки у термобоксі по 1 пайеті від кожного еякуляту використовували для визначення активності, а інші піддавали кріоконсервації. Для заморожування решітку з пайетами переносили на фторопластову пластину, яку попередньо витримували у парах азоту з температурою мінус 80 °С. Після 15 хвилин витримки у парах пайети занурювали в азот і переносили на зберігання. Розморожування сперми здійснювали на наступну добу занурюванням пайет у водяну баню з температурою 37 °С. Після тестування на активність пайети переносили у термостат, температуру в якому підтримували на рівні 37–38 °С. Активність сперми визначали через кожну годину до припинення руху сперміїв. Для тестування від одного кінчика пайети відрізали невеликий шматочок, решту закупорювали. Вживаність встановлювали за часом, протягом якого сперма зберігала активність на рівні не нижче 0,5 бали. Абсолютну вживаність вираховували за формулою: $\text{Абс.вж.} = A(0) + \sum A(t)$, де $A(0)$ – активність сперми відразу після розморожування, $A(t)$ – активність після t годин витримки. Статистичний обрахунок даних здійснювали за загально прийнятими ANOVA-алгоритмами з використанням математичного апарату програми «Excel» пакету «Microsoft Office». Вірогідність (p) різниці показників оцінювали за критерієм Стьюденту (t_d) [Лакин Г.Ф., 1990].

Результати досліджень. Середня концентрація спермій в еякулятах становила $3,34 \pm 0,37$ млрд Сп/мл, активність – $8,40 \pm 0,27$ бали, об'єм еякулятів – $1,2 \pm 0,1$ мл і ці показники свідчили про добру якість сперми при отриманні. Наступне розрідження та витримка за субньюлової температури погіршували показник активності, при цьому збільшення тривалості еквілібрації діяло негативно (табл. 1).

Таблиця 1. Показники сперми у досліді ($n=5$)

Тривалість еквілібрації, год.	Активність після еквілібрації, бал	Після розморожування		
		активність, бал	виживаність, год.	абсолютна виживаність, абс.од.
0,5	$6,20 \pm 0,72$	$2,80 \pm 0,68$	$3,30 \pm 0,86$	$8,32 \pm 3,56$
2,0	$5,30 \pm 0,60$	$3,00 \pm 0,59$	$4,40 \pm 0,65$	$10,58 \pm 3,60$
4,0	$4,50 \pm 0,56$	$2,40 \pm 1,67$	$4,42 \pm 1,43$	$10,29 \pm 7,80$

Примітка. * - показники колонки не мають вірогідної різниці.

Разом з тим, різниця у часі витримки перед заморожуванням не вела до вірогідної відмінності ані за показником активності, ані виживаності сперми після розморожування. Життєздатність сперми, яку піддавали еквілібрації протягом 0,5 годин, лише трохи поступалася зразкам з 2-годинною тривалістю еквілібрації.

Рисунком 1 показано динаміку активності сперми після розморожування при різних варіантах еквілібрації. Як видно, зі збільшенням часу інкубації показник поступово зменшувався для усіх варіантів. Але у зразків, тривалість еквілібрації яких становила 2 і 4 години, після 3 годин витримки спостережене збільшення активності. У зразків з 0,5-годинною еквілібрацією це зростання запізнювалося на годину.

Явище посилення активності сперми має місце і при витримці розрідженої нативної сперми і, вочевидь, є природним. У літературі цей ефект носить назву «гіперактивація спермій» і співпадає з проявом капатаційних ознак [Cohen-Dayag A., Eisenbach M., 1994]. У роботі Peris-Frau P. зі співавторами гіперактивація у деконсервованих спермій баранів проявлялася через 5–30 хвилин інкубації, в той час як у свіжоотриманих лише через 180–240 [Peris-Frau P. et al., 2020].

Затримка з проявом гіперактивації у нашому досліді свідчить про те, що скорочення тривалості еквілібрації до 0,5 годин не давало достатнього часу для початку/закінчення псевдокапаційних процесів в сперміях, а, отже, наше припущення щодо можливості зменшення

Список використаної літератури

1. Лакин Г. Ф. (1990) Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов / 4-е изд., перераб. и доп. Москва : Высшая школа, 1990, 353 с.
2. Лобачова І. В. (2015) Вплив тривалості еквілібрації на якість сперми баранів. *Вівчарство та козівництво*. Фах. тем.-наук. зб., 1:186–196. URL : http://nbuv.gov.ua/UJRN/vivc_2015_1_22
3. Cohen-Dayag A., Eisenbach M. (1994) Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am. J. Physiol.* 267:1167–1176. DOI : 10.1152/ajpcell.1994.267.5.C1167
4. Fiser P.S., Batra T.R. (1984) Effect of equilibration time at 5 °C and photoperiod on survival of ram spermatozoa frozen in straws. *Can. J. Anim. Sci.*, 64:777–780. doi: 10.4141/cjas84-087
5. Gillan L., Evans G., Maxwell W.M.C. (1997) Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Repr. Fert. Dev.*, 9(5):481–488. doi: 10.1071/R96046
6. Gillan L., Maxwell W.M.C. (1999) The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J. Repr. Fert., Suppl.* 54:271–283. PMID: 10692861
7. Green C.E., Watson P.F. (2001) Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122:889–898. PMID: 11732984
8. Mehdi pour Mahdiah, Kia Hossein Daghigh, Najafi Abouzar, Dodaran Hossein Vaseghi, García-Ávarez Olga. (2016) Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 73(3):297–303. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.10.008
9. Ortega-Ferrusola C., Anel-López L., Martín-Muñoz P., Ortíz-Rodríguez J.M., Gil M.C., Alvarez M., de Paz P., Ezquerro L.J., Masot A.J., Redondo E., Anel L., Peña F.J. (2017) Computational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermptosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. *Reproduction*, 153:293–304. doi: 10.1530/REP-16-0539
10. Patt Jr. J., Nath J. (1969) Effects of diluents, equilibration time, and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology*, 5(6):385–392. doi: 10.1016/S0011-2240(69)80102-1
11. Pelletier P., Gately R. (2020) Influence of extender temperature, and equilibration time on postthaw sperm motility in ram semen. *Clinical Theriogenology*, 12(3):418. URL : https://st.omnibooksonline.com/data/papers/2020/vol12_3/090.pdf
12. Peris-Frau P., Martín-Maestro A., Iniesta-Cuerda M., Sánchez-Ajofrín I., Cesari A., Garde J.J., Soler A.J. (2020) Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*, doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.046
13. Rodríguez-Almeida F.A., Ávila Cota C.O., Anchondo Garay A., Blanca Sánchez-Ramírez B., Jiménez Castro J.A. (2008) Capacitación espermiática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o

congelado (Sperm capacitation induced by conservation of diluted, refrigerated, or frozen ram semen). *Agrociencia*, 42:399–406. URL : <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30211241002>

14. Sundararaman M.N., Edwin M.J. (2008) Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol-equilibration and the relevance to cryopreservation. *Asian J. Cell Biol.*, 3:22–33. DOI : 10.3923/ajcb.2008.22.33

References

1. Lakin, G. F. (1990) *Biometriya : ucheb. posobie dlya biol. spets. Vuzov [Biometrics: a Textbook for Specialized Biological Universities]* (4-th ed., rev.). Moscow: Vysshaya shkola [in Russian].

2. Lobachova, I. V. (2015). Vplyv tryvalosti ekvilibratsii na yakist spermy baraniv [The influence of duration of the equilibration on the quality of ram sperm]. Yu.V. Vdovychenko (Eds.), *Vivcharstvo ta kozivnytstvo – Sheep Breeding and Goat Breeding*. (Issue 1), (pp. 186-197). Nova Kakhovka: “PYEL” [in Ukrainian].

3. Cohen-Dayag A., Eisenbach M. (1994) Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am. J. Physiol.* 267:1167–1176. DOI : 10.1152/ajpcell.1994.267.5.C1167

4. Fiser P.S., Batra T.R. (1984) Effect of equilibration time at 5 °C and photoperiod on survival of ram spermatozoa frozen in straws. *Can. J. Anim. Sci.*, 64:777–780. doi: 10.4141/cjas84-087

5. Gillan L., Evans G., Maxwell W.M.C. (1997) Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Repr. Fert. Dev.*, 9(5):481–488. doi: 10.1071/R96046

6. Gillan L., Maxwell W.M.C. (1999). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J. Repr. Fert., Suppl.* 54:271–283. PMID: 10692861

7. Green C.E., Watson P.F. (2001) Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122:889–898. PMID: 11732984

8. Mehdipour Mahdieh, Kia Hossein Daghigh, Najafi Abouzar, Dodaran Hossein Vaseghi, García-Ávarez Olga. (2016) Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 73(3):297–303. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.10.008

9. Ortega-Ferrusola C., Anel-López L., Martín-Muñoz P., Ortíz-Rodríguez J.M., Gil M.C., Alvarez M., de Paz P., Ezquerro L.J., Masot A.J., Redondo E., Anel L., Peña F.J. (2017) Computational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermptosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. *Reproduction*, 153:293–304. doi: 10.1530/REP-16-0539

10. Patt Jr. J., Nath J. (1969) Effects of diluents, equilibration time, and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology*, 5(6):385–392. doi: 10.1016/S0011-2240(69)80102-1

11. Pelletier P., Gately R. (2020) Influence of extender temperature, and equilibration time on postthaw sperm motility in ram semen. *Clinical Theriogenology*, 12(3):418. URL : https://st.omnibooksonline.com/data/papers/2020/vol12_3/090.pdf
12. Peris-Frau P., Martín-Maestro A., Iniesta-Cuerda M., Sánchez-Ajofrín I., Cesari A., Garde J.J., Soler A.J. (2020) Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*, doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.046
13. Rodríguez-Almeida F.A., Ávila Cota C.O., Anchondo Garay A., Blanca Sánchez-Ramírez B., Jiménez Castro J.A. (2008) Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado (Sperm capacitation induced by conservation of diluted, refrigerated, or frozen ram semen). *Agrociencia*, 42:399–406. URL : <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30211241002>
14. Sundararaman M.N., Edwin M.J. (2008) Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol-equilibration and the relevance to cryopreservation. *Asian J. Cell Biol.*, 3:22–33. DOI : 10.3923/ajcb.2008.22.33.