

**БІОРІЗНОМАНІТТЯ ТА ЕКОЛОГІЧНІ ПРОБЛЕМИ
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
BIODIVERSITY AND ENVIRONMENTAL PROBLEMS OF
NATURE MANAGEMENT**

УДК 57.086.13.16:601.2:576.31:591.463.1::636.2
doi 10.37143/2786-7730-2024-3(81)1

**ОЦІНКА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ
СПЕРМИ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ ЗА РІЗНОГО ТЕРМІНУ
ДОВГОТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ**

Г. В. Міненко,¹ Н. М. Бречка,^{2,3} О. В. Щербак⁴

¹Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН
вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, Україна, 36013

²ПЗВО «Харківський інститут медицини та біомедичних наук»
вул. Садова, 11, м. Харків, Україна, 61002

³ДУ «Інститут проблем ендокринної патології
ім. В. Я. Данилевського НАМН України»
вул. Алчевських, 10, м. Харків, Україна, 61002

⁴Державний біотехнологічний університет
вул. Алчевських, 44, м. Харків, Україна, 61002

Мета. У порівняльному аспекті дослідити морфофункціональний стан кріоконсервованої сперми бугаїв-плідників при зберіганні протягом 6 – 27 років при температурі – 196°C у рідкому азоті. **Методи.** Об'єктом дослідження була заморожена сперма плідників, що зберігалася протягом 6 – 10 або 20 – 27 років. При дослідженні якісних показників деконсервованої сперми застосовували метод візуальної оцінки за рухливістю та виживаністю, метод диференційного забарвлення барвниками трипановий синій/Гімза для визначення морфофункціональної цілісності мембран клітин та тест на здатність до зв'язування з везикулярними експлантами епітеліальних клітин яйцепроводу корів *in vitro*. **Результати.** Визначено, що подовження терміну зберігання спермодоз до 20 – 27 років не мало вірогідного впливу на функціональні характеристики спермій за показниками рухливості, виживаності та абсолютної виживаності. Метод диференційного забарвлення показав, що у загальному розподілі частка живих спермій з неушкодженою акросомою за обох досліджуваних періодів зберігання вірогідно не відрізнялася й становила 61,6 – 63,9 %. Частка мертвих клітин також вірогідно не відрізнялася й становила 26,4 % – при зберіганні до 10 років та 21,7 %

Міненко Галина Василівна, к. с.-г. н., с. н. с., доцент, с. н. с. лаб. наукових досліджень з питань інтелектуальної власності та маркетингу інновацій,

e-mail: 2727@ukr.net

<https://orcid.org/0009-0008-5801-9499>

Бречка Наталія Михайлівна, д. біол. н., с. н. с., професор кафедри соціально-гуманітарних та біомедичних дисциплін, пров. н. с. відділу експериментальної ендокринології,

e-mail: natalia01073@gmail

<https://orcid.org/0000-0001-6132-9705>

Щербак Олена Валентинівна, к. с.-г. н., професор, професор кафедри біотехнології, молекулярної біології та водних біоресурсів

e-mail: elenasherbak@ukr.net

<https://orcid.org/0000-0002-4265-3355>

– при зберіганні понад 20 років. Не виявлено вірогідної різниці й при загальній оцінці відсотка спермій із різним ступенем пошкодження акросомальної мембрани. Цей показник становив відповідно 22,5 та 26,0 %. Разом з тим при подовженні терміну зберігання кріоконсервованої сперми до 20 – 27 років спостерігалось вірогідне підвищення відсотка живих спермій з відсутньою акросомою ($p \leq 0,01$). Визначено, що індекс зв'язування спермій з експлантами епітеліальних клітин яйцепроводу *in vitro*, був вірогідно вищим при зберіганні протягом 6-10 років й становив відповідно $227,9 \pm 32,3$ проти $114,6 \pm 19,5$ при зберіганні протягом 20 – 27 років ($p < 0,05$). **Висновки.** Застосування традиційного методу оцінки якості сперми за показниками рухливості, виживаності та абсолютної виживаності спермій не виявило відмінностей при зберіганні кріоконсервованої сперми протягом 6 – 27 років. Разом із цим метод диференційного забарвлення показав вірогідне збільшення на 7,2 % частки живих спермій з відсутньою акросомою при подовженні терміну зберігання від 6 – 10 до 20 – 27 років. Тест на зв'язування спермій з епітеліальними клітинами яйцепроводу *in vitro* продемонстрував вірогідне зменшення індексу зв'язування спермій з клітинними експлантами при довготривалому зберіганні. Це може свідчити про зниження здатності таких спермій до запліднення.

Ключові слова: бугаї-плідники, спермії, кріоконсервація, тривале зберігання, диференційне забарвлення, яйцепровід, зв'язування спермій.

Посилатися на статтю так:

БІБЛІОГРАФІЯ за ДСТУ: Міненко Г. В., Бречка Н. М., Щербак О. В. Оцінка морфологічного стану кріоконсервованої сперми бугаїв-плідників за різного терміну довготривалого зберігання. *Свинарство і агропромислове виробництво* : міжвідом. темат. наук. зб. / Ін-т свинарства і АПВ НААН. Полтава, 2024. Вип. 3(81). С. 7–21. doi: 10.37143/2786-7730-2024-3(81)1

REFERENCES за APA style: Minenko, G. V., Brechka, N. M., & Shcherbak, O. V. (2024). Otsinka morfolofunktsionalnoho stanu kriokonservovanoi spermy buhaiv-plidnykiv za riznoho terminu dovyhotryvaloho zberihannia [Evaluation of the morphofunctional state of cryopreserved bull sperm at different periods of long-term storage]. *Svynarstvo i ahropromyslove vyrobnytstvo* [Pig Breeding and Agroindustrial Production]. Poltava, 3(81), 7–21 [in Ukrainian]. doi: 10.37143/2786-7730-2024-3(81)1

Вступ. Біологічна наука у ХХ ст. внесла до галузі тваринництва високоефективний метод штучного осіменіння тварин. Цей метод відкрив широкі можливості для ведення планомірної й ефективної племінної роботи у тваринництві та отримання практично необмеженого числа нащадків від видатних плідників з високим генетичним потенціалом [1].

Важко переоцінити значення для світової практики скотарства і розширення селекційно-племінної роботи методу кріоконсервації сперми бугаїв, розробка і впровадження якого почалося з 1950-х років [2]. Завдяки цьому відкриттю накопичено різноманітний чисельний генетичний матеріал – сотні мільйонів доз сперми від високоцінних бугаїв-плідників різних порід.

Тривале зберігання кріоконсервованої сперми набуває все більшого значення через те, що велике число порід і ліній тварин знаходиться під загрозою зникнення. Створення банку генів цінних порід різних видів сільськогосподарських тварин, що знаходяться на межі зникнення, є складовою частиною заходів щодо охорони природних багатств нашої планети [3].

Однак й дотепер, попри значні досягнення в розробці ефективних методів кріоконсервування сперми, рівень збереженості деконсервованих клітин зазвичай не перевищує 60 – 70 % [4].

До основних кріогенних пошкоджень сперміїв відносять: роз'єднання процесів дихання й окисного фосфорилування, руйнування ліпопротеїдної плазматичної мембрани, руйнування або ушкодження акросоми, пошкодження цілісності ДНК, порушення метаболізму клітини і процесів передачі клітинних сигналів [5, 6]. Все це зрештою може призвести до апоптозу і некротичної загибелі клітин. Проте ці кріогенні пошкодження не можна вважати за першопричину зниження рухливості й здатності деконсервованої сперми до запліднення. У ланцюзі взаємопов'язаних явищ, що відбуваються при заморожуванні, ці пошкодження є наслідком фізико-хімічних змін, які мають місце при заморожуванні й зберіганні сперми [4].

Згідно з літературними даними, існують різні думки про терміни і якість біопродукції, що зберігалася протягом тривалого часу в рідкому азоті [7–14]. За даними [14] кріоконсервовані чоловічі гаметоцити можуть зберігатися при –196°C за відповідних умов від 500 до 3400 років. Виходячи із даних [8] верхньою межею терміну зберігання клітин у стані анабіозу у рідкому азоті є 200 років.

У дослідженнях Leibo [9] проведених у 1994 р. було отримано живе потомство при використанні для запліднення поза організмом сперми плідника, що зберігалася протягом 37 років.

За даними Malik et al [7] життєздатність і рухливість сперміїв бугаїв-плідників, що зберігалися у рідкому азоті протягом 6 років були вірогідно нижчими порівняно з тими, що перебували в рідкому азоті 1 – 2 роки. У масштабних дослідженнях [10] виявлено вірогідне зниження рівня отелення при використанні для штучного осіменіння сперми, що зберігалася 5,5 – 6,5 років порівняно з коротшими термінами зберігання. Виходячи з даних [11] довготривале зберігання (понад 30 років) може негативно впливати на сперматологічні та окисні параметри сперміїв бугаїв.

Таким чином, у науковій літературі не існує єдиної думки з питання впливу тривалості процесу зберігання замороженої сперми на її запліднювальну здатність. Враховуючи вищевикладене, ми дослідили у порівняльному аспекті морфофункціональний стан кріоконсервованої сперми бугаїв при довготривалому зберіганні у рідкому азоті.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом дослідження була кріоконсервована сперма бугаїв-плідників, що зберігалася у рідкому азоті протягом 6 – 27 років. За терміном зберігання спермодози були розподілені на дві групи: 1-ша – зі строком зберігання 6 – 10 років, 2-га – 20 – 27 років. До кожної групи увійшла спермопродукція 5 різних плідників.

Експериментальні роботи із дослідження біологічних якостей замороженої сперми бугаїв-плідників були виконані у лабораторії екстракорпорального запліднення і культивування ембріонів *in vitro* кафедри біології тварин Луганського національного університету. При дослідженні якісних показників деконсервованої сперми плідників застосовували метод візуальної оцінки за рухливістю та виживаністю, метод диференційного забарвлення для визначення морфофункціональної цілісності мембран клітин та тест на здатність до зв'язування з везикулярними експлантами епітеліальних клітин яйцепроводу корів.

При мікроскопічній оцінці якості спермопродукції плідників застосовували традиційні методики, передбачені ДСТУ 8778:2018 (Сперма бугаїв-плідників заморожена. Визначення показників якості та допущення до використання. Технічні умови).

Диференційне забарвлення сперміїв здійснювали за методом Kovacs-Foote [15]. Згідно з цією методикою розморожену спермодозу розбавляли 0,9 % розчином NaCl у співвідношенні 1:20. Потім краплину розбавленого зразка змішували на предметному склі з однією краплиною ізосмотичного барвника 0,2 % трипанового синього (Sigma) й робили тонкий мазок. Отриманий препарат протягом декілька хвилин висушували на повітрі у вертикальному положенні й для фіксації вміщували на 2 хв у суміш з 86 мл 1 н розчину HCl з додаванням 14 мл 37 % розчину формальдегіду та 0,2 г барвника нейтральний червоний. Потім препарат споліскували проточною та дистильованою водою й забарвлювали у 7,5 % розчині Гімза протягом 3,5 год при температурі 37°C. Після забарвлення препарат для кращої диференціації витримували протягом 2 хв у дистильованій воді.

В отриманих диференційно забарвлених зразках деконсервованої сперми кожного плідника у 10 довільно вибраних полях зору підраховували не менш ніж 200 сперміїв з використанням мікроскопа Olympus-CX41. Водночас враховували стан голівок та хвостів сперміїв й розподіляли їх на чотири групи:

1. живі клітини з інтактною акросомою;
2. живі клітини з пошкодженою або відсутньою акросомою;
3. мертві клітини з інтактною акросомою;
4. мертві клітини з пошкодженою або відсутньою акросомою.

Для підрахунку вищеперелічених груп клітин застосовували комп'ютерну програму Cinderella.

Приготування культури епітеліальних клітин яйцепроводу.

Яйцепроводи, отримані після забою корів, доставляли у лабораторію у фізіологічному розчині з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину при 4°C протягом 30 – 60 хв. У лабораторії яйцепроводи за допомогою скальпелю звільняли від навколишніх сполучних тканин і промивали в середовищі PBS. Розпрямлені яйцепроводи за допомогою стерильних ножиць розділяли на фрагменти. Епітелій збирали шляхом легкого зіскоблювання стерильним скальпелем. Отримані експланти епітеліальних клітин піддавали механічній дезагрегації шляхом багаторазового піпетування із 10-разовою заміною середовища PBS, та осадження центрифугуванням. Утворені агрегати епітеліальних клітин яйцепроводу вносили у лунки 24-лункового планшету з середовищем TCM-199+10 % фетальної сироватки та 1 мкг/мл гентаміцину й культивували при температурі 39°C й 100 % вологості та 5 % CO₂ у повітрі протягом 3 діб.

Визначення індексу зв'язуванням сперміїв з везикулярними експлантами епітеліальних клітин яйцепроводу.

Досліджувані спермодози відтавали при температурі 38 °C протягом 30 сек. на водяній бані.

Потім відбирали 100 мкл відтанутої сперми і акуратно нашаровували на дно пробірки Епіндорфа з 1 мл середовища NEPES-TALP. Пробірку вміщували у водяну баню при температурі 37°C на 40 – 60 хв. Протягом цього часу відбувалося спливання життєздатних сперміїв з високою рухливістю до верхніх шарів середовища і їх відділення від жовтково-цитратного розріджувача. Після закінчення терміну інкубування, з пробірки акуратно відбирали 600 мкл середовища й центрифугували при 7000 об./хв протягом 3 хв.

Для отриманої суспензії сперми визначали концентрацію за допомогою камери Горяєва.

Попередньо прокультивовані експланти клітин епітелію яйцепроводу оцінювали під мікроскопом за наявністю циліарної активності (рухливості).

Відбирали везикули з добре вираженою рухливістю й додавали 100 мкл суспензії таких клітин до 350 мкл середовища культивування у 4-лункові планшети.

У кожную лунку вносили аліквоту суспензії сперміїв із розрахунку кінцевої концентрації 1×10^6 сперміїв/мл й інкубували спільно з везикулярними експлантами клітин яйцепроводу при 39°C й 5 % CO_2 в газовій фазі протягом 2 годин.

По закінченню терміну спільного інкубування клітин, з лунки планшета відбирали 300 мкл середовища, що містило сперміїв, які не зв'язалися з клітинами яйцепроводу.

Везикули клітин яйцепроводу зі сперміями, що зв'язалися досліджували під мікроскопом Olympus CX41 при збільшенні $\times 100$. За допомогою цифрової камери, приєднаної до мікроскопа, отримували мікрофото клітин, на яких надалі з використання комп'ютерної програми "DP-SOFT" вимірювали значення площі поверхні везикул епітелію і підраховували кількість сперматозоїдів, що зв'язалися. На основі отриманих даних розраховували індекс зв'язування (ІЗ) як середню кількість сперміїв, що зв'язалися на $0,1 \text{ мм}^2$ площі поверхні везикулярних експлантів [16].

Отриманий цифровий матеріал опрацьовували статистично за допомогою програми Microsoft Office Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. Оцінка якості деконсервованої сперми у виробничих умовах зазвичай передбачає мікроскопічне дослідження рухливості та виживаності сперміїв. Враховуючи це, у першій серії досліджень нами було оцінено вплив терміну зберігання замороженої сперми бугаїв-плідників на показники рухливості, виживаності та абсолютної виживаності клітин (табл. 1).

Таблиця 1. Показники функціональної якості кріоконсервованої сперми бугаїв-плідників за різного терміну її зберігання

| Термін зберігання спермодоз | Рухливість, бали | Виживаність, год | Абсолютна виживаність, ум. од. |
|-----------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| 6 – 10 років | $4,8 \pm 0,21$ | $4,7 \pm 0,17$ | $18,5 \pm 0,53$ |
| 20 – 27 років | $4,7 \pm 0,14$ | $4,2 \pm 0,23$ | $18,3 \pm 0,41$ |

Визначено, що подовження терміну зберігання спермодоз при температурі -196°C від 6 – 10 до 20 – 27 років не мало вірогідного впливу на функціональні характеристики сперміїв за досліджуваними показниками. Разом з тим рухливість та виживаність сперміїв свідчить лише про їх потенційну здатність до нормального переміщення репродуктивним трактом самиць при штучному осіменінні й не є надійним маркером результативного запліднення.

Відомо, що лише наявність інтактною акросоми сперміїв призводить до успішного запліднення після активації акросомної реакції у відповідний час з наступним вивільненням комплексу ферментів, які полегшують проходження сперматозоїдом шарів клітин кумулюсу та пенетрацію *zona pellucida*. Враховуючи

це, нами було застосоване диференційне забарвлення клітин, що дозволяє оцінити стан їх мембранного апарату і, в першу чергу, акросоми.

Згідно з методикою диференційного забарвлення барвниками трипановий синій/Гімза клітини було поділено на наступні категорії:

- мертві спермії з відсутньою акросомою (МВА) – мають незабарвлену ділянку акросоми та забарвлений у фіолетовий колір постнуклеарний регіон;
- живі клітини з відсутньою акросомою (ЖВА) – характеризуються відсутністю забарвлення обох ділянок;
- мертві спермії з пошкодженою акросомою (МПА) – мають інтенсивно забарвлені у фіолетовий колір акросому та постнуклеарний регіон;
- живі спермії з інтактною акросомою (ЖВА) – мають забарвлену у бузковий колір акросому та незабарвлений постнуклеарний регіон;
- мертві клітини з інтактною акросомою (МІА) – характеризуються забарвленням у блідо-бузковий колір акросоми та у фіолетовий – постнуклеарного регіону.

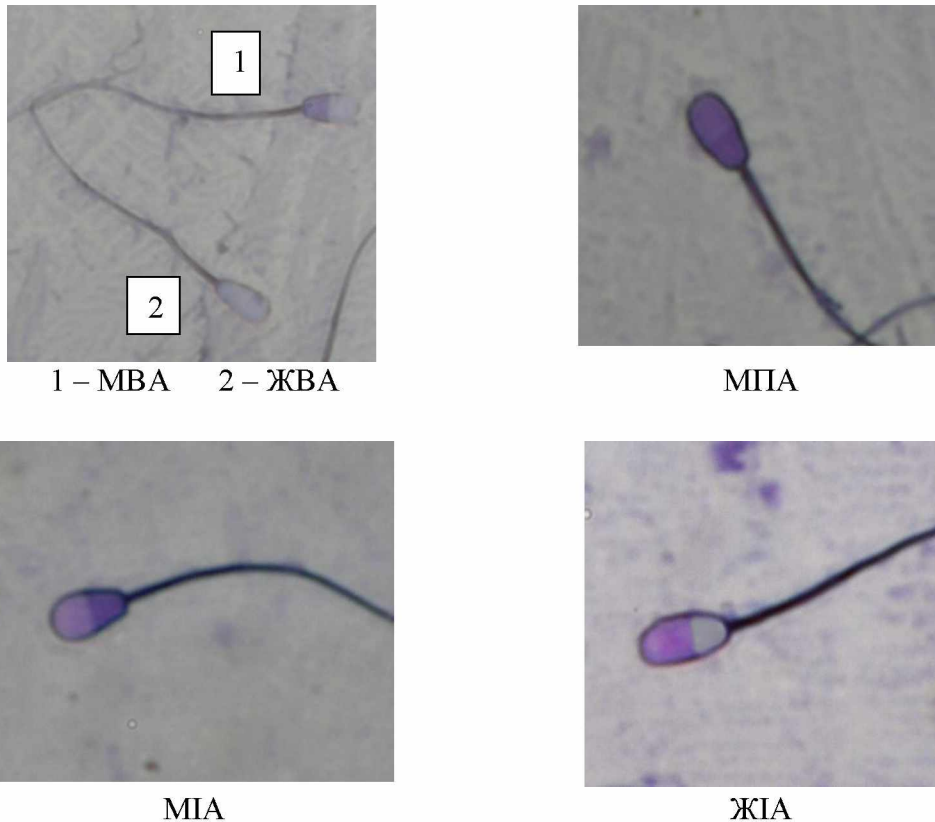


Рис. 1. Мікрофото диференційно забарвлених спермійв (x100)

Отримані результати (рис. 2) свідчать, що у загальному розподілі частка живих спермійв з неушкодженою акросомою за обох досліджуваних строків зберігання вірогідно не відрізнялася.

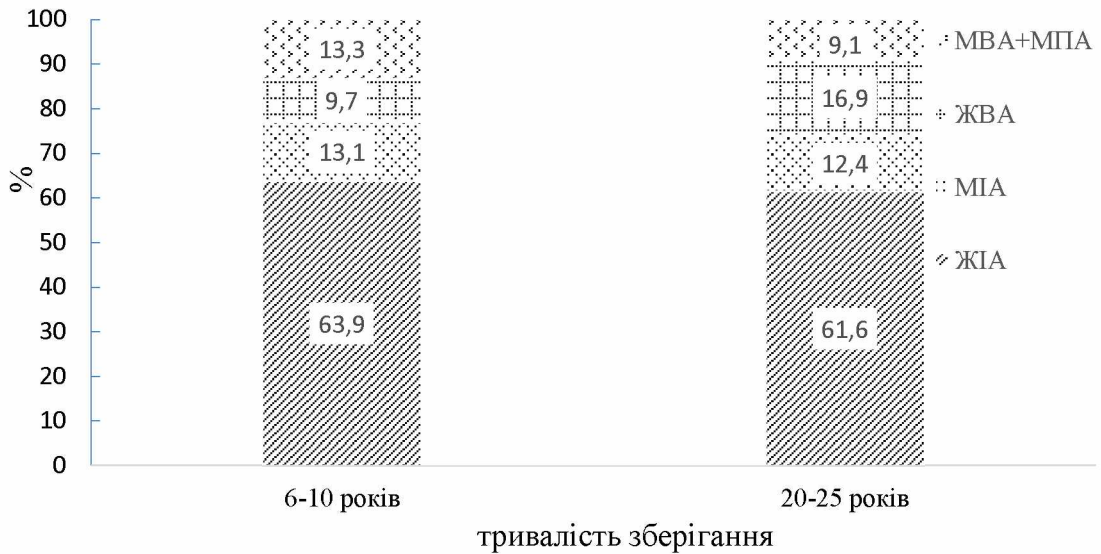


Рис. 2 Розподіл диференційно забарвлених спермійів за різних термінів зберігання заморожених спермодоз бугаїв-плідників

Частка мертвих клітин також вірогідно не відрізнялася й становила 26,4 % – при зберіганні до 10 років та 21,7 % – при зберіганні понад 20 років. Не виявлено вірогідної різниці між термінами зберігання і при загальній оцінці відсотка спермійів із різним ступенем пошкодження акросомальної мембрани. Цей показник становив відповідно 22,5 та 26,0 %. Разом з тим при подовженні терміну зберігання кріоконсервованої сперми до 20 – 27 років спостерігалось вірогідне підвищення відсотка живих спермійів з відсутньою акросомою ($p \leq 0,01$). Тоді як менш тривале зберігання спермодоз при температурі рідкого азоту характеризувалося вірогідно більшою часткою мертвих спермійів з відсутньою або пошкодженою акросомою ($p \leq 0,05$).

Переміщення сперматозоїдів репродуктивним трактом самиці, й особливо яйцепроводом, є комплексним процесом. Так у великих ссавців, до яких належать і сільськогосподарські тварини, в осіменінні бере участь декілька мільйонів спермійів. Водночас тільки декілька тисяч досягають істмусової частини яйцепроводу самки, де більшість із них формує накопичувальний (резервний) пул спермійів. У подальшому під час запліднення лише дуже незначна їх частина досягає ампульно-істмусового з'єднання яйцепроводу [17].

Вважають, що накопичувальний пул спермійів може виконувати ряд функцій: запобігати поліспермному заплідненню внаслідок того, що лише декілька сперматозоїдів у певний час здатні досягти ооцита в ампульній частині яйцепроводу; підтримувати запліднювальну здатність спермійів у проміжок часу від настання еструсу до безпосередньо запліднення ооцита; регулювати процеси капацитації та гіперактивації сперматозоїдів внаслідок створення специфічного мікрооточення у межах сформованого резерву сперматозоїдів [18].

Накопичувальний пул спермійів формується шляхом їх зв'язування з апікальною плазматичною мембраною циліарних та секреторних епітеліальних клітин яйцепроводу. Спермії бугаїв можуть залишатися у такому стані приблизно 18 год й вивільнятися зі зв'язку із клітинами яйцепроводу лише під час овуляції [19]. Таким чином, порушення здатності спермійів до формування

накопичувального пулу через недостатню їх кількість, або нездатність до тривалого зв'язування негативно впливає на процес запліднюваності самок *in vivo* [20].

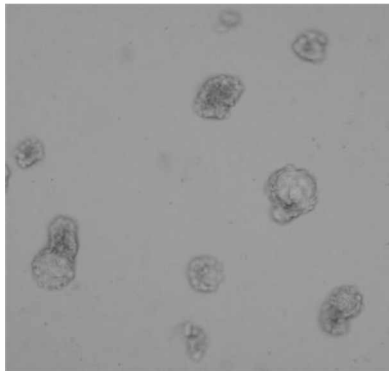
Установлено, що лише спермії з інтактною акросомою здатні до специфічного зв'язування з клітинами яйцепроводу. Тому для оцінки функціональної неушкодженості акросоми, як складової нормальної запліднювальної здатності деконсервованої сперми плідників, низкою дослідників було запропоновано тест на зв'язування сперміїв *in vitro* з клітинами яйцепроводу у вигляді моношару, або окремих везикул [21, 22].

При отриманні культури епітеліальних клітин яйцепроводу застосовують процедуру механічної дезагрегації клітин. У результаті цього одержують або окремі клітини, або фрагменти епітелію (клітинні агрегати). При подальшому культивуванні поза організмом окремі клітини у результаті прикріплення до дна культурального посуду і проліферації утворюють моношар, тоді як ріст клітинних експлантів проявляється в утворенні суспензії везикул, що залишаються неприкріпленими у культуральному середовищі.

Для стандартизування тесту на здатність сперміїв до зв'язування з епітеліальними клітинами яйцепроводу нами була проведена низка попередніх досліджень.

На першому етапі ми порівняли характер росту клітин залежно від того, з якої частини яйцепроводу їх було вилучено: істмусу, або одночасно ампульної частини та істмусу без урахування ампульно-істмусового з'єднання.

Установлено, що при вилученні клітин як з істмусової, так і з ампульної частин яйцепроводу переважна їх частка при подальшому культивуванні росте у вигляді моношару і лише незначна частина залишається у вигляді вільних експлантів (рис. 3).



Вільні везикулярні експланти



Формування моношару клітин

Рис. 3 Варіанти росту епітеліальних клітин яйцепроводу корів при культивуванні *in vitro*

Напроти, при вилученні клітин лише з істмусової частини подальший їх розвиток *in vitro* відбувається шляхом утворення везикул двох типів: з циліарною активністю, що візуально проявляється в активному обертальному русі експлантів, та нерухомих везикул.

Враховуючи, що *in vivo* спермії зв'язуються саме з циліарними клітинами у подальшій роботі ми використовували для культивування *in vitro* епітеліальні клітини вилучені з каудальної частини яйцепроводу, які на третю добу культивування утворювали сфероїдні везикули з яскраво вираженою циліарною активністю.

На здатність сперміїв до зв'язування з клітинами яйцепроводу може впливати склад середовища інкубування, тому у наступній серії експериментів ми порівняли цей показник для трьох різних середовищ: середовища BO (Brackett @ Oliphant, 1975), TCM-199 з додаванням сироватки та середовища Fert-TALP.

Результати оцінювали за середньою кількістю сперміїв, що зв'язалися з 0,1 мм² площі поверхні везикулярного експланту епітеліальних клітин яйцепроводу (індекс зв'язування). Для кожного середовища було відібрано по 20 везикулярних експлантів діаметром 100 – 150 мкм з активним обертальним рухом.

Отримані дані (табл. 2) свідчать, що найвищим цей показник був за умов застосування середовища, що найчастіше використовується для процедури запліднення поза організмом – Fert-TALP.

Таблиця 2. Вплив складу середовища інкубації на здатність сперміїв до зв'язування з везикулярними експлантами клітин яйцепроводу *in vitro*

| Середовище | Індекс зв'язування сперміїв з клітинними експлантами яйцепроводу | CV |
|------------------------------------|--|------|
| Brackett @ Oliphant | 36,4 ± 5,3 ^a | 0,15 |
| Fert-TALP | 153,7 ± 34,7 ^b | 0,23 |
| TCM 199 + 10 % фетальної сироватки | 132,3 ± 18,4 ^b | 0,14 |

Примітка: значення з різними суперскриптами в межах стовпця (a:b) різняться з вірогідністю $p < 0,05$

Для середовища TCM 199 індекс зв'язування сперміїв був на 13,9 % нижчим порівняно з середовищем Fert-TALP, однак ця різниця невірогідна. Найнижчим цей показник виявився для середовища BO й вірогідно значно різнився як із середовищем Fert-TALP, так і з середовищем 199.

Підсумовуючи отримані дані в нашій подальшій роботі при оцінці кріоконсервованої сперми різного терміну зберігання ми використовували везикулярні експланти клітин яйцепроводу у середовищі Fert-TALP з вираженою циліарною активністю, діаметр яких не перевищував 100 – 150 мкм (рис.4).

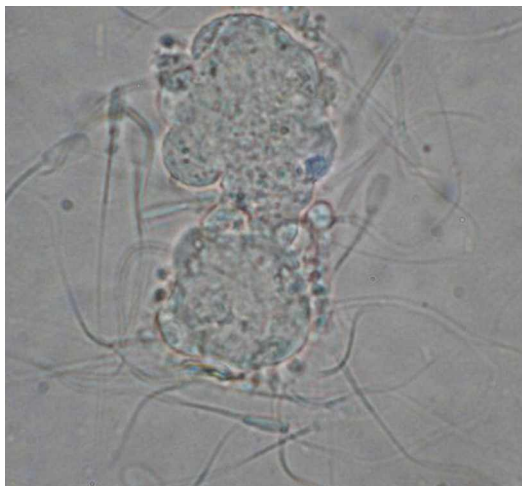


Рис. 4. Мікрофото везикулярних експлантів клітин яйцепроводу при інкубації зі сперміями

Отримані результати (табл. 3) свідчать, що за умов довготривалого зберігання у рідкому азоті кріоконсервованої сперми індекс зв'язування сперміїв, як показник їх здатності до результативного запліднення, був вірогідно (на 49,7 %, $p \leq 0,05$) нижчим, порівняно з менш тривалим зберіганням протягом 6 – 10 років.

Таблиця 3. Вплив тривалості зберігання замороженої сперми на здатність сперміїв до зв'язування з епітеліальними клітинами яйцепроводу *in vitro*

| Термін зберігання спермодоз | Індекс зв'язування сперміїв з клітинними експлантами яйцепроводу | |
|-----------------------------|--|------|
| | $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ | Cv |
| 6 – 10 років | 227,9±32,3 ^a | 0,14 |
| 20 – 27 років | 114,6±19,5 ^b | 0,17 |

Примітка: значення з різними суперскриптами в межах стовпця (a:b) різняться з вірогідністю $p < 0,05$

Разом з тим, за даними [16] вірогідне зниження запліднювальної здатності сперміїв *in vivo* відбувається при зменшенні показника співвідношення зв'язаних клітин на 0,1 мм² поверхні експланту нижче 60 сперміїв.

Таким чином, результати оцінки за диференційним забарвленням та здатністю до зв'язування сперміїв з везикулярними експлантами епітеліальних клітин яйцепроводу *in vitro* свідчать про негативні зміни поверхневого мембранного апарату сперміїв при довготривалому (понад 20 років) їх зберіганні за кріогенних температур.

Висновки. За показниками рухливості, виживаності та абсолютної виживаності сперміїв, що традиційно застосовуються при оцінці якості сперми, не виявлено відмін при зберіганні кріоконсервованої сперми протягом 6 – 27 років. Разом із цим метод диференційного забарвлення виявив вірогідне збільшення на 7,2 % частки живих сперміїв з відсутньою акросомою при подовженні терміну зберігання від 6 – 10 до 20 – 27 років. За коротшого часу зберігання вірогідно вищим був відсоток мертвих клітин з ушкодженою або відсутньою акросомою. Тест на зв'язування сперміїв з епітеліальними клітинами яйцепроводу *in vitro* показав вірогідне зменшення на 49,7 % індексу зв'язування сперміїв з клітинними

експлантами при довготривалому зберіганні. Це може свідчити про зниження здатності таких сперміїв до запліднення.

Перспективи подальших досліджень. Для визначення впливу терміну довготривалого зберігання кріоконсервованої сперми на здатність сперміїв до запліднення необхідно провести оцінку результативності запліднення *in vitro* та *in vivo*.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Зубец М. В., Буркат В. П., Мельник Ю. Ф. и др. Методологические аспекты сохранения генофонда сельскохозяйственных животных / науч. ред. И. В. Гузев. Киев: Аграрная наука, 2007. 120 с.
2. Vishwanath R., Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Sci.* 2000. Vol. 62(1). P. 23–53. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00153-6
3. Програма збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017 – 2025 роки / М. В. Гладій, Ю. П. Полупан, Д. М. Басовський та ін. Суми, 2018. 85 с. URL: https://iabg.org.ua/images/stories/prog_zber2.pdf
4. Medeiros C. M. O., Forell F., Oliveira A. T. D., Rodrigues J. L. Current status of sperm cryopreservation : why isn't it better? *Theriogenology.* 2002. Vol. 57 (1). P. 327–344. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00674-4
5. Hammerstedt R. H., Graham J. K., Nolan J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. of Andrology.* 1990. Vol. 11(1). P. 73–88. doi: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x
6. Bailey J. L., Bilodeau J. F., Cormier N. Y. Semen cryopreservation in domestic animals : A damaging and capacitating phenomenon. *J. Andrology.* 2000. Vol. 21(1). P. 1–7. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x
7. Malik A, Laily M., Zakir M. I. Effects of long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein bull spermatozoa. *Asian Pacific J. of Reproduction.* 2015. Vol. 4(1). P. 22–25. doi: 10.1016/S2305-0500(14)60052-X
8. Ramírez-Reveco A., Hernández J. L., Aros P. Long-term storing of frozen semen at –196°C does not affect the post-thaw sperm quality of bull semen. *Cryopreservation in Eukaryotes.* 2016. IntechOpen Limited. doi: 10.5772/64948
9. Leibo S.P., Semple M.E., Kroetsch T.G. In vitro fertilization of oocytes by 37-year-old cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 1994. Vol. 42(8). P. 1257–1262. doi: 10.1016/0093-691X(94)90245-E
10. Haugan T., Gröhn Y. T., Kommisrud E., Ropstad E., Reksen O. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Animal Reproduction Sci.* 2007. Vol. 97(1). P. 1–11. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.12.010
11. Akyol N., Varışlı Ö., Kızıl S. H. Effects of Long-term Storage on Some Spermatological Parameters in Cryopreserved Bull Semen. *Cryo Letters.* 2018. Vol. 39(6). P. 354–358
12. Akyol N., Ertem T. B., Varışlı Ö. Investigation of the effects of storage period for frozen bull semen on *in vitro* embryo production. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2019. Vol. 25(2). P. 257–262. doi: 10.9775/kvfd.2018.20839
13. Ладика В. І., Склярєнко Ю. І., Павленко Ю. М. Оцінка якості сперми бугаїв-плідників у контексті збереження популяції лебединської породи. *Науково-*

технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2018. Вип. 19. С. 254–264.

14. Walters C., Wheeler L., Stanwood P. C. Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*. 2004. Vol. 48(3). P. 229–244. doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.01.007

15. Kovacs A., Foote R. H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic and Histochemistry*. 1992. Vol. 67. P. 119–124. doi: 10.3109/10520299209110020

16. De Pauw I. M. C., Van Soom A., Laevens H., Verberckmoes S., Kruif A. Sperm Binding to Epithelial Oviduct Explants in Bulls with Different Nonreturn Rates Investigated with a New In Vitro Model. *Biology of Reproduction*. 2002. Vol. 67. P. 1073–1079. doi: 10.1095/biolreprod.101.001792

17. Gualtieri R., Talevi R. In vitro-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release. *Biology of Reproduction*. 2000. Vol. 2. P. 1754–1762. doi: 10.1095/biolreprod62.6.1754

18. Pirez M. C., Li S., Koelle S. Assessment of sperm binding capacity in the tubal reservoir using a bovine ex vivo oviduct culture and fluorescence microscopy. *Methods Protoc*. 2021. Vol. 4(4). P. 1–12. doi: 10.3390/mps4040067

19. Mahé C., Pranomphon T., Reynaud K., Lafont L., Meylheuc T., Schoen J., Mermillod P., Marie Saint-Dizier M. Sperm-fluid-cell interplays in the bovine oviduct: glycosaminoglycans modulate sperm binding to the isthmus reservoir. *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13. P. doi: 10.1038/s41598-023-37469-3

20. Gualtieri R., Talevi R. Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction*. 2003. Vol. 125. P. 251–258. URL: <https://www.scivp.lviv.ua/wp-content/uploads/2021/09/41.pdf>

21. El-Sokary M., Ibrahim S., Al-shimaa El-Naby, Sosa A., Mahmoud K., Nawito M. New insights into molecular aspects of sperm-oviductal binding in Egyptian buffaloes using an *in vitro* model : Effects of oviductal segments and media. *Andrologia*. 2021;53:e13984. doi: 10.1111/and.13984

22. Schmaltz L., Prudhomme T., Tsikis G., Reynaud R., Mermillod P., Saint-Dizier M. Sperm binding to oviduct epithelial spheroids varies among males and ejaculates but not among females in pigs. *Theriogenology*. 2024. Vol. 219. P. 116–125. doi: 10.1016/j.theriogenology.2024.02.022

REFERENCES

1. Zubets, M. V., Burkat, V. P., & Melnyk, Yu. F. et al. (2007). Metodolohycheskye aspekty sokhraneniya henofonda selskokhoziaistvennykh zhyvotnykh [Methodological aspects of conservation of the gene pool of farm animals]. Kyev: Ahrarnaia nauka [in Russian].

2. Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Sci.*. 2000. Vol. 62(1). P. 23–53. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00153-6

3. Hladii, M. V., Polupan, Yu. P., & Basovskyi, D. M. et al. (2018). Prohrama zberezheniia henofondu lokalnykh i znykaiuchykh porid silskohospodarskykh tvaryn v Ukraini na 2017– 2025 roky [Programme for the conservation of the gene pool of local and endangered breeds of farm animals in Ukraine for 2017 – 2025]. Sumy. URL: https://iabg.org.ua/images/stories/prog_zber2.pdf (date of access: 12.06.24).

4. Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation : why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00674-4
5. Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. of Andrology*, 11(1), 73–88. doi: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x
6. Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. Y. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals : A damaging and capacitating phenomenon. *J. Andrology*, 21(1), 1–7. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x
7. Malik, A, Laily, M., & Zakir, M. I. (2015). Effects of long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein bull spermatozoa. *Asian Pacific J. of Reproduction*, 4(1), 22–25. doi: 10.1016/S2305-0500(14)60052-X
8. Ramírez-Reveco, A., Hernández, J. L., & Aros, P. (2016). Long-term storing of frozen semen at -196°C does not affect the post-thaw sperm quality of bull semen. *Cryopreservation in Eukaryotes*. IntechOpen Limited. doi: 10.5772/64948
9. Leibo, S. P., Semple, M. E., & Kroetsch, T. G. (1994). In vitro fertilization of oocytes by 37-year-old cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 42(8), 1257–1262. doi: 10.1016/0093-691X(94)90245-E
10. Haugan T., Gröhn Y. T., Kommisrud E., Ropstad E., & Reksen O. (2007). Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Animal Reproduction Sci.*, 97(1), 1–11. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.12.010
11. Akyol, N., Varışlı, Ö., & Kızıl, S. H. (2018). Effects of Long-term Storage on Some Spermatological Parameters in Cryopreserved Bull Semen. *Cryo Letters.*, 39(6), 354–358.
12. Akyol, N., Ertem. T. B., & Varışlı, Ö. (2019). Investigation of the effects of storage period for frozen bull semen on *in vitro* embryo production. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 25(2), 257–262. doi: 10.9775/kvfd.2018.20839
13. Ladyka, V. I., Skliarenko, Yu. I., & Pavlenko, Yu. M. (2018). Otsinka yakosti spermy buhaiiv-plidnykiv u konteksti zberezhennia populiatsii lebedynskoi porody [Assessment of sperm quality of bulls in the context of conservation of the Swan breed population.]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho instytutu veterynarnykh preparativ ta kormovykh dobavok i Instytutu biolohii tvaryn* [Scientific and Technical Bulletin of the State Research and Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives and the Institute of Animal Biology]. Lviv, 19, 254–264 [in Ukrainian].
14. Walters, C., Wheeler, L., & Stanwood, P. C. (2004). Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*. 48(3), 229–244. doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.01.007
15. Kovacs, A., & Foote, R. H. (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic and Histochemistry*, 67, 119–124. doi: 10.3109/10520299209110020
16. De Pauw, I. M. C., Van Soom, A., Laevens, H., Verberckmoes, S., & Kruif, A. (2002). Sperm Binding to Epithelial Oviduct Explants in Bulls with Different Nonreturn Rates Investigated with a New In Vitro Model. *Biology of Reproduction*, 67, 1073–1079. doi: 10.1095/biolreprod.101.001792
17. Gualtieri, R., & Talevi, R. (2000). In vitro-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release. *Biology of Reproduction*, 2, 1754–1762. doi: 10.1095/biolreprod62.6.1754

18. Pirez, M. C., Li, S., & Koelle, S. (2021). Assessment of sperm binding capacity in the tubal reservoir using a bovine ex vivo oviduct culture and fluorescence microscopy. *Methods Protoc*, 4(4), 1–12. doi: 10.3390/mps4040067
19. Mahé, C., Pranomphon, T., Reynaud, K., Lafont, L., Meylheuc, T., Schoen, J., Mermillod, P. & Marie Saint-Dizier, M. (2023). Sperm-fluid-cell interplays in the bovine oviduct: glycosaminoglycans modulate sperm binding to the isthmic reservoir. *Scientific Reports*, 13, doi: 10.1038/s41598-023-37469-3
20. Gualtieri, R., & Talevi, R. (2003). Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction*, 125, 251–258. URL: <https://www.scivp.lviv.ua/wp-content/uploads/2021/09/41.pdf>
21. El-Sokary, M., Ibrahim, S., Al-shimaa, El-Naby, Sosa. A., Mahmoud, K., & Nawito, M. (2021). New insights into molecular aspects of sperm–oviductal binding in Egyptian buffaloes using an *in vitro* model: Effects of oviductal segments and media. *Andrologia*, 53, e13984. doi: 10.1111/and.13984
22. Schmaltz, L., Prudhomme, T., Tsikis, G., & Reynaud, R., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2024). Sperm binding to oviduct epithelial spheroids varies among males and ejaculates but not among females in pigs. *Theriogenology*, 219, 116–125. doi: 10.1016/j.theriogenology.2024.02.022

EVALUATION OF THE MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATE OF CRYOPRESERVED SPERM OF BULLS AT DIFFERENT PERIODS OF LONG-TERM STORAGE

G. V. Minenko,¹ N. M. Brechka,^{2,3} O. V. Shcherbak⁴

¹*Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production NAAS
1 Shvedska Mohyla, St., Poltava, Ukraine, 36013*

²*Private Establishment of Higher Education «Kharkiv Institute of Medicine and Biomedical Science»
11 Sadova St., Kharkiv, Ukraine, 61002*

³*SI «V. Danilevsky institute for endocrine pathology problems
of NAMS of Ukraine»
10 Alchevskiy St., Kharkiv, Ukraine, 61002*

⁴*State Biotechnology University
44 Alchevskiy St., Kharkiv, Ukraine, 61002*

Objective. To study the morphological and functional state of cryopreserved sperm of bulls during storage for 6 – 27 years at a temperature of – 196°C in liquid nitrogen in a comparative aspect. **Methods.** The object of the study was cryopreserved semen of bulls stored for 6 – 10 or 20 – 27 years. In the study of the qualitative parameters of frozen-thawed spermatozoa, the method of visual assessment for motility and survival, the method offers differential staining with trypan blue/Gymza dyes to determine the morphological and functional integrity of cell membranes and the test for the ability to bind to vesicular explants of bovine oviductal epithelial cells *in vitro* were used. **Results.** It was found that the extension of the storage period of spermatozoa to 20 – 27 years had no significant effect on the functional characteristics of spermatozoa in terms of motility, survival and absolute survival. The method of differential staining showed that the proportion of live sperm with an intact acrosome in the total distribution did not differ significantly in both studied storage periods and ranged from 61.6 – 63.9 %.

*The proportion of dead cells also did not differ significantly and was 26.4 % when stored for up to 10 years and 21.7 % when stored for more than 20 years. No significant difference was found in the overall assessment of the percentage of sperm with varying degrees of acrosomal membrane damage. This figure was 22.5 and 26.0 %, respectively. At the same time, when the shelf life of cryopreserved sperm was extended to 20 – 27 years, a significant increase in the percentage of live sperm with a missing acrosome was observed ($p \leq 0.01$). It was determined that the index of sperm binding to explants of epithelial cells of the oviduct in vitro was significantly higher when stored for 6-10 years and was 227.9 ± 32.3 against 114.6 ± 19.5 when stored for 20 – 27 years ($p < 0.05$). **Conclusions.** The use of the traditional method of assessing sperm quality by indicators of sperm motility, survival and absolute sperm survival did not reveal any differences when storing cryopreserved sperm for 6 – 27 years. At the same time, the differential staining method showed a significant increase of 7.2% in the proportion of live sperm with a missing acrosome when the storage period was extended from 6 – 10 to 20 – 27 years. The in vitro test for sperm binding to oviduct epithelial cells showed a significant decrease of almost 2 times in the index of sperm binding to cellular explants during long-term storage. This may indicate a decrease in the ability of such sperm to fertilise.*

Keywords: bulls, sperm, cryopreservation, long-term storage, differential colouration, oviduct, sperm binding.

Отримано 06.05.2024

Отримано після доопрацювання 17.05.2024

Затверджено до видання 27.06.2024