

*Посвящается светлой памяти
Геннадия Владимировича Ескина*

ОПТИМАЛЬНЫЙ РЕЖИМ ОТТАИВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ ГОЛШТИНСКИХ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Н.А. КОМБАРОВА¹, Г.В. ЕСКИН¹, А.И. АБИЛОВ²,
Ю.А. КОРНЕЕНКО-ЖИЛЯЕВ², В.Н. ВИНОГРАДОВ², А.А. ГАЛАНКИНА¹

С повышением молочной продуктивности растет число животных с неполноценными половыми циклами и тихими проявлениями охоты, в связи с чем возникает потребность в семени с высокими качественными и количественными характеристиками. Кроме того, при искусственном осеменении после разбавления нативного семени, его расфасовки, криоконсервации и оттаивания число сперматозоидов в спермодозе снижается, что также значительно повышает требования к их качеству. Оттаивание — один из критических этапов при стандартной процедуре подготовки замороженной спермы быков-производителей к искусственному осеменению. Как следствие, процедуры криоконсервации и деконсервации требуют оптимизации протоколов с учетом предлагаемых модификаций этих методов и изменяющихся воспроизводительных способностей животных. В своем исследовании мы оценили влияние ранее рекомендованных и предложенных нами режимов деконсервации на сохранность сперматозоидов у российских голштинских быков-производителей и выявили режимы, которые достоверно обеспечивают пролонгированное положительное влияние на качественные характеристики сперматозоидов и лучшее сохранение их жизнеспособности после оттаивания. Сперма быков (возраст животных 3-7 лет) была расфасована и криоконсервирована в полипропиленовых соломинках (72 дозы) на оборудовании фирмы «IMV» (модель IS4, Франция) и необлицованных гранулах (90 доз) на пластинах сухого льда согласно ГОСТ 26030-2015 и Национальной технологии замораживания и использования спермы племенных быков-производителей. Всего было исследовано 162 дозы семени объемом 0,25 мл. Сразу после оттаивания и последующей инкубации в течение 5, 20 и 24 ч *in vitro* при 38 °С учитывали подвижность и скорость движения сперматозоидов. Подвижность определяли визуально в процентах при увеличении $\times 150$ (микроскоп CX41, «Olympus», Япония). В этих же образцах автоматически на спермоанализаторе SFA-500 (НПО «Биола», Россия) измеряли подвижность (%), долю быстрых сперматозоидов (%) и скорость движения (мкм/с). При помощи термопары (Center 304, «Center Technology Corp.», Тайвань) определяли температуру таяния семени в динамике и по окончании оттаивания. Эксперименты показали, что разные способы деконсервации спермодоз в соломинках и гранулах, протестированные в работе, в целом дают стабильные и почти идентичные результаты. Однако при последующей длительной инкубации спермодоз *in vitro* в течение 24 ч при температуре тела животного (38 °С) лучшие результаты по выживаемости мужских половых клеток зафиксированы в образцах, которые размораживали в водяной бане при 38 °С в течение 10 с ($p < 0,001$).

Ключевые слова: голштинцы, сперматозоиды, режим оттаивания, подвижность, скорость движения, соломинки, необлицованные гранулы.

За более чем 70-летнюю историю применения криоконсервации для сохранения мужских половых клеток метод получил широкое применение — как в исследовательских программах по сохранению биоразнообразия видов (1), так и в коммерческих целях при создании банков спермы различных видов животных (2) и человека (3). Столь длительная история вопроса позволяет обсуждать не только достижения, но и риски искусственного осеменения (4, 5). Есть мнение, что повышение молочной продуктивности негативно влияет на воспроизводство, в частности отмечается снижение числа отелов от первого осеменения (6). Основной причиной считают несоответствие энергетических затрат потребляемой энергии (7). Как следствие, растет число животных с неполноценными половыми циклами и тихими проявлениями охоты, что усложняет определение времени осеменения. В связи с этим возникает потребность в семени с высокими качественными и количественными характеристиками, способном дли-

тельное время (более 24 ч) находиться в половых путях самки без потери оплодотворяющей способности. В то же время при искусственном осеменении после разбавления нативного семени, его расфасовки, криоконсервации и оттаивании число сперматозоидов в спермодозе снижается, что также значительно повышает требования к их качеству.

Основные структурные повреждения сперматозоидов быков и жеребцов связаны с процедурой замораживания и последующего оттаивания (8-10) и спровоцированы фазовым переходом воды в лед и обратно (11, 12). Решающее значение для сохранения целостности мембран и оплодотворяющей способности сперматозоидов имеет температурно-скоростной режим оттаивания (13, 14). Известно, что образование внутриклеточного льда, повреждающего клетку, включает формирование центров кристаллизации и рост кристаллов. При постепенном и медленном охлаждении число центров кристаллизации невелико, но создаются благоприятные условия для их роста. Увеличивая скорость охлаждения, можно миновать оптимум температуры роста кристаллов без повреждения клеток. Размораживание требует максимально быстрого повышения температуры для предотвращения вторичного роста кристаллов льда внутри клеток. Особенно уязвимая точка в процессе оттаивания — значительная рекристаллизация льда (особенно внутри клеток) при -40°C . Формирование центров образования льда внутри клетки может привести к тому, что кристаллы льда будут расти во время оттаивания (15). Чтобы предотвратить вторичную рекристаллизацию, необходимо как можно быстрее провести оттаиваемый объект через зону вторичного роста кристаллов льда. Увеличение скорости оттаивания повышает число жизнеспособных клеток (16).

Самый простой и эффективный метод размораживания криоконсервированной спермы — на водяной бане (при $37-40^{\circ}\text{C}$ по разным протоколам) с помешиванием для предотвращения локальных температурных градиентов в воде. Чем выше температура водяной бани, тем короче пауза в подъеме температуры в оттаиваемом объекте после прохождения -20°C (17). Быстрый отогрев может повышать выживаемость криоконсервированных клеток благодаря сокращению времени прохождения зоны вторичного роста кристаллов льда и/или процессам, связанными с реорганизацией мембраны. В экспериментах Ф.И. Осташко (17) в облицованных спермодозах после оттаивания в проточной кипящей воде сперматозоиды имели подвижность и оплодотворяющую способность соответственно на 7 и 15 % выше, чем при оттаивании традиционным способом.

Структурно-метаболические нарушения в спермиях при замораживании и оттаивании сопровождаются повреждениями проксимальной центриоли, митохондрий и фибрилл. Наиболее выраженные изменения ультраструктуры спермиев выявлены в акросомах и митохондриях, незначительные структурно-метаболические изменения активности гиалуронидазы, акрозина, аспаргатаминотрансферазы и дыхания происходят при температурах около $4-6^{\circ}\text{C}$ (18, 19).

В рутинной практике племенных предприятий использование сложных тестов, основанных на определении ультраструктурных повреждений сперматозоидов, затруднительно (20-24). Для этого предложены технологии автоматизированной дифференциации сперматозоидов по функциональному состоянию, в частности комплексный компьютерный анализ спермы с применением экспонированной микросъемки движущихся сперматозоидов (CASA) (25). Хорошо зарекомендовал себя метод, позволяющий измерять концентрацию, суммарную подвижность, количество активно по-

движных (фертильных) сперматозоидов и среднюю скорость их движения на основе лазерного анализа частотного спектра флуктуаций оптической плотности образца сперматозоидов при движении через оптический канал (26). Этот метод адаптирован для практических целей на российских племенных предприятиях (8, 27).

До сих пор нет единого мнения о воздействии температуры водяной бани и времени оттаивания на сохранность функциональных характеристик деконсервированных сперматозоидов. Проблеме посвящено много публикаций (28-30), но в большинстве сведения об оптимальных условиях оттаивания спермодоз достаточно противоречивы, а указанные температуры варьируются от 20 до 75 °С (28, 31-33). В России в соответствии с национальной технологией общепринятой считается методика оттаивания в водяной бане при 38 °С в течение 10 с. В представленной работе мы впервые сопоставили разные режимы оттаивания семени с фиксацией конечной температуры и на этом основании выбрали оптимальный, позволяющий сохранить пролонгированную жизнеспособность оттаянных сперматозоидов в течение 24-часовой инкубации при 38 °С.

Целью настоящей работы было сравнение существующих и предложенных авторами режимов деконсервации спермодоз, криоконсервированных в полипропиленовых соломинках и необлицованных гранулах, и динамики их качественных характеристик (подвижность, скорость движения, переживаемость) при последующей инкубации *in vitro* при 38 °С.

Методика. Сперму, полученную от быков-производителей голштинской породы в возрасте 3-7 лет, подвергали крионсервации в полипропиленовых соломинках (72 дозы) на оборудовании фирмы «IMV», модель IS4 (Франция) и необлицованных гранулах (90 доз) на пластинах сухого льда согласно ГОСТ 26030-2015 и Национальной технологии замораживания и использования спермы племенных быков-производителей.

При оттаивании у извлеченных из водяной бани соломинок обрезали запаянный кончик, измеряли температуру внутреннего содержимого с помощью термодпары Center 304 («Center Technology Corp.», Тайвань), нажимая поршнем на полипропиленовую пробку, выдавливали оттаянную спермодозу (0,23 мл) в пенициллиновый флакон с 0,8 мл разбавителя optiXcell («IMV», Франция), прогретого до температуры 30 °С. Использовали режимы оттаивания: 35 °С, 30 с; 38 °С, 10 с (контроль); 50 °С, 5 с; 70 °С, 3 с (по 18 спермодоз в каждом варианте). При оттаивании семени, замороженного в необлицованных гранулах, их быстро по одной извлекали из тубы стерильным, предварительно охлажденным в жидком азоте пинцетом и погружали в пенициллиновые флаконы с 0,8 мл разбавителя optiXcell либо с 2,9 % цитрата натрия. При сухом оттаивании гранулы переносили в чистые сухие флаконы.

Сразу после оттаивания и далее через 5, 20 и 24 ч после инкубации *in vitro* при 38 °С учитывали подвижность (%) визуально под микроскопом (CX41, «Olympus», Япония; увеличение $\times 150$). В этих же образцах на спермоанализаторе SFA-500 (НПО «Биола», Россия) с использованием лазерного анализатора частотного спектра флуктуаций оптической плотности, вызванных движением сперматозоидов через оптический канал со специальными характеристиками, измеряли подвижность (%), пул быстрых сперматозоидов (%) и среднюю скорость движения сперматозоидов (мкм/с). При помощи термодпары Center 304 («Center Technology Corp.», Тайвань) контролировали температуру таяния семени в динамике. Рассчитывали процент подвижных и быстроподвижных сперматозоидов, а также

скорость движения и число сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (ППД) на разных сроках инкубации.

Данные обрабатывали методами вариационной статистики, в таблицах приведены средние (M) для каждой серии эксперимента и стандартные ошибки средних ($\pm SEM$). Достоверность различий определяли с применением t -критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Оттаивание семени в необлицованных гранулах проводили при разных режимах (табл. 1).

1. Режимы оттаивания необлицованных гранул с криоконсервированной спермой голштинских быков

Буфер-разбавитель	Температура буфера-разбавителя, °С	Время, с
В водяной бане (40 °С)		
Разбавитель optiXcell (Франция)	38	10
Цитрат натрия (2,9 %)	38	10
Сухое оттаивание		До полного оттаивания
Цитрат натрия (2,9 %)	4	12-13
Разбавитель optiXcell (Франция)	4	12-13
При комнатной температуре (23 °С)		
Разбавитель optiXcell (Франция)	23	До полного оттаивания
Цитрат натрия 2,9 %	23	До полного оттаивания
Сухое оттаивание		До полного оттаивания
В холодильнике (4 °С)		
Сухое оттаивание		До полного оттаивания

Соломинки с семенем одной серии одновременно оттаивали в водяных банях в указанных режимах, измеряя температуру внутри соломинок сразу после оттаивания. По вариантам температура семени составила 26,0; 25,3; 26,0; 24,3 °С (в среднем для всех режимов $25,0 \pm 0,4$ °С, различия статистически недостоверны). Следовательно, независимо от режима деконсервации конечная температура оттаянных спермодоз была практически одинаковой.

Сравниваемые режимы оттаивания не оказали существенного достоверного влияния на количество сперматозоидов с ППД (колебания в пределах 35-38 %), что подтвердилось и при исследовании образцов на анализаторе SFA-500 (34,4-36,5 % клеток, различия недостоверны) (табл. 2). Это согласуется с данными других авторов, полученных на семени буйвола (28, 31), крупного рогатого скота (29), зебу (31). Аналогичные результаты мы получили для быстроподвижных сперматозоидов (различия недостоверны при вариациях от 23,8 до 24,2 %). Наибольшую скорость движения сперматозоидов отмечали в образцах, размороженных при 35 °С, и она снижалась при деконсервации с ростом температуры водяной бани (при максимальной температуре наблюдали достоверные различия, $p < 0,001$). При оттаивании криоконсервированной спермы буйволов скорость была максимальной в образцах, оттаянных при + 70 °С (28).

2. Подвижность и доля (%) подвижных спермиев в семени голштинских быков, оцененная двумя методами сразу после оттаивания 72 доз при разных режимах (ОАО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных», Московская обл., 2018 год)

Температура оттаивания, °С	Микроскопия доля подвижных, %	Анализатор SFA-500		
		доля подвижных, %		средняя скорость, мкм/с
		медленные + быстрые	быстрые	
0 ч инкубации in vitro, 38 °С				
35	35,0±0,90	34,4±0,09*	23,9±0,30	100,7±1,2
38 (контроль)	38,3±0,53	35,1±0,30	23,7±0,20	97,8±1,03
50	36,6±0,53*	36,5±0,76	24,2±0,40	96,3±0,6

<i>Продолжение таблицы 2</i>				
70	35,0±0,90**	34,4±0,70	23,8±0,30	91,3±0,16***
5 ч инкубации in vitro, 38 °С				
35	30,0±0,90	38,4±0,70	27,8±0,20*	97,8±2,30
38 (контроль)	30,0±0,93	37,8±0,13	28,7±0,40	102,8±1,70
50	30,0±0,93	34,5±0,66***	26,2±0,20***	102,0±1,70
70	28,3±1,40	38,9±0,20***	27,3±0,20**	96,6±1,36**
20 ч инкубации in vitro, 38 °С				
35	20,0±0,00***	24,0±0,5**	15,1±0,30***	81,6±0,30
38 (контроль)	23,3±0,53	26,3±0,56	16,7±0,05	81,6±1,30
50	20,0±0,09***	19,8±0,26***	12,8±0,33***	76,9±1,50*
70	18,3±0,50***	19,8±0,60***	12,5±0,43***	79,1±0,30
24 ч инкубации in vitro, 38 °С				
35	10,0±1,70***	11,4±1,60***	5,8±0,80***	71,0±0,30***
38 (контроль)	15,0±0,00	18,4±0,4	11,4±0,46	79,3±1,36
50	8,3±0,53***	10,7±0,7***	4,9±0,6***	62,7±2,70***
70	5,6±0,70***	8,2±0,93***	4,1±0,43***	73,1±0,86***

*, **, *** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$.

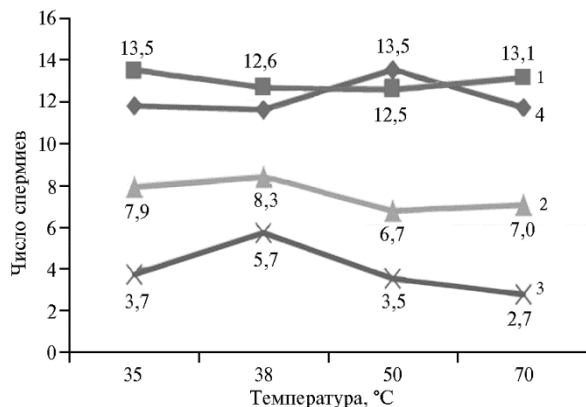
После 5 ч инкубации образцов in vitro (см. табл. 2) отмечалось несовпадение результатов оценки подвижности: визуально ее сохраняли 28,3-30,0 % сперматозоидов, тогда как компьютерный анализ выявил на 4-10 % больше подвижных половых клеток. Кроме того, спермоанализатор зафиксировал увеличение моторики сперматозоидов по сравнению с состоянием сразу после оттаивания. Аналогичные данные были получены после 2-часовой инкубации (29). Достоверно наибольшее количество таких клеток (38,9 %) наблюдали при быстрой деконсервации (70 °С), достоверно наименьшее — при температуре размораживания 50 °С.

Отметим, что доля быстроподвижных (фертильных) спермиев (28,7 % при средней скорости 102,8 мкм/с) оказалась достоверно выше при стандартной технологии оттаивания. Различия между контрольной и опытными группами во всех случаях были статистически значимыми. Вероятно, визуально фиксируются преимущественно сперматозоиды с ППД, тогда как спермоанализатор учитывает все сперматозоиды, движущиеся по разным траекториям со скоростью свыше 25 мкм/с. Этот минимальный порог скорости установлен для отсеивания клеток, не имеющих собственной подвижности и перемещающихся с током жидкости (8). Спустя 20 ч инкубации (см. табл. 2) число сперматозоидов с ППД сократилось в среднем на 10 %, средняя скорость — на 20 % по сравнению показателями после 5 ч инкубации. Отметим, что в спермодозах, деконсервированных по стандартной методике, сохранилось больше клеток с ППД. Эта тенденция прослеживалась как при рутинной микроскопии, так и при автоматическом исследовании (наблюдаемые различия статистически значимы). Через 1 сут после оттаивания и инкубации in vitro при 38 °С (см. табл. 2) лучшую сохранность (доля подвижных сперматозоидов 18,1 %) также проявили образцы семени, деконсервированные в водяной бане при 38 °С по стандартной методике (разница с образцами при других режимах — от 6,7 до 10,0 %; различия статистически значимы при $p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что отступления от общепринятой методики оттаивания семени снижают его качественные характеристики и оплодотворяющую способность. Это подчеркивает необходимость строжайшего соблюдения установленных регламентов. В ряде публикаций также сообщается, что лучшие результаты дает оттаивание спермодоз в диапазоне температур от 37 до 40 °С (30, 31). Четкое соблюдение методики оттаивания спермы может повысить результативность искусственного осеменения, особенно при поздней овуляции (более 24 ч после выявленной охоты; число таких животных среди высокопродуктивных особей

составляет более 50 %) (27).

Суточная динамика активности клеток, выраженная в абсолютных величинах (рис.), показывает, что сразу после оттаивания число подвижных спермиев в среднем составляло 33–35 млн, и около трети из них — это сперматозоиды с ППД (при подсчете не учитывали спермии со скоростью движения ниже 25 мкм/с). После 5 ч инкубации во всех группах число спермиев с ППД возрастало на 8–12 % (исключение — спермодозы, размороженные при 50 °С). Возможно, наблюдаемое увеличение связано с начинающимися процессами гиперактивации.



Число спермиев ($\times 10^6$ кл. на спермодозу) с прямолинейно-поступательным движением у голштинских быков в зависимости от температурного режима размораживания спермодоз и разных сроков их последующей инкубации: 1 — 5 ч, 2 — 20 ч, 3 — 24 ч, 4 — без инкубации (ОАО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных», Московская обл., 2018 год)

сперматозоидов коррелирует с оплодотворяющей способностью и может успешно использоваться для ее экспресс-тестирования, в практической работе все же следует контролировать продолжительность жизни половых клеток вне организма.

С увеличением срока инкубации (до 20 и 24 ч) наибольшее число сперматозоидов с ППД (соответственно 8,3 и 5,7 млн) сохранялась в образцах, дефростированных в водяной бане при 38 °С в течение 10 с. Через 24 ч в образцах, размороженных в водяной бане при других температурах, число клеток с ППД было на 2–3 млн меньше (см. рис.). Это следует учитывать при осеменении, так как в половых путях самки сперма накапливается в специальном резервуаре яйцевода, прикрепляясь к его стенкам не теряя своей оплодотворяющей способности в течение суток при условии сохранения своей функциональной полноценности (33).

В экспериментах с необлицованными гранулами мы изменили стандартные условия деконсервации. Согласно утвержденному в России протоколу, дозу семени следует поместить во флакон с 1 мл 2,9 % цитрата натрия, предварительно прогретого до 38 °С и размораживать при 40 °С в течение 8–10 с до тонкого ледяного стерженька. Мы выполняли размораживание вне водяной бани при комнатной температуре 23 °С, а также использовали водяную баню при 40 °С, но предварительно охлажденный до 4 °С цитратный буфер. Оптимальные результаты получили при оттаивании гранул с использованием водяной бани (табл. 3). Более того, начальные показатели семени были несколько выше во всех вариантах с охла-

Известно, что процесс замораживания-оттаивания служит пусковым механизмом самопроизвольной капацитации. Считают, что процесс капацитации сперматозоидов термозависим, а блокирующий эффект преодолевается при возвращении спермиев к температуре 37 °С (32). Ключевым фактором здесь выступает частичное криповреждение мембран клеток, в частности в районе акросомального чехлика, вследствие чего изменяется внутриклеточная концентрация кальция (34). Несмотря на то, что у крупного рогатого скота подвижность

жденным цитратом. Однако после 5 ч инкубации активных сперматозоидов оказалось на 11,6 % больше при размораживании в цитратном буфере, прогревом до 38 °С.

Конечная температура оттаивания, определенная с помощью термомпары, в суспензии половых клеток при размораживании в водяной бане в обоих случаях была одинаковой и в среднем оставила примерно 28 °С с незначительным увеличением по времени оттаивания при использовании охлажденного буфера. Размораживание гранул в цитратном буфере при комнатной температуре (23 °С) показало, что время оттаивания возрастает, конечная температура суспензии достоверно ($p < 0,05$) снижается до 13,9 °С, а сохранность сперматозоидов значительно ухудшается по сравнению с показателями, которые отмечали при использовании водяной бани (40 °С). В конечном итоге это снизит результативность искусственного осеменения.

3. Качественные характеристики семени голштинских быков, криоконсервированного в необлицованных гранулах, после размораживания в водяной бане с разными разбавителями и инкубации (0 ч и 5 ч) (ОАО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных», Московская обл., 2018 год)

Микроскопия		Анализатор SFA-500			Время оттаивания, с	Температура спермодозы, °С
доля подвижных, %		доля подвижных, %		средняя скорость, мкм/с		
0 ч	5 ч	медленные + быстрые	быстрые			
Цитрат натрия (2,9 %)						
<i>Контроль</i> (1 мл разбавителя, t = 38 °С, t размораживания 40 °С)						
36,6±1,60	28,3±1,60	36,0±2,30	21,6±0,90	84,3±2,30	10,0±0,00	28,5±4,20
<i>I группа</i> (1 мл разбавителя, t = 23 °С, без водяной бани)						
33,3±3,30	16,6±4,40*	29,3±1,00*	18,8±1,20	96,6±4,90*	23,3±2,00***	13,9±4,50*
<i>II группа</i> (1 мл разбавителя, t = 4 °С, t размораживания 40 °С)						
41,6±1,60*	25,0±2,80	47,3±2,80*	23,1±2,50	73,2±9,90	13,6±1,20	28,3±0,30
Синтетический разбавитель optiXcell (Франция)						
<i>Контроль</i> (1 мл разбавителя, t = 38 °С, t размораживания 40 °С)						
31,6±4,40	30,0±5,00	40,5±3,50	23,6±3,10	84,3±6,50	11,3±1,30	28,6±0,80
<i>III группа</i> (1 мл разбавителя, t = 23 °С, без водяной бани)						
35,1±0,10	30,0±2,80	48,8±8,10	28,2±2,30	86,8±5,00	14,6±0,60*	18,3±0,60**
<i>IV группа</i> (1 мл разбавителя, t = 4 °С, t размораживания 40 °С)						
36,6±1,60	26,6±3,30	38,0±1,50	22,0±0,20	83,9±3,20	12,0±1,00	29,3±1,30

*, **, *** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$.

В настоящее время в России на племенных предприятиях преимущественно применяют импортруемые синтетические разбавители спермы. В нашем опыте при замене цитратного буфера синтетической средой optiXcell размораживание необлицованных гранул дало неоднозначные результаты, которые требуют дальнейшего изучения (см. табл. 3). Как и в варианте с цитратным буфером, сразу после деконсервации с использованием водяной бани (40 °С) подвижность сперматозоидов была выше в разбавителе, охлажденном до 4 °С, но после 5-часовой инкубации активных сперматозоидов оказалось на 11,3 % больше в случае изначально теплого (38 °С) разбавителя. При этом конечная температура полученной суспензии половых клеток и время оттаивания спермодозы не отличались от таковых для цитратного буфера. Несколько иные закономерности проявились при деконсервации необлицованных гранул в синтетическом разбавителе при комнатной температуре: процесс оттаивания по времени сократился на 8,7 с, а конечная температура образцов повысилась 4,4 °С по сравнению с показателями для цитратного буфера. Подвижность и сохранность сперматозоидов в группе, где спермодозы размораживали при комнатной температуре с синтетическим разбавителем optiXcell, имели тенденцию к улучшению (без подтверждения статистически значимых раз-

личий). Полученные данные указывают на необходимость изучения механизмов действия этого синтетического разбавителя при замораживании/оттаивании спермы. Предполагается, что белки семенной плазмы связываются с фракцией низкой плотности яичного желтка, входящего в состав среды, что имеет решающее значение в сохранении клеточной мембраны сперматозоидов (35, 36).

В нашем опыте при сухом оттаивании (без разбавителя) проявилась прямо пропорциональная зависимость между подвижностью сперматозоидов и температурой окружающей среды (табл. 4). Так, лучшие результаты получили при 40 °С (контроль): 45 % сперматозоидов имели ППД сразу после оттаивания и 30 % сохраняли жизнеспособность после 5 ч инкубации при 38 °С. С увеличением времени оттаивания и снижением температуры окружающей среды доля жизнеспособных сперматозоидов сокращалась: при комнатной температуре спустя 5 ч выживаемость составила 21 % по сравнению с 66 % в первом варианте. При медленной деконсервации (4 °С) время оттаивания резко возросло (до 820 с), что губительно сказалось на жизнеспособности сперматозоидов: непосредственно после оттаивания ППД сохраняли только 6,7 % спермиев, спустя 5 ч — лишь единичные клетки.

4. Качественные характеристики семени голштинских быков, криоконсервированного в необлицованных гранулах, после сухого оттаивания (без разбавителя) и инкубации (0 ч и 5 ч) (ОАО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных», Московская обл., 2018 год)

Режим оттаивания	Доля подвижных, %		Время оттаивания, с	Температура спермодозы, °С
	0 ч	5 ч		
На водяной бане при 40 °С (контроль)	45,0±2,80	30,0±0,00	56,0±3,05	27,7±8,20
При комнатной температуре 23 °С	23,3±6,00**	5,0±0,00***	222,3±76,00*	12,2±5,14
В холодильнике при 4 °С	6,7±1,60***	1,7±1,60***	820,0±40,00***	15,2±1,80

*, **, *** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$.

В таблице 4 отсутствуют данные, полученные с помощью анализатора SFA-500: в характеристиках прибора указаны пределы концентрации сперматозоидов (5-100 млн/мл) для качественного и количественного анализа образца с допустимой погрешностью, вне этих значений погрешность резко возрастает. В нашем опыте при сухом оттаивании концентрация в объеме спермодозы возрастала до 160-190 млн/мл, что сделало интерпретацию полученных результатов невозможной (дополнительное применение сред и буферов для разбавления семени привело бы к искажению первоначального эффекта).

Таким образом, технологии деконсервации спермодоз, расфасованных в соломинки и необлицованные гранулы, нашли широкое практическое применение во всем мире и постоянно совершенствуются. В нашем опыте наилучшие результаты с бычьей спермой дало размораживание в течение 10 с в водяной бане при 38 °С для соломинок и 40 °С — для необлицованных гранул. Эти протоколы достоверно обеспечивают пролонгированное положительное влияние на качественные характеристики сперматозоидов и лучшее сохранение их жизнеспособности после оттаивания, чем другие способы ($p < 0,001$). Полученные нами результаты также показали, что одна из современных модификаций этих процедур, а именно использование синтетических безжелтковых разбавителей, требует углубленного изучения влияния таких сред на качественные характеристики сперматозоидов у животных разных видов и уточнения на этой основе существующих технологических регламентов деконсервации. Наши данные подтверждают известный факт, что даже небольшие отклонения условий от

оптимальных при проведении описанных процедур могут значительно ухудшить свойства спермиев и в итоге снизить результативность искусственного осеменения. При этом в ряде случаев наблюдаемые эффекты неоднозначны, что указывает на возможный сложный механизм воздействия применяемых агентов на характеристики спермиев и, как следствие, на результаты искусственного осеменения.

*1*АО «Головной центр по воспроизводству
сельскохозяйственных животных»,
142143 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Быково,
ул. Центральная, 3,
e-mail: komnina@list.ru ✉, nastenka-shar@yandex.ru;

*2*ФГБНУ Федеральный научный центр
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: ahmed.abilov@mail.ru ✉, serafima_venera@mtu-net.ru,
klenovo-vig@mail.ru

Поступила в редакцию
10 апреля 2018 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 6, pp. 1219-1229

OPTIMAL MODE TO THAW CRYOPRESERVED SPERM OF HOLSTEIN BULL SIRE

N.A. Kombarova¹, [G.V. Eskin¹](#), A.I. Abilov², Yu.A. Kornienko-Zhilyaev²,
V.N. Vinogradov², A.A. Galankina¹

¹Head Center for Reproduction of Farm Animals AO, 3, ul. Tsentralnaya, pos. Bykovo, Podolsk Region, Moscow Province, 142143 Russia, e-mail komnina@list.ru (✉ corresponding author), nastenka-shar@yandex.ru;

²Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail ahmed.abilov@mail.ru (✉ corresponding author), serafima_venera@mtu-net.ru, klenovo-vig@mail.ru

ORCID:

Kombarova N.A. orcid.org/0000-0003-3861-4465

Galankina A.A. orcid.org/0000-0002-5246-0506

Abilov A.I. orcid.org/0000-0001-6236-8634

Vinogradov V.N. orcid.org/0000-0002-9295-0059

Kornienko-Zhilyaev Yu.A. orcid.org/0000-0003-3554-2240

The authors declare no conflict of interests

Received April 10, 2018

doi: 10.15389/agrobiol.2018.6.1219eng

Abstract

As milk yielding increases, the number of animals with defective sexual cycles and quiet manifestations of hunting grows, and therefore there is a need for semen with high quality. Also, at artificial insemination, after dilution of the native semen, packaging, cryopreservation and thawing, the number of spermatozoa per sperm dose decreases. This also necessitates semen with high quality parameters. One of the key stages of the standard processing of cryopreserved bovine semen prior to artificial insemination is the thawing procedure. Therefore, cryopreservation and thawing procedures should be optimized with regard to the proposed modifications of these methods and the changing reproductive abilities of animals. In our study, we compared the effects of previously recommended thawing protocols and those proposed by us on the safety of spermatozoa of Russian Holstein sires and identified the modes that reliably provide a prolonged positive effect on the quality characteristics of spermatozoa and better preservation of their viability after thawing. The semen of 6-7 year-old Holstein bulls was cryopreserved in polypropylene straws (72 doses) with the use of the IMV Technology equipment (France) and in uncoated pellets (90 doses) on the dry ice plates according to GOST State Standard 26030-2015 and the National Technology for Freezing and Handling Semen of Pedigree Bull Sires. Thus, 162 semen doses 0.25 ml each were analyzed. The sperm motility and movement velocity parameters were assessed immediately and after in vitro post-thawed incubation for 5 to 24 hours at 38 °C. The percentage of motile semen was visually assessed with the Olympus microscope CX41 (Japan) at ×150 magnification. Thereafter, in the same samples the motility (%), the number of the highly motile sperm (%), and the sperm velocity (mcm/sec) were automatically measured with the SFA-500 Sperm Analyzer (Biola Company, Ltd, Russia). The dynamic of thawing temperature up to the final value was measured with the Center 304 thermocouple. It has been ascertained that the effects of different procedures used for thawing straws and pellets are quite steady and approximately the same. However, the best results of the male sex cell survival after the long in-vitro incubation period (for 24 hours at the animal body temperature of 38 °C) are in the samples thawed in a water bath at 38 °C for 10 sec when compared to those for the other methods (p < 0.001).

Keywords: Holsteins, sperm, thawing procedure, motility, sperm velocity, straws, uncoated pellets.

REFERENCES

1. Iolchiev B.S., Abilov A.I., Tadzhiya A.V., Bagirov V.A., Nasibov Sh.N., Shaidullin I.N., Klenovitskii P.M., Kombarova N.A., Zhilinskii M.A. Biological integrity of bison epididymal sperm under cryoconservation and long storage. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, 52(2): 282-290 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.282eng).
2. Amstislavskii S.Ya., Brusentsev E.Yu., Abramova T.O., Ragaeva D.S., Rozhkova I.N., Igonina T.N., Kizilova E.A., Naprimerov V.A., Feoktistova N.Yu. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*, 2015, 19(4): 367-371 (doi: 10.18699/VJ15.045) (in Russ.).
3. Evdokimov V.V., Erokhin A.S., Aibyatov D.T., Erasova V.I. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*, 2012, 1: 21-25 (in Russ.).
4. Aungier S.P., Roche J.F., Diskin M.G., Crowe M.A. Risk factors that affect reproductive target achievement in fertile dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2014, 97(6): 472-387 (doi: 10.3168/jds.2013-7404).
5. Galli C. Achievements and unmet promises of assisted reproduction technologies in large animals: a personal perspective. *Anim. Reprod.*, 2017, 14(3): 614-621 (doi: 10.21451/1984-3143-AR1005).
6. Kononov V.P. *Farm Animals*, 2015, 1: 40-47 (in Russ.).
7. Reshetnikova N.M., Eskin G.V., Kombarova N.A., Poroshina E.S., Shavyrin I.I. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2011, spetsvypusk 4: 116-121 (in Russ.).
8. Kombarova N.A., Malinovskii A.M., Popov E.G. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2011, spetsvypusk 4: 53-57 (in Russ.).
9. Atroshchenko M.M., Kalashnikov V.V., Bragina E.E., Zaitsev A.M. Comparative study of the structural integrity of spermatozoa in epididymal, ejaculated and cryopreserved semen of stallions. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, 52(2): 274-280 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.274eng).
10. Bailey J.L., Blodeau J., Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon minireview. *Journal of Andrology*, 2000, 21(1): 1-7 (doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x).
11. Kostyaev A.A., Martusevich A.K., Andreev A.A. *Nauchnoe obozrenie. Meditsinskie nauki*, 2016, 6: 54-74 (in Russ.).
12. Dalal J., Kumar A., Dutt R., Singh G., Chandolia R.K. Different cooling rate for cryopreservation of semen in various livestock species: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018, 7: 1903-1911 (doi: 10.20546/ijcmas.2018.708.219).
13. Ansari M.S., Rakha B.A., Andrabi S.M.H., Akhter S. Effect of straw size and thawing time on quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Reproductive Biology*, 2011, 11(1): 49-54 (doi: 10.1016/S1642-431X(12)60063-1).
14. Miranda M., Kulíková B., Vašíček J., Olexiková L., Iaffaldano N., Chrenek P. Effect of cryoprotectants and thawing temperatures on chicken sperm quality. *Reprod. Domest. Anim.*, 2018, 53(1): 93-100 (doi: 10.1111/rda.13070).
15. Rall W., Reid D., Farrant J. Innocuous biological freezing during warming. *Nature (Lond.)*, 1980, 286: 511-514.
16. Taylor M., Bank H., Benton M. Selective destruction of leucocytes by freezing as a potential means of modulating tissue immunogenicity: membrane integrity of lymphocytes and macrophages. *Cryobiology*, 1987, 24(2): 91-102 (doi: 10.1016/0011-2240(87)90011-3).
17. Ostashko F.N. *Biotehnologiya vosproizvedeniya krupnogo rogatogo skota [Biotechnology of cattle reproduction]*. Kiev, 1995 (in Russ.).
18. Ozkavukcu S., Erdemli E., Isik A., Oztuna D., Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2008, 25(8): 403-411 (doi: 10.1007/s10815-008-9232-3).
19. Frenau G.E., Chenoveth H.J., Elis R., Rupp G. Sperm morphology of beef bulls evaluated ted by two deferent method. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010, 118: 176-181 (doi: 10.2016/j.anireposci.2009.08.015).
20. Walczak-Jedrzejowska R., Wolski J.K., Slowikowska-Hilczler J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, 2013, 66: 60-67 (doi: 10.5173/cej.2013.01.art19).
21. Yániz J.L., Capistray S., Vicente-Fiel S., Hidalgo C.O., Santolaria P. A comparative study of the morphometry sperm head components in cattle, sheep, and pigs with a computer-assisted fluorescence method. *Asian Journal of Andrology*, 2016, 18: 840-843 (doi: 10.4103/1008-682X.186877).
22. Banaszewska D., Andraszek K., Czubaszek M., Biesiada-Drzazga B. The effect of selected staining techniques on bull sperm morphometry. *Anim. Reprod. Sci.*, 2015, 159: 17-24 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.06.019).
23. Soler C., Cooper T.G., Valverde A., Yániz J.L. Afterword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in *Asian Journal of Andrology*. *Asian Journal of Andrology*, 2016, 18: 895-897 (doi: 10.4103/1008-682X.187582).
24. Yaniz J.L., Santolaria P., Marco Aguado Lopez-Gatius F. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology*, 2008, 70(2): 192-198 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.03.002).

25. Soler K., Valverde A., Bombart D., Ferdeindonfar S., Sancho M., Yaniz Kh.L., Garsiya-Molina A., Korneenko-Zhilyaev Yu.A. New methods of semen analysis by CASA (computer-assisted sperm analysis). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, 52(2): 232-241 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.232eng).
26. Kombarova N.A., Zhavoronkova N.V., Malinovskii A.M., Popov E.G. *Praktik*, 2010, 2: 56-61 (in Russ.).
27. Kononov V.P., Chernykh V.Ya. *Biotehnika reproduksii v molochnom skotovodstve* [Biotechnology of reproduction in dairy cattle breeding]. Moscow, 2009 (in Russ.).
28. Rastegarnia A.R., Shahverdi A.H., Rezaei Topraggaleh T., Ebrahimi B., Shafipour V. Effect of different thawing rates on post-thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell J.*, 2013; 14(4): 306-313.
29. Muiño R., Rivera M.M., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., Peca A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, 109(1-4): 50-64 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.028).
30. Calamera J.C., Buffone M.G., Doncel G.F., Brugo-Olmedo S., de Vincentiis S., Calamera M.M., Storey B.T., Alvarez J.G. Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa *Fertil. Steril.*, 2010, 93(3): 789-794 (doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.10.021).
31. Anwar M., Andrabi S.M., Mehmood A., Ullah N. Effect of low temperature thawing on the motility and fertility of cryopreserved water buffalo and zebu bull semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2008, 32(6): 413-416.
32. Marin-Briggiler C.I., Tezon J.G., Miranda P.V., Vazquez-Levin M.H. Effect of incubating human sperma at room temperature on capacitation-related events. *Fertil. Steril.*, 2002, 77(2): 252-259 (doi: 10.1016/S0015-0282(01)02982-X).
33. Suarez S.S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in Domestic Animals*, 2002, 37(3): 140-142 (doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00346.x).
34. Payan-Carreira R., Borges P., Mir F., Fontbonne A. *Molecular markers in sperm analysis, success in artificial insemination*. Alemayehu Lemma, IntechOpen, January 9th 2013 (doi: 10.5772/52231). Available <https://www.intechopen.com/books/success-in-artificial-insemination-quality-of-semen-and-diagnostics-employed/molecular-markers-in-sperm-analysis>. No date.
35. Bergeron A., Ménard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, 2002, 67: 1250-1258
36. Röpke T., Oldenhof H., Leiding C., Sieme H., Bollweina H., Wolkersd W.F. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*, 2011, 76(8): 1465-1472 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.015).