

УДК 636.2:57.086.13:591.463.1

DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.66.16>**ЕФЕКТИВНІСТЬ ДІЇ АМІДІВ ЯК КРІОПРОТЕКТОРІВ У СКЛАДІ ЗАХИСНИХ
СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ****О. Б. СУШКО¹, М. С. САВЕЛЬЄВА¹, А. М. КОМПАНІЄЦЬ², О. Є. ГУЗЄВАТИЙ³**¹Інститут тваринництва НААН (Харків, Україна)²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НААН (Харків, Україна)³Національна академія аграрних наук України (Київ, Україна)<https://0000-0003-3552-064X> – О. Б. Сушко<https://0000-0003-2221-933X> – М. С. Савельєва<https://0000-0003-3552-055X> – А. М. Компанієць<https://0000-0002-2470-5430> – О. Є. Гузєватийalex.siveryanin@gmail.com

У статті висвітлені результати досліджень щодо ефективності введення до криозахисних середовищ для сперми бугаїв кріопротекторів групи амідів – діметилформаміду (ДМФА), діметилацетаміду (ДМАЦ) і визначити їх вплив на основні фізіологічні характеристики статевих клітин. Вступ. Штучне осіменіння із застосуванням глибокозамороженої сперми у практиці тваринництва є актуальним, розроблення удосконалених середовищ для кріоконсервування сперми тварин на теперішній час тільки зростає. В цьому напрямку запропоновано різні модернізовані рецептури та технології кріоконсервування спермопродукції, особливо це спостерігається у тваринництві з розведення великої рогатої худоби. Матеріали і методи. Безпосередньо після отримання сперми її розріджували середовищем № 1, що містило гліцерину 5,6% та ДМФА 1,4% (дослідна група 1). Дослідна група 2 також розріджувалась і оброблялась середовищем № 1, але з додаванням 5,6% гліцерину та 1,4% ДМАЦ. Після насичення сперми захисними речовинами середовища № 1, її розріджували середовищем № 2, що містило 4% гліцерину і 1% ДМФА (дослідна група 1) та 4% гліцерину і 1% ДМАЦ (дослідна група 2). Контрольні зразки було розріджено згідно з стандартним дво-хмоментним протоколом з застосуванням 7% гліцерину у середовищі № 1, та 5% гліцерину у середовищі № 2. Кріоконсервація спермодоз здійснювалась шляхом прямого занурення стандартних плоских металевих касет з облицьованими гранулами у середовище зрідженого азоту. При цьому охолодження проводилося в режимі: 4°C до мінус 10°C при мінус 3°C/хв і від мінус 10°C до мінус 80°C при мінус 40°C/хв. Деконсервацію спермодоз проводили за температури 38–39°C. Осіменіння корів здійснювали ректо-цервікальним методом. Результати. Застосування у середовищах для розбавлення і кріоконсервації сперми проникаючих кріопротекторів групи амідів – діметилформаміду і діметилацетаміду, запезпечує певне підвищення рухливості статевих клітин на 5,9% та 9,0%, відповідно. Позитивний вплив композиції кріопротекторів відмічено і щодо тривалості життя сперміїв після деконсервації. Так, виживаність в другій дослідній групі була більше на 0,67 год або 10,3%, у порівнянні з контролем. Середовища доповнені кріопротекторними речовинами групи амідів забезпечували достатньо високу виживаність сперми за температури (38°C), яке значно перевищувало

встановлену мінімально фізіологічну норму (5 годин). У відсотках це перевищення складало 34,6% та 42,6%. Висновки. Доведено доцільність застосування у криозахисних середовищах (розбавниках) для сперми бугаїв комбінацій ендоцелюлярних криопротекторів, які створені з гліцерину та диметилформаміду (ДМФА) або гліцерину та диметилацетаміду (ДМАЦ), що підвищує якісні характеристики біоматеріалу.

Ключові слова: сперма, бугаї, криопротектори, диметилформамід, диметилацетамід, гліцерин, рухливість

EFFICIENCY OF AMIDES AS CRYOPROTECTORS IN THE COMPOSITION OF PROTECTIVE ENVIRONMENTS FOR BULLS SPERM CRYOCONSERVATION

O. B. Suchko¹, M. S. Savelieva¹, A. M. Kompaniec², O. E. Guzevaty³

¹Institute of Animal Science of NAAS (Kharkov, Ukraine)

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine (Kharkov, Ukraine)

³National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (Kyiv, Ukraine)

The article highlights the results of research on the effectiveness of the introduction of cryoprotectants of the amide group – dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide (DMAC) into the cryoprotective media for bull sperm and to determine their effect on the main physiological characteristics of germ cells. Materials and methods. Immediately after obtaining sperm, it was diluted with medium No. 1 containing 5.6% glycerol and 1.4% DMF (experimental group 1). Experimental group 2 was also diluted and treated with medium No. 1, but with the addition of 5.6% glycerol and 1.4% DMAC. After saturation of the sperm with the protective substances of medium № 1, it was diluted with medium No 2 containing 4% glycerol and 1% DMF (experimental group 1) and 4% glycerol and 1% DMAC (experimental group 2). Control samples were diluted according to a standard two-moment protocol using 7% glycerol in medium No. 1 and 5% glycerol in medium No. 2. Cryopreservation of spermatozoid was carried out by direct immersion of standard flat metal cassettes with coated granules in a liquid nitrogen medium. At the same time, cooling was carried out in the following mode: 4°C to minus 10°C at minus 3°C/min and from minus 10°C to minus 80°C at minus 40°C/min. Deconservation of spermatozoa was carried out at a temperature of 38–39°C. Cows were inseminated by the recto-cervical method. The results. The use of penetrating cryoprotectants from the amide group - dimethylformamide and dimethylacetamide - in media for sperm dilution and cryopreservation ensures a certain increase in the motility of germcells by 5.9% and 9.0%, respectively. The positive effect of the composition of cryoprotectants was also noted regarding the survival of sperm after deconservation. Thus, the survival rate in the second experimental group was 0.67 hours or 10.3% higher than in the control group. The environments supplemented with cryoprotective substances of the amide group ensured sufficiently high sperm survival at body temperature (38°C), which significantly exceeded the established minimum physiological norm (5 hours). In percentage terms, this excess was 34.6% and 42.6%. Conclusions. The feasibility of using combinations of endocellular cryoprotectants made from glycerol and dimethylformamide (DMF) or glycerol and dimethylacetamide (DMAC) in cryoprotective media (diluent) for bull sperm has been proven, which increases the quality characteristics of the biomaterial.

Keywords: sperm, bull, cryoprotectants, dimethylformamide, dimethylacetamide, glycerin, motility

Вступ. Кріоконсервація сперми є потужним інструментом збереження генетичного різноманіття тварин та значною мірою сприяє поширенню репродуктивних технологій, таких як штучне осіменіння та запліднення *in vitro* (Kumar et al., 2019). Процес тривалого перебування статевих клітин при статично низькій температурі мінус 195,8°C не впливає на біологічні характеристики гамет. Проте в процесі кріоконсервування фізіологічні характеристики сперми (рухливість, виживаність, цілісність цитоплазматичних мембран) суттєво погіршується. Ступінь цього зниження залежить від концентрації і типу протекторів у розбавниках, харак-

теру режиму охолодження, індивідуальних особливостей плідників тощо (Nagata et al., 2019; Bugrov, 2015).

Кріоконсервація пошкоджує сперму різними способами, такими як ультраструктурні пошкодження головки, мітохондрій і хвоста сперматозоїдів, а також через осмотичний стрес (Khan et al., 2021).

По мірі розширення об'ємів штучного осіменіння із застосуванням глибокозамороженої сперми у практиці тваринництва актуальність розробки удосконалених середовищ для кріоконсервування сперми тварин тільки зростає (Bailey et al., 2003; Ugur et al., 2019). В цьому напрямку запропоновано немало модернізованих рецептур та техніки кріоконсервування, особливо це стосується великої рогатої худоби (Grötter et al., 2019).

Випробувано з позитивним результатом застосування комплексу холестеринциклодекстрин з виключенням яєчного жовтка із складу розбавника для сперми бугаїв (Anzar et al., 2019). Запропоновані розбавники, що базуються на застосуванні соєвого лецитину (Chelucci et al., 2015; Sharafi et al., 2015).

Проведено порівняльні дослідження з кріоконсервації сперми бугаїв з використанням різних кріопротекторів (гліцерину або етиленгліколю) доповнених трегалозою або цистеїном. Застосування 5% етиленгліколю призвело до меншого пошкодження хроматину та згубного впливу заморожування на рух хвоста сперміїв. Також обробка сперми розбавником з етиленгліколем призвела до деякого (недостовірною) збільшення заплідненості корів (Büyükleblebici et al., 2014).

Проведено дослідження та доведено унікальний фізико-хімічний вплив дії заміщених амідів, як кріопротекторів. Також доведено, що їх висока проникність всередину клітин обумовлює значний кріозахисний ефект сперми півнів. При розробці і вивченні кріозахисних середовищ визначаються два головних завдання – отримання найбільш ефективних рецептур, що забезпечують «пом'якшення стресового впливу» на етапах кріоконсервування та стимулювання відновлення фізіологічних процесів у деконсервованій спермі. Доведено, що використовуючи суміш амідів у складі кріозахисних середовищ, можна істотно скоротити час насичення сперматозоїдів кріопротекторами перед кріоконсервуванням та поліпшити їх біологічну якість після заморожування-відтавання (Linnik et al., 2001).

Здійснено експерименти з кріоконсервування сперми бугаїв з застосуванням комбінації гліцерину з речовинами групи амідів. Доведено позитивний ефект таких комбінацій кріопротекторів за рухливістю та збереженістю цитоплазматичних мембран статевих клітин жеребців (Sushko et al., 2009).

Метою дослідження є вивчення ефективності введення до кріозахисних середовищ для сперми бугаїв кріопротекторів групи амідів – диметилформамід (ДМФА), диметилацетамід (ДМАЦ) і визначення їх впливу на основні фізіологічні характеристики статевих клітин.

Матеріал та методи дослідження. В дослідженнях використано свіжоотримані еякуляти бугаїв молочних порід. Для експериментів відбирали сперму з рухливістю не менше 80%. Розбавлення здійснювалося в два етапи середовищем № 1 та середовищем № 2.

При збереженні основної рецептури розбавників (середовище № 1: лактоза 11% водний розчин – 63 мл., жовток курячого яйця 30 мл), середовище № 2: лактоза 6, натрій люмоноксидний 1,4 г, вода 100 мл) у досліджах використовували диметилоформамід та диметилацетамід у комплексі з гліцерином. Готували розбавник, в який вводили 20% амідів та 80% гліцерину по відношенню до загальної кількості ендодіалятичних кріопротекторів.

Безпосередньо після отримання сперми, її розріджували середовищем № 1, що містило, гліцерину 5,6% та ДМФА 1,4% (дослідна група 1). Друга дослідна група також розріджувалась і оброблялась з додаванням 5,6% гліцерину та 1,4% ДМАЦ. Температура середовища становила 35°C. Об'ємне співвідношення сперма середовище – 1:1. Експозиція за температури 18–20°C – 5 хв.

Після насичення сперми захисними речовинами у середовищі № 1, її розріджували середовищем № 2, що містило 4% гліцерину і 1% ДМФА (дослідна група 1) та 4% гліцерину і 1% ДМАЦ (дослідна група 2).

Розбавлення середовищем № 2 проводили за кімнатної температури, після чого розбавлена сперма направлялась на розфасовку та еквілібрацію при температурі 4°C протягом 3 годин. Розбавлення здійснювалось до досягнення концентрації на рівні 120×10^6 спермій/мл.

Контрольні зразки було розріджено згідно з стандартним двохмоментним протоколом з застосуванням 7% гліцерину у середовищі № 1, та 5% гліцерину у середовищі № 2.

Для заморожування розбавлену сперму розфасовували в автоматичному режимі у герметично закриті капсули – облицьовані гранули, згідно регламенту «Харківської технології асептичного одержання, кріоконсервації і зберігання сперми бугаїв» (Rudenko, 2011). Заморожування здійснювалось шляхом прямого занурення стандартних плоских металевих касет з облицьованими гранулами у середовище зрідженого азоту. При цьому охолодження проводилося в режимі 4°C до мінус 10°C при мінус 3°C/хв і від мінус 10°C до мінус 80°C при мінус 40°C/хв.

Деконсервацію спермодоз проводили за температури 38–39°C у водяному термостаті з експозицією 5–6 сек.

Визначення основних біологічних характеристик сперми (рухливість, виживаність, показник абсолютної виживаності), а також кріорезистентність здійснювали методами передбаченими нормативними документами. Зокрема при отриманні та оцінці нативної сперми бугаїв використовували норми та методи випробувань згідно ДСТУ 3535-97 «Сперма бугаїв нативна. Технічні умови» (1997). Оцінка якості заморожено-відталогої сперми проводилась за показниками, передбаченими ДСТУ 8778:2018 «Сперма бугаїв-плідників заморожена. Визначення показників якості та допущення до використання. Технічні умови» (2001).

Кріорезистентність сперми визначалася, як співвідношення рухливості заморожено-відталогої сперми і рухливості нативної сперми.

Осемініння корів проводили ректоцервікальним методом. Тільність у корів визначали ультразвуковим методом за допомогою сканера КХ-5200.

Результати досліджень. В результаті експериментів доведено, що за застосування у середовищах для розбавлення і кріоконсервації сперми речовин групи амідів таких як ДМФА, так і ДМАЦ, спостерігається певне підвищення кількості клітин з прямолінійно-поступовим (прогресивним) рухом, яке складало 5,9% та 9,0% відповідно дослідним групам.

Середовища доповнені кріопротекторними речовинами групи амідів також забезпечували достатньо високу виживаність сперми за температури тіла (38°C), яке значно перевищувало встановлену мінімально фізіологічну норму. У відсотках це перевищення складало 34,6% та 42,6% відповідно.

Також слід зазначити позитивний ефект щодо виживаності дослідних зразків сперми по відношенню до контрольних зразків. Так, середовища з ДМФА перевищувало контрольну характеристику на 10,3%, середовище з ДМАЦ – на 16,8%.

Як результат, поліпшення основних фізіологічних показників сперми (рухливість, виживаність) відповідно підвищилась і комплексна характеристика, якою є показник абсолютної виживаності сперми. Так, в першій дослідній групі вона була вищою на 8,0%, а у другій дослідній групі – на 12,8% по відношенню до контролю, що наведено у таблиці 1.

Відносно мінімально допустимої характеристики ці показники були відповідно вищими на 47,7% для середовища з ДМФА та 53,9% для середовища, що містило ДМАЦ.

Слід відмітити, достатньо високу кріорезистентність статевих клітин в дослідних групах, що було визначено як співвідношення рухливості заморожено-відталогої і нативної сперми, і яке суттєво перевищувало 50% рівень, який умовно прийнято вважати добрим показником.

1. Біологічні показники заморожено-відталі сперми бугаїв після кріоконсервування з використанням двохмоментного розбавлення у захисних середовищах з диметилформамідом та диметилацетамідом

Показники сперми бугаїв замороженої (n = 15)	Розбавники згідно Харківської технології			Мінімальні норми для заморожено-відталі сперми бугаїв
	Модифіковане середовище з гліцерином та ДМФА, M ± m	Модифіковане середовище з гліцерином та ДМАЦ, M ± m	Стандартні з гліцерином (контроль), M ± m	
Рухливість (спермії з прогресивним рухом), (%)	44,2% ± 1,0%	45,9 ± 1,0%	41,7 ± 0,6%	40,0
Кріорезистентність (%)	55,2%	57,3%	52,1%	–
Вживаність за t 38°C (год)	6,73 ± 0,10***	7,13 ± 0,22***	6,10 ± 0,12	5,0
Показник абсолютної виживаності за t 38°C (умов. од.)	17,73 ± 0,16***	18,47 ± 0,27***	16,37 ± 0,23	12,0

Примітка. *** $p < 0,001$.

Встановлено, що рухливість сперми була вищою у дослідних групах на 6,7% для ДМФА та 10,6% для ДМАЦ, у порівнянні з контролем. Відмічено також достовірно позитивний вплив композиції кріопротекторів, щодо тривалості життя сперміїв після деконсервації. Так виживаність в другій дослідній групі була більше на 0,67 год або 10,3%.

Кріорезистентність сперми у групах з полікомпонентними захисними речовинами була дещо (недостовірно) вищою на 2,0 та 4,2% відповідно.

Комплексна характеристика якою є показник абсолютної виживаності за t 38°C також виявила достовірно позитивний вплив комбінації проникаючих кріопротекторів, особливо суттєво при додаванні ДМАЦ (на 3,44 умов. од.) або 24,6% у порівнянні з монопротектором – гліцерином.

Заплідненість корів склала 59,4% (41 тільних з 69 осемінених тварин), 61,5% (40 з 65) та 48,4% (31 з 64), відповідно групам.

Висновки.

1. Доведено доцільність застосування у кріозахисних середовищах (розбавниках) для сперми бугаїв комбінацій ендоцелюлярних кріопротекторів, які створені з гліцерину та диметилформаміду (ДМФА) або гліцерину та диметилацетаміду (ДМАЦ), що підвищує якісні характеристики біоматеріалу.

2. Показано, що введення проникаючих кріопротекторів групи амідів сприяє підвищенню біологічних характеристик сперми бугаїв після заморожування-відтавання за показником виживаності – на 10,3%, за показником абсолютної виживаності – на 24,6%.

3. Застосування композитних кріопротекторів у середовищах для розбавлення сперми бугаїв сприяє підвищенню заплідненості корів на 11,0–13,1%.

REFERENCES

- Anzar, M., Rajapaksha, K., & Boswall, L. (2019). Egg yolk-free cryopreservation of bullsemen. *Plos ONE*, 14 (10), e0223977. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0223977>
- Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, 83 (3), 393–401. <http://doi.org/10.4141/A03-024>
- Bugrov, A. D. (2015). *Kriopovrezhdeniya i kriozaschita spermiev byikov pri glubokom zamorazhivani* [Cryodamage and cryoprotection of bull sperm during deep freezing]. Instytut tvarynnytstva NAAN. [In Ukrainian].
- Büyükblebici, S., Tuncer, P. B., Bucar, M. N., Ekan, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., & Endirlik, B. Ü. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reprod Science Anim.*, 150 (3–4), 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>

- Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G. G., Manca, M. E., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2015). Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, 3 (6), 1064–1074. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.012>
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, E. P., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post—thaw quality optimization. *Reprod Domest Anim.*, 54 (4), 655–665. <http://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A., & Zhang, Y. (2021). Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. *Front. Vet. Sci.*, 8, 609180. <http://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
- Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. (2019). Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 17 (6), 603–612. <http://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
- Linnik, T. P., & Bizikina, O. V. (2001). Fowl sperm cryopreservation. II. Amide and diol cryoprotective activity. *Problems of Cryobiology*, 4, 43–51.
- Nagata, M. B., Egashira, J., Katafuchi, N., Endo, K., Ogata, K., Yamanake, K., Yamanouchi, K., Matsuda, H., Hashiyada, Y., & Yamashita, K. (2019). Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *Journal of Animal Science and Biotech.*, 10 (91). <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-019-0395-9>
- Rudenko, Ye. V., Ostashko, F. I., Sushko, O. B., Pavlenko, B. M., Isachenko, Ye. F., & Savelieva, M. S. (2011). *Natsionalna tekhnolohiia kriokonservatsii ta vykorystannia spermy plemnykh plidnykiv u systemi krupnomasshtabnoi selektsii (Kharkivska tekhnolohiia aseptychnoho oderzhannia, kriokonservatsii i zberihannia spermy buhaiv v oblytsovanykh hranulakh ta shtuchnoho osimeninnia samyts)* [National technology of cryopreservation and use of semen of breeding sires in the system of large-scale breeding (Kharkiv technology of aseptic production, cryopreservation and storage of bulls' semen in coated granules and artificial insemination of females)]. Instytut tvarynyystva NAAN. [In Ukrainian].
- Sharafi, M., Zhandi, M., & Sharif, A. A. (2015). Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell Tissue Bank*, 16 (2), 261–269. <http://doi.org/10.1007/s10561-014-9458-5>
- Sushko, O. B., Mishchenko, A. H., Kompaniets, A. M., Smoronh, Z., & Bokhenek, M. (2009). Efektyvnist zastosuvannia bufernykh seredovysch krioprotektoriv i rezhymiv zamorozhuvannia spermy zherebtsiv [Effectiveness of the use of cryoprotectant buffer media and stallion semen freezing regimes]. *Visnyk ahrarnoi nauky – Bulletin of Agricultural Science*, 9, 35–39 [in Ukrainian].
- Sperma buhaiv natyvna. Tekhnichni umovy* [The bulls' semen is native. Technical conditions] (DSTU 3535-97) (1997). Derzhstandart Ukrainy. [In Ukrainian].
- Sperma buhaiv-plidnykiv zamorozhena. Vyznachennia pokaznykiv yakosti ta dopushchennia do vykorystannia* [The semen of the bulls is frozen. Determination of quality indicators and approval for use:] (DSTU 9778:2018). (2021). DP «UkrNDNTs». [In Ukrainian].
- Ugur, M. R., Abdelrahman, A. S., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. L., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front. Vet. Sci.*, 6, 268. <http://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>

Одержано редколегією 09.11.2023 р.

Прийнято до друку 25.12.2023 р.