

В. С. Пушкина, Е. А. Корочкина

Сравнительная характеристика протоколов криоконсервации спермы баранов-производителей

Аннотация.

Цель: изучение и сравнение протоколов криоконсервации спермы баранов-производителей.

С каждым днем популярность овцеводства в России увеличивается, поскольку овцы неприхотливы в содержании и вместе с тем являются полипродуктивными животными, предоставляющими населению необходимое сырье (шерсть, войлок) и продукты питания (мясо, молоко). По этой причине искусственное осеменение имеет основополагающее значение в развитии данной отрасли животноводства, важной частью которого является корректная криоконсервация спермы баранов. Использование криоконсервированных сперматозоидов имеет достаточно преимуществ. Криоконсервация спермы баранов способствует распространению использования искусственного осеменения в данной отрасли животноводческой промышленности. Технология заморозки в значительной степени обеспечивает сохранение генетического материала и его транспортировку, устраняя географические барьеры в применении искусственного осеменения, позволяет повысить нагрузку на самца-производителя без риска для его репродуктивного здоровья. Однако в процессе криоконсервации сперма баранов получает необратимые повреждения из-за холодового шока, осмотического стресса и окислительных процессов, которые приводят к снижению способности к оплодотворению сперматозоидов. Так, может быть поврежден хроматин, увеличена проницаемость мембран, возможны гиперокисление и образование активных форм кислорода, что влияет на способность к оплодотворению. В итоге замороженная сперма баранов может иметь низкую фертильность. По этой причине крайне важно подобрать актуальный протокол замораживания и оттаивания с максимальным восстановлением жизнеспособных и функциональных сперматозоидов данного вида животного для успешного дальнейшего использования при искусственном оплодотворении. Технологические достижения в различных областях биотехнологии привели к улучшению протоколов, методов и оборудования, используемых в лаборатории, что положительно влияет на надежность, точность процедуры. В данной статье собраны исследования о влиянии различных процедур криоконсервации, скорости, времени охлаждения и протоколов оттаивания на качество спермы баранов. Кроме того, был сформирован корректный протокол криоконсервации спермы романовской породы, исходя из результатов собственного исследования.

Ключевые слова: сперма, протоколы криоконсервации, бараны, видовые особенности.

Авторы:

Пушкина В. С. – e-mail: pushkina_varechka@mail.ru;

Корочкина Е. А. – кандидат ветеринарных наук; e-mail: e.kora@mail.ru.

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины; 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5.

Введение. В настоящее время с ростом населения повышается спрос на доступ к продовольствию сельского хозяйства, что приводит к потребности овцеводческих ферм быть максимально эффективными в разведении. По этой причине искусственное осеменение имеет основополагающее значение в развитии животноводства, важной частью которого является корректная криоконсервация спермы баранов. При этом требуется понимание репродуктивной динамики животного, а также разработка новых технологий заморозки, учитывая, что качество спермы в основном зависит от ее способности выдерживать изменения температуры без потери основных функций.

Повреждение, которое происходит во время криоконсервации, является результатом воздействия колебания температуры (температурный стресс), что приводит к образованию кристаллов льда внутри клетки и в окружающей среде. Кроме того, происходят изменения при осмотическом стрессе. При всех этих процессах плазматическая мембрана является основной необратимо пораженной структурой из-за изменений липидно-белковых комплексов во время замораживания и оттаивания. Замораживание снижает целостность плазматической мембраны и акросом, подвижность, метаболическую и митохондриальную активности. Кроме того, крио-

консервация увеличивает фрагментацию ДНК [1]. Несомненно, технологические достижения в различных областях биотехнологии привели к улучшению протоколов, методов и оборудования, используемых в лаборатории, что положительно влияет на надежность, точность процедуры. Подходящее сочетание режимов охлаждения позволяет успешно проводить криоконсервацию биологического материала баранов, что, в свою очередь, обуславливает благоприятное искусственное осеменение, выведение новых пород и развитие экономики в данном секторе.

В связи с важностью и актуальностью данной темы многие ученые проводят исследования с целью разработки актуальных протоколов заморозки и разморозки спермы баранов без значительной потери ее функциональных и морфологических свойств [2].

Цель исследования: изучение и сравнение протоколов криоконсервации спермы баранов-производителей.

Характеристика протоколов криоконсервации.

Каждое животное имеет состав и свойства спермы, характерные для своего вида. В связи с этим существуют сложности в выборе и использовании конкретного протокола криоконсервации.

Криоконсервация может проводиться двумя основными способами: медленное замораживание и витрификация. Первый способ подразумевает постепенное удаление воды из клеток и замену ее криопротектором, во втором случае происходит практически мгновенное замораживание без кристаллизации. Криоконсервация спермы мелких жвачных практикуется уже несколько десятилетий. Были разработаны основные принципы криоконсервации спермы мелких жвачных животных, в которые в дальнейшем вносились корректировки. Так, после разбавления сперму медленно охлаждают до 5°C в течение 1,5-2 ч, загружают в соломинки и замораживают в парах жидкого азота. Окончательное разведение спермы перед криоконсервацией обычно составляет от 100 до 200 млн сперматозоидов на мл. Находясь в жидком азоте, замороженная сперма может храниться на протяжении многих лет.

National Animal Germplasm Program (NAGP) - программа, созданная департаментом сельского хозяйства США, предоставляет множество протоколов криоконсервации различных животных. Образцы спермы баранов разбавляют в один этап средой до конечной концентрации

400x10⁶ сперматозоидов/мл и охлаждают до 5°C в течение 90-120 мин. Образцы загружают в соломинки объемом 0,5 мл и замораживают. Замораживание возможно осуществить одним из двух способов:

1) замораживание в боксе: образцы помещают на штатив и замораживают в парах жидкого азота (на 4 см выше жидкого азота) в течение 10 мин и погружают в жидкий азот для хранения;

2) замораживание с помощью морозильника: образцы замораживают с использованием Cryo Bio System Mini Digitcool UJ400 (IMV Corporation, Миннеаполис, Миннесота) по следующей кривой: от 5°C до -10°C при 5°C/мин; от -10°C до -130°C при 60°C/мин, а затем погружают в жидкий азот для хранения.

Криоконсервированные образцы оттаивают в течение 30 секунд на водяной бане при 37°C [3].

Айбазова М. М. (2021) с соавт. производили постепенную криоконсервацию спермы баранов. Материал был получен от 5-ти баранов с помощью искусственной вагины (40-41°C), далее производили оценку полученного эякулята. Для каждого образца спермы использовался разбавитель в соотношении 1:3. Далее произведена упаковка разбавленных образцов спермы в пайетты объемом 0,25 мл. После чего подготовленную сперму эквilibрировали (уравновешивали) в течение 180 мин при 4°C. Соломинки замораживались в парах жидкого азота (T= -85...-95°C). Замораживание производилось поэтапно, в 4 фазы: 1-я фаза охлаждения длилась в течение 3 мин на расстоянии 15,0 см, 2-я фаза — 5 мин на расстоянии 9,0 см, 3-я фаза — 6 мин на расстоянии 5,0 см, 4-я фаза — 8 мин на расстоянии 2,0 см, после чего соломинки помещались в гоблеты и опускались в жидкий азот (-196°C). Для оттаивания соломинки помещались в специальный оттаиватель СИТО (IMV) при t = 38,0°C. Размороженную сперму из каждой соломинки смешивали с 0,5 мл предварительно подогретого до 35°C физиологического раствора с рН 7,0 и инкубировали в термостате в течение нескольких часов. Далее производили оценку спермы. Процент спермиев без повреждений после оттаивания в среднем составил около 36,9. При дальнейшем размораживании этот показатель уменьшался в связи с гибелью сперматозоидов и их структурными изменениями [4].

В исследовании Айбазова М. М. и Мамонтовой Т. В. (2020) при оценке качественных показателей спермы барана, криоконсервированной при разных технологиях, разбавляли биологический материал в соотношении 1:2. Эквilibра-

цию разбавленной спермы в соломинках проводили в холодильнике при температуре 2...4 °C в течение 180 мин. Был использован следующий метод витрификации: в течение 10 мин соломинки укладывали над парами жидкого азота на уровне 3...4 см. Далее помещали в сосуд Дьюара с жидким азотом. Оттаянную сперму оценивали на подвижность по десятибалльной шкале после дополнительного разбавления в отношении 1:2 3,1%-ным изотоническим раствором лимоннокислого натрия. Сперма баранов, замороженная в пайётах, обладала достаточно высокими качественными показателями после дефростации. Выявлено, что криорезистентность спермы баранов была на высоком уровне и подвижность спермиев после оттаивания колебалась незначительно: от 4,3 до 4,7 баллов [5].

В статье Tibary A., Manaro S. (2018) описан протокол, согласно которому после разбавления сперму медленно охлаждают до 5 °C в течение как минимум 1,5-2 ч, загружают в соломинки и замораживают в парах жидкого азота. Окончательное разведение спермы перед криоконсервацией обычно составляет от 100 до 200 млн сперматозоидов на мл. Увеличение концентрации выше 400 млн на мл приводит к снижению качества после оттаивания. Криопротекторы добавляют в один или два этапа (после охлаждения). Скорость замораживания, обычно используемая для криоконсервации спермы мелких жвачных, находится в диапазоне от -10 °C до -100 °C/мин.

В исследовании спермы баранов, проведенном Tibary A. с соавтор. (2018), было определено, что наилучшая скорость замораживания составляет -40 °C/мин. При этом сперму разводят в трис-глюкозе и охлаждают при 4 °C в течение 2 ч в соломинках объемом 0,25 мл [6].

В своей работе Barbas J. P. и другие (2023) после сбора спермы от 10-ти баранов разбавляли эякулят для обеспечения концентрации, равной 800×10^6 сперматозоидов/мл. Затем разбавленная сперма была упакована в соломинки объемом 0,25 мл. Заполненные соломинки охлаждали до 4 °C в течение 4 ч (период равновесия) в холодильной камере. Затем соломинки были помещены горизонтально на 4 см выше уровня жидкого азота с дальнейшей заморозкой в парах азота при -120 °C в течение 20 мин и дальнейшим погружением в жидкий азот при -196 °C.

Через неделю после замораживания соломинки размораживались в водяной бане при температуре 38 °C в течение 1 мин. После чего сперма была разбавлена в 1 мл солевого раствора и гомогенизирована в течение 90 сек. Через 2 минуты

аликвота спермы (10 мкл) была использована для оценки подвижности, жизнеспособности и морфологических дефектов. По результатам данного исследования в размороженной сперме наблюдалось значительное снижение на 28,5 % жизнеспособности и 35,5 % подвижности, а также увеличение на 54,5 % аномалий в морфологии [7].

В исследовании, проведенном Diego A. и др. в 2019 г., приводится сравнение протоколов замораживания спермы барана в парах азота с начальной низкой скоростью охлаждения на первом этапе, за которым следует более высокая скорость охлаждения с образованием кристаллов льда. Эякуляты спермы, полученные от двенадцати взрослых баранов, разбавляли и замораживали в разведении 100×10^6 сперматозоидов/мл, используя три протокола заморозки. Суть первого протокола состояла в трехступенчатом замедленном охлаждении: от +5 °C до -35 °C (40 °C/мин), от -35 °C до -65 °C (17 °C/мин), а затем от -65 °C до -85 °C (3 °C/мин); второго протокола - в трехступенчатом ускоренном охлаждении: от +5 °C до -5 °C (4 °C/мин), от -5 °C до -110 °C (25 °C/мин), а затем от -110 °C до -140 °C (35 °C/мин). В третьем протоколе использовалось двухступенчатое ускоренное охлаждение: от +5 °C до -10 °C (5 °C/мин), а затем от -10 °C до -130 °C (60 °C/мин). В конце каждая проба помещалась в жидкий азот (-196 °C). Все замороженные образцы спермы размораживали через три месяца, помещая соломинки в водяную баню при 37 °C на 30 секунд. Качество спермы после размораживания было снижено во всех протоколах ($p < 0,05$) по сравнению со свежеполученной спермой. Проценты характеристик подвижности сперматозоидов после оттаивания и сперматозоидов с неповрежденной плазматической мембраной, неповрежденной акросомой и неповрежденной митохондриальной мембраной были выше при использовании третьего протокола, чем при первом ($p < 0,01$) и втором ($p < 0,05$). Кроме того, процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК после оттаивания был ниже ($p < 0,05$) при использовании третьего протокола по сравнению с первым. Настоящие результаты показывают, что быстрая скорость охлаждения обеспечила лучшую выживаемость и функционирование спермы барана после оттаивания, чем более низкая (и / или замедленная) скорость охлаждения [8].

Целью работы Vozaf J. с соавт. (2020) явилось сравнение трех словацких пород овец по качественным параметрам криоконсервированной спермы. Эякуляты баранов ($n = 12$) собирали с помощью электроэякуляции. Каждую пробу разбавляли в соотношении 1:10 (сперма : разбави-

тель). Затем соломинки объемом 250 мкл наполнили разбавленной спермой, запечатывали, помещали в штативы и уравнивали в холодильнике при 4°C в течение 6 ч.

После уравнивания соломинки переносили в предварительно охлажденный автоматический морозильный бокс. Программа замораживания запускалась автоматически при закрытии крышки. После чего пары азота заполняли бокс для обеспечения следующего температурного профиля (+4 °C, -10 °C (120 сек), -80 °C (450 сек), -120 °C (100 сек) и -140 °C (180 сек). По истечении установленного времени соломинки для спермы погружали в жидкий азот (-196 °C). Через одну неделю образцы размораживали, погружая соломинки в водяную баню (42°C, 15 сек), переносили в пробирки и анализировали полученные образцы. Согласно результатам проведенных исследований, данный режим криоконсервации подходит для спермы словацких пород, без значительной потери подвижности, морфологии, жизнеспособности и оплодотворяющей способности [9].

В исследовании Najafi A. с соавт. (2023) сперму отбирали из придатков семенников 25 баранов (4-5 лет). Образцы центрифугировали при 70000 оборотов в течение 10 мин; затем суспензия спермы помещалась в раствор Трис на 15 мин, и далее производилась оценка полученного материала. Сперма с подвижностью 80% или выше и общей частотой морфологической аномалии 10% или менее была разбавлена до конечной концентрации 250×10^6 сперматозоидов/мл. Разбавитель состоял из 2,71 г раствора Трис, 1,4 г лимонной кислоты и 1 г фруктозы в 100 мл дистиллированной воды, содержащей 7% (v/v) глицерина и 20% (v/v) яичного желтка.

Сперму с подвижностью менее 80 % и общими аномалиями более 10 % также разбавляли. Материал охлаждался до 4°C при 2 ч, а затем загружался в соломинки объемом 0,25 мл и запечатывался для герметизации. Соломинки погружались в жидкий азот после того, как удерживались на 4 см выше уровня жидкости в течение 7 минут. Соломинки размораживали при 37 °C в течение 30 сек в водяной бане после замораживания не менее 4 недель, а затем сперма была извлечена и проанализирована. Морфология спермы существенно не изменилась [10].

В работе Mehdinour M. (2022) сразу после сбора спермы образцы были исследованы на объем, концентрацию и прогрессирующую подвижность, затем для эксперимента были использованы образцы спермы объемом 0,5-1,5 мл, с подвижностью выше 80 %, аномальной морфо-

логией менее 10 % и концентрацией спермы выше 3×10^9 . Затем объем полученной спермы был нагрет до 37°C и разбавлен с помощью Трис разбавителя с использованием 7% (v/v) глицерина и 0 (контроль), 20, 40, 60 и 80 мкл росиглитазона. В данном исследовании после разбавления сперма постепенно охлаждалась в холодильнике при температуре 4°C в течение 2 ч. Затем, сразу после охлаждения образцов, они были помещены в соломинки 0,25 мл. На следующем этапе соломинки были размещены на расстоянии 4 см над поверхностью азота. Через 7 мин они были погружены в жидкий азот (-196° C), а затем были перенесены в азотный резервуар. Для оценки криоконсервированные соломинки размораживались в водяной бане при 37°C в течение 30 сек. Как результат, концентрация 60 мкл росиглитазона привела к самой высокой ($P < 0,05$) общей подвижности, прогрессирующей подвижности и прямой скорости [11].

Aisen E. с соавтор. (2005) получали эякулят от трех баранов. Сперма была разбавлена до 1×10^9 сперматозоидов/мл, охлаждалась до 5°C, загружалась в соломинки 0,25 мл, замораживалась и хранилась в жидком азоте. Криоконсервированные соломинки размораживались в водяной бане при 37°C в течение 30 сек. Оценка производилась через 3 ч после разморозки и была основана на гипоосмотическом тесте, электронной микроскопии и биохимических параметрах, таких как перекисное окисление липидов и пониженный и общий уровень глутатиона, измеренные после разморозки. Гипоосмотический тест показал, что процент неповрежденных плазматических мембран после заморозания и размораживания был значительно выше с гипертоническим разбавителем, содержащим трегалозу. Оценка мембраны с помощью ультрамикроскопии также показала лучшую криоконсервацию сперматозоидов по сравнению с другими растворителями, наблюдалось значительное сокращение количества поврежденных мембран (27%, $p < 0,0002$) [4].

Глицерин является наиболее широко используемым средством для криоконсервации сперматозоидов. В работе Anel L. (2003) было протестировано три метода замораживания спермы баранов, упакованной в соломинку объемом 0,25 мл (конечная концентрация: 100×10^6 сперматозоидов/мл). Первый метод: 2/3 объема разбавителя раствора А (без глицерина) были добавлены в чистую сперму при 35 °C. Образец был охлажден до 5°C (-0,30°C/мин), далее была добавлена 1/3 объема разбавителя раствора В (концентрация глицерина 4%) образец охлаждался при температуре 5°C в течение 2 ч. Затем он был замо-

рожен в программируемом биоморозильнике ($-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -100°C). При втором методе образец был разбавлен специфическим раствором при 35°C (концентрация глицерина 3 %), охлаждался до 5°C ($-0,20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) в течение 2 ч. После этого, он был заморожен в парах азота. В третьем методе сперма была разбавлена 1:1 (концентрация глицерина 2%) и охлаждена до 5°C ($-0,25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Затем образец был снова разбавлен в том же растворе (концентрация глицерина 4%) и охлаждался 1 час при температуре 5°C , а затем замораживался в программируемом биоморозильнике ($-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -100°C). Лучшая общая и прогрессивная подвижности (75,8 и 55,18 %) были получены с помощью третьего метода. Первый и третий методы показали значительно более высокие значения ($P<0,05$) для кинетических параметров: средняя скорость пути (VAP) (81,3 и 85,2 мкм/с), прямая скорость (VSL) (72,8 и 77,3 мкм/с) и линейность (LIN) (66,6 и 68,8%). Второй метод показал самые низкие кинетические параметры подвижности (VAP-74,4 мкм/с, VSL-67,3 мкм/с и LIN-62,5 %) и самый высокий процент клеток с поврежденной плазматической мембраной (53,8 %). Авторы пришли к выводу, что использование разбавителя с добавлением глицерина (до 2% при 35°C и до 4% при 5°C) в два этапа является продуктивным методом замораживания спермы баранов [13].

В исследовании Kumar D. с соавт. (2009) образцы спермы с хорошей исходной подвижностью, полученные от взрослых баранов, объединяли, разбавляли до 1×10^9 сперматозоидов/мл с помощью разбавителя Eggyolk-Test-glycerol и упаковывали в соломинки 0,25 мл. Соломинки первой группы охлаждали в программируемом морозильнике от 25°C до 5°C со скоростью $0,15^{\circ}\text{C}$ в минуту с последующей выдержкой в течение 2 ч. для уравнивания, а соломинки второй группы медленно охлаждали до 5°C и уравнивали в течение 2 ч в холодильной камере. После уравнивания соломинки 2-й группы также загружали в морозильную камеру для замораживания соломинок обеих групп одновременно от 5°C до -125°C со скоростью 25°C в мин. Оттаивание соломинок проводили при 50°C в течение 10 сек, а размороженные сперматозоиды подвергали испытанию на термостойкость при 37°C в течение 4 ч. Образцы оценивали сразу после оттаивания, с часовым интервалом на характеристики движения сперматозоидов с помощью метода компьютерного анализа спермы. Инкубированные после оттаивания сперматозоиды также оценивали через 0, 1, 2, 3 и 4 ч на целостность акросом после

окрашивания высушенных мазков спермы красителем Гимза. Процент подвижности, количества быстроподвижных сперматозоидов, линейности и сперматозоидов с нормальной акросомой был значительно ($P<0,05$) выше в 1-ой группе по сравнению со 2-ой группой. Результаты показали, что контролируемая скорость охлаждения обеспечивает лучшую криоконсервирующую способность сперматозоидов после оттаивания по сравнению с неконтролируемой скоростью охлаждения [14].

Bag S. с соавтор. (2002) было проведено исследование с целью изучения влияния начальной температуры заморозания на подвижность сперматозоидов баранов после оттаивания. Сперму, полученную от баранов, объединяли и разбавляли с концентрацией 1000 млн сперматозоидов на мл разбавителем TEST-yolk-glycerol. Разбавленные образцы спермы загружали в соломинки объемом 0,25 мл и охлаждали до температуры -25°C , -75°C или -125°C со скоростью $-25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в контролируемых условиях перед погружением в жидкий азот для хранения. Размораживание соломинок проводили при температуре 50°C на водяной бане в течение 10 сек, а характеристики подвижности замороженных-размороженных сперматозоидов оценивали с помощью компьютерного метода анализа сперматозоидов. Начальная температура заморозания существенно повлияла на подвижность сперматозоидов после оттаивания. Процент подвижности сперматозоидов после оттаивания был значительно выше при начальной температуре замораживания -125°C и ниже при -25°C или -75°C . Процент среднеподвижных сперматозоидов был одинаковым при всех трех начальных температурах заморозания. Процент медленно подвижных и линейных сперматозоидов варьировался ($P<0,01$) между различными температурами заморозания. Криволинейная скорость, средняя траекторная скорость и прямолинейная скорость сперматозоидов были выше ($P<0,01$) при -125°C , чем при -25°C или -75°C . Исследование показывает, что начальная температура замораживания оказывает значительное влияние на подвижность и скорость сперматозоидов после оттаивания. Наилучшая подвижность сперматозоидов после оттаивания была достигнута при температуре заморозания -125°C [15].

Ba-Awadh H. с коллегами (2022) производили сбор образцов спермы баранов с помощью искусственной вагины ($n=20$). Образцы спермы оценивали макроскопически и микроскопически. Для дальнейшей обработки использовали только эякуляты, соответствующие следующим парамет-

рам: объем 1,5 мл, оценка 4 по шкале массовой активности, прогрессивная подвижность 80 % и концентрация сперматозоидов 2×10^9 . Эякуляты были объединены для исключения индивидуальных различий баранов. В данном исследовании использовались семь объединенных эякулятов.

Объединенные эякуляты постепенно разбавляли 1:4 трис-глицериновым разбавителем на основе яичного желтка. Разбавленную сперму постепенно охлаждали в течение менее двух часов с 30°C до 5°C. Разбавленную и охлажденную сперму помещали в соломинки объемом 0,25 мл и оставляли при 5°C на 2 часа для уравнивания. После достижения равновесия соломинки замораживали в парах жидкого азота по двум различным протоколам. В протоколе быстрого замораживания соломинки фиксировали на высоте 5 см над поверхностью жидкого азота на 15 минут. В соответствии с протоколом медленного замораживания соломинки фиксировали на высоте 8 см над поверхностью жидкого азота на 20 минут. Затем соломинки хранили при температуре -196 °C после погружения в жидкий азот.

Замороженные соломинки оттаивали в течение 30 сек на водяной бане при 37°C. Образцы спермы оценивались дважды. Первый — после достижения равновесия (до замораживания), а второй — через 48 ч после криоконсервации. По результатам исследования не было выявлено негативного влияния протокола замораживания на общую подвижность спермы, целостность плазматической мембраны и целостность ДНК. Однако жизнеспособность, быстрая прогрессивная подвижность, скорость прямолинейности, средняя скорость пути, линейность и колебание были значительно выше при быстром замораживании, чем в протоколе медленного замораживания. Криоконсервация спермы баранов с использованием протокола быстрого замораживания (5 см на 15 мин) является более результативным, чем протокол медленного замораживания (8 см в течение 20 мин) [16].

Yamashiro H. с соавт. (2020) осуществляли сбор спермы методом электроэякуляции. Первый протокол замораживания выполнялся путем двухэтапного разведения. В опыте сперму разбавляли раствором трис-лимонной кислоты-глюкозы (ТКГ). Разбавленную сперму делили на пять аликвот, каждую из которых суспендировали в трегалозе с растворами ТКГ-яичного желтка при 27°C. Образцы спермы охлаждали до 10°C в течение 2 ч. Затем их дополнительно разбавляли равным объемом различных растворов трегалозы с наполнителем ТКГ-яичного желтка, со-

державшего 8% глицерина. Затем разбавленную сперму уравнивали при 10°C в течение от 30 мин до 2 ч перед замораживанием.

Аликвоты по 0,25 мл суспензии спермы помещали в соломинки и запаивали их концы. Затем соломинки помещали в пары жидкого азота на 10 мин, а затем погружали непосредственно в жидкий азот. В эксперименте по второму протоколу сбор спермы производился с помощью электроэякуляции в максимально стерильных от мочи условиях. Собранную сперму суспендировали разбавителями яичного желтка с пятью различными концентрациями рафинозы при 27°C. Затем образцы охлаждали в течение 4 ч в холодильнике при 10°C. К объемам спермы добавляли равные объемы раффинозы с наполнителем ТКГ-яичного желтка, содержащего 8% глицерина. Затем разбавленную сперму уравнивали при 10°C в течение от 30 мин до 2 ч перед замораживанием. Наконец, соломинку объемом 0,25 мл помещали в пары жидкого азота на 10 мин, а затем непосредственно погружали в жидкий азот.

Замороженную сперму размораживали, помещая соломинки на 10 сек в водяную баню при 37°C. Затем соломинки помещали при комнатной температуре (27°C) на 5 мин, после чего подвергали анализу после оттаивания. Оценивали подвижность.

Эякуляты от разных баранов, имеющие густую консистенцию, оценивали на индивидуальную подвижность сперматозоидов сразу после разбавления раствором ТКГ с помощью субъективной оценки под микроскопом. Также оценивали подвижность сперматозоидов после замораживания, оттаивания и инкубации, а также после инкубации при 37°C в течение 1, 2 и 3 ч. Замораживание сперматозоидов в различных концентрациях трегалозы с разбавителем ТКГ-яичный желток обычно приводило к увеличению подвижности после оттаивания. Сперматозоиды демонстрировали значительно ($P < 0,05$) более высокую подвижность по сравнению со сперматозоидами, разбавленными с помощью наполнителя без трегалозы. Не было установлено существенной разницы в подвижности сперматозоидов после оттаивания для разбавителей, которые были дополнены концентрациями трегалозы после 3-часовой инкубации. Однако, когда сперматозоиды были заморожены в более высокой концентрации трегалозы, они сохраняли более высокую подвижность после оттаивания в течение 3-часового теста на термостойкость, чем сперматозоиды, замороженные в разбавителе с добавлением более низкой концентрации трегалозы [17].

В исследованиях, проведенных Корочкиной Е. А. с соавт. (2023), был усовершенствован протокол заморозки спермы баранов романовской породы ($n=10$). Проводили центрифугирование спермы в течение 15 мин со скоростью 7000 об/мин, далее совокупность спермиев разбавляли в соотношении 1:4 (разбавитель OptiX-cell, IMV), охлаждали при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5 часов для стабилизации взаимодействия между спермой и средой. После чего производили упаковку разбавленной спермы в пайеты объемом 0,25 мл при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Протокол заморозки образцов спермы состоял из двух этапов: 1 - соломинки помещали в гоблеты 4 см над жидким азотом в течение 10 мин; 2 - производили полное погружение в жидкий азот для дальнейшего хранения. Оттаивание спермы производилось при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек, далее осуществляли оценку спермы через 1 ч и 2 ч после оттаивания. По результатам данной работы было установлено выраженное уменьшение процента прогрессивно двигающихся сперматозоидов после оттаивания

на 22,6 % ($p \leq 0,01$), через 1 ч после оттаивания на 24,8 % ($p \leq 0,05$), через 2 ч - на 33,7 % ($p \leq 0,01$) [18].

Заключение. Таким образом, учитывая слабую устойчивость сперматозоидов баранов к резкому перепаду температуры и осмотическому шоку по причине низкого содержания холестерина и фосфолипидов в их половых гаметах, существующие протоколы криоконсервации спермы данного вида животных способствуют использованию замороженной спермы для искусственного осеменения овец. Нужно также отметить, что успешность криоконсервации зависит от таких факторов как состав разбавителя, степень разведения и режим центрифугирования, длительность охлаждения, а также сам процесс заморозки и оттаивания спермы. Наиболее эффективным является использование протокола быстрого замораживания спермы. Для развития отечественного овцеводства необходимо утвердить протоколы криоконсервации спермы, адаптированные для существующих производственных условий.

Литература

1. Saha A. Cryopreservation Techniques for Ram Sperm / A. Saha, M. Asaduzzaman, F. Y. Bari // *Veterinary medicine international*. – 2022. – P. 1-16.
2. Yanez-Ortiz I. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep / I. Yanez-Ortiz, J. Catalan, J. E. Rodriguez-Gil, J. Miro, M. Yeste // *Animal Reproduction Science*. – 2022. – Vol. 246. – P. 1-17.
3. Purdy P. Ram Semen Processing, Cryopreservation and Non-surgical Insemination Protocol. 2017; 5.
4. Айбазов М. М. Сравнительная характеристика спермы барана, замороженной в разных экстендерах / М. М. Айбазов, А. Н. Шевченко и др. // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. – 2021. – № 4. – С. 63-78.
5. Айбазов М. М. Качественные показатели спермы барана, криоконсервированной при разных технологиях / М. М. Айбазов, Т. В. Мамонтова // *Сельскохозяйственный журнал*. – 2020. – № 2 (13). – С. 39-45.
6. Tibary A. Cryo-preservation of sperm and embryos in small ruminants / A. Tibary, S. Manar // *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Veterinaires*. – 2018. – № 6(2). – P. 152-210.
7. Barbas J. P. Ram Semen Cryopreservation for Portuguese Native Breeds: Season and Breed Effects on Semen Quality Variation / J. P. Barbas, J. Pimenta et al. // *Animals*. – 2023. – № 13(4):579. – P. 1-14.
8. Diego A. Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols / D. A. Galarza, A. Lopez-Sebastian et al. // *Cryobiology*. – 2019. – Vol. 91. – P. 84-89.
9. Vozaf J. The Cryopreserved Sperm Traits of Various Ram Breeds: Towards Biodiversity Conservation / J. Vozaf, A. Svoradova et al. // *Animals : an open access journal from MDPI*. – 2020. – Vol. 12(10): 1311. – P. 1-13.
10. Najafi A. Enhancing post-thaw quality of ram epididymal sperm by supplementation of rutin in cryopreservation extender / A. Najafi, H. Mohammadi, S. D. Sharifi // *Scientific Reports*. – 2023. – 13. – P. 1-10.
11. Mehdipour M. Protective effect of rosiglitazone on microscopic and oxidative stress parameters of ram sperm after freeze-thawing / M. Mehdipour, H. A. Daghigh-Kia et al. // *Scientific Reports*. – 2022. – № 12. – P. 1-10.

12. Aisen E. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders / E. Aisen, M. Quintana et al. // Cryobiology. — 2005. — Vol. 50 (3). — P. 239-249.
13. Anel L. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen / L. Anel, P. de Paz, M. Alvarez et al. // Theriogenology. — 2003. — Vol. 60 (7). — P. 1293-1308.
14. Kumar D. Effect of post-thaw incubation on semen characteristics of ram spermatozoa cryopreserved under controlled and uncontrolled rate of cooling / D. Kumar, A. Joshi, S. M. K. Naqvi // Anim. Reprod. — 2009. — Vol. 6 (4). — P. 526-534.
15. Bag S. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment / S. Bag, Joshi et al. // Small Ruminant Research. — 2002. — Vol. 43(1). — P. 23-29.
16. Ba-Awadh H. Comparison between rapid and slow cryopreservation protocols for ram semen / H. A. Ba-Awadh, I. O. Olarinre et al. // Slovenian veterinary research. — 2022. — Vol. 60. — P. 249-257.
17. Yamashiro H. A case study on cryopreservation of African sheep semen for the Red Maasai, Dorper breeds and their crosses / H. Yamashiro, J. R. Wando et al. // International Journal of Agricultural Sciences. — 2020. — Vol. 10 (4). — P. 1-5.
18. Корочкина Е. А. Качество спермы баранов до и после криоконсервации / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, Д. Е. Главацкая, В. С. Пушкина // Ветеринария. — 2023. — № 8. — С. 34-38.

Pushkina V., Korochkina E.

Comparative characteristics of protocols for cryopreservation of ram semen

Abstract.

Purpose: study and comparison of protocols for cryopreservation of sperm of stud rams.

Every day the popularity of sheep farming in Russia is increasing, since sheep are unpretentious in maintenance and at the same time they are multiproduct animals, providing the population with the necessary raw materials (wool, felt) and food products (meat, milk). For this reason, artificial insemination is of fundamental importance in the development of this branch of livestock farming, an important part of which is the correct cryopreservation of ram sperm. There are quite a few advantages of using cryopreserved sperm. Cryopreservation of sheep sperm contributes to the spread of the use of artificial insemination in this branch of the livestock industry. Freezing technology largely ensures the preservation of genetic material and its transportation, eliminating geographical barriers in the use of artificial insemination, and allows increasing the load on the ram sire without risk to his reproductive health. However, during the process of cryopreservation, sheep sperm receives irreversible damage due to cold shock, osmotic stress and oxidative processes, which lead to a decrease in the ability to fertilize sperm. Thus, chromatin may be damaged, membrane permeability increased, hyperoxidation and the formation of reactive oxygen species are possible, which affects the ability to fertilize. As a result, frozen ram semen may have low fertility. For this reason, it is extremely important to select an up-to-date freezing and thawing protocol with maximum recovery of viable and functional sperm of a given animal species for successful further use in artificial insemination. Technological advances in various fields of biotechnology have led to improvements in protocols, methods and equipment used in the laboratory, which have a positive impact on the reliability, accuracy of the procedure. This article summarizes research on the effects of different cryopreservation procedures, cooling rates, cooling times and thawing protocols on ram semen quality. In addition, a correct protocol for cryopreservation of Romanov breed sperm was formed, based on the results of our own research.

Key words: sperm, cryopreservation protocols, rams, specific features.

Authors:

Pushkina V. – e-mail: pushkina_varechka@mail.ru;

Korochkina E. – PhD (Vet. Sci.); e-mail: e.kora@mail.ru.

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine; 196084, Russia, St. Petersburg, st. Chernihiv 5.

References

1. Saha A. Cryopreservation Techniques for Ram Sperm / A. Saha, M. Asaduzzaman, F. Y. Bari // *Veterinary medicine international*. – 2022. – P. 1-16.
2. Yanez-Ortiz I. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep / I. Yanez-Ortiz, J. Catalan, J. E. Rodriguez-Gil, J. Miro, M. Yeste // *Animal Reproduction Science*. – 2022. – Vol. 246. – P. 1-17.
3. Purdy, P. Ram Semen Processing, Cryopreservation and Non-surgical Insemination Protocol. 2017; 5.
4. Aibazov M. M. Comparative characteristics of the sperm of a ram, frozen in different exteals / M. M. Aibazov, A. N. Shevchenko and others // *News of the Timiryazevsky Agricultural Academy*. – 2021. – № 4. – P. 63-78.
5. Aibazov M. M. High -quality indicators of the sperm of a ram, cryoconserved with different technologies / M. M. Aibazov, T. V. Mamontova // *Agricultural Journal and*. – 2020. – № 2 (13). – P. 39-45.
6. Tibary A. Cryo-preservation of sperm and embryos in small ruminants / A. Tibary, S. Manar // *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Veterinaires*. – 2018. – № 6 (2). – P. 152-210.
7. Barbas J. P. Ram Semen Cryopreservation for Portuguese Native Breeds: Season and Breed Effects on Semen Quality Variation / J. P. Barbas, J. Pimenta et al. // *Animals*. – 2023. – № 13 (4):579. – P. 1-14.
8. Diego A. Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols / D. A. Galarza, A. Lopez-Sebastian et al. // *Cryobiology*. – 2019. – Vol. 91. – P. 84-89.
9. Vozaf J. The Cryopreserved Sperm Traits of Various Ram Breeds: Towards Biodiversity Conservation / J. Vozaf, A. Svoradova et al. // *Animals : an open access journal from MDPI*. – 2020. – Vol. 12 (10): 1311. – P. 1-13.
10. Najafi A. Enhancing post-thaw quality of ram epididymal sperm by supplementation of rutin in cryopreservation extender / A. Najafi, H. Mohammadi, S. D. Sharifi // *Scientific Reports*. – 2023. – № 13. – P. 1-10.
11. Mehdipour M. Protective effect of rosiglitazone on microscopic and oxidative stress parameters of ram sperm after freeze-thawing / M. Mehdipour, H. A. Daghigh-Kia et al. // *Scientific Reports*. – 2022. – № 12. – P. 1-10.
12. Aisen E. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders / E. Aisen, M. Quintana et al. // *Cryobiology*. – 2005. – Vol. 50 (3). – P. 239-249.
13. Anel L. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen / L. Anel, P. de Paz, M. Alvarez et al. // *Theriogenology*. – 2003. – Vol. 60 (7). – P. 1293-1308.
14. Kumar D. Effect of post-thaw incubation on semen characteristics of ram spermatozoa cryopreserved under controlled and uncontrolled rate of cooling / D. Kumar, A. Joshi, S. M. K. Naqvi // *Anim. Reprod.* – 2009. – Vol. 6 (4). – P. 526-534.
15. Bag S. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment / S. Bag, Joshi et al. // *Small Ruminant Research*. – 2002. – Vol. 43 (1). – P. 23-29.
16. Ba-Awadh H. Comparison between rapid and slow cryopreservation protocols for ram semen / H. A. Ba-Awadh, I. O. Olarinre et al. // *Slovenian veterinary research*. – 2022. – Vol. 60. – P. 249-257.
17. Yamashiro H. A case study on cryopreservation of African sheep semen for the Red Maasai, Dorper breeds and their crosses / H. Yamashiro, J. R. Wando et al. // *International Journal of Agricultural Sciences*. – 2020. – Vol. 10 (4). – P. 1-5.
18. Korochkina E. A. Quality of the sperm of the rams before and after cryoconservation / E. A. Korochkin, E. Yu. Finageev, D. E. G. Peretsky, V. S. Pushkin // *Veterinary medicine*. – 2023. – № 8. – P. 34-38.