

Сравнителен анализ на параметрите на криоконсервирана сперма от коч в зависимост от използваната среда

Григор Дарие¹, Елена Циботару², Ирина Дженджера¹, Нина Браду¹

¹Национален институт за приложни изследвания в областта на селското стопанство и ветеринарната медицина, Молдова

²Технически Университет Молдова

Comparative Analysis of Cryopreserved Ram Sperm Parameters Depending on the Dilution Medium

Grigore Darie¹, Elena Cibotaru², Irina Djenjera¹, Nina Bradu¹

¹National Institute for Applied Research in Agriculture and Veterinary Medicine, Republic of Moldova

²Technical University of Moldova

E-mail: lenuta_mar@yahoo.com, iradjenjera@gmail.com

Original Scientific Paper

РЕЗЮМЕ

За да се подобри ефективността на дългосрочното съхранение на сперматозоиди извън тялото на животните, е необходимо да се усъвършенстват защитните среди, които спомагат за намаляване на въздействието на криоувреждащите фактори върху сперматозоидите.

В това изследване е използвана сперма от кочове от породата Асаф. Сперматозоидите са събирани от кочовете два пъти седмично с помощта на изкуствена вагина, което гарантира високо качество на материала. За анализ бяха избрани еякулати с поне 70% подвижност и концентрация от 2,0 до 2,5 милиарда сперматозоиди на милилитър.

Целта на изследването беше да се сравнят параметрите на

SUMMARY

To improve the effectiveness of long-term sperm storage outside the animal's body, it is necessary to enhance the protective media that help reduce the impact of cryodamaging factors on sperm.

In this study, sperm from Assaf breed rams was used.

Sperm was collected from the rams twice a week using an artificial vagina, which ensured high-quality material. For analysis, ejaculates with at least 70% motility and a concentration of 2,0 to 2,5 billion sperm per milliliter were selected.

The aim of the study was to compare the parameters of

криоконсервираните сперматозоиди в зависимост от използваната синтетична среда: GTJ, STJ+MP и STJ+IMB-2. Това позволи да се определи най-подходящият разредител, който осигурява по-висока степен на наторяване.

По време на изследването бяха анализирани основните параметри на криоконсервираните сперматозоиди, включително подвижността, процентът на патологичните форми, целостта на плазмената мембрана (въз основа на резултатите от теста за хипоосмотично набъбване) и целостта на акрозомата.

Най-високи стойности бяха постигнати при пробите, разредени със средата STJ+IMB-2. В тази група бяха получени следните резултати:

подвижност – $54,0 \pm 0,4\%$,
скорост (VAP) – $91,8 \pm 3,4\%$,
VSL – $75,5 \pm 3,9\%$,
VCL – $132,0 \pm 3,8\%$,
процент на аномалии – $16,75\%$,

акрозомна цялост – $24,15 \pm 0,31\%$,

целост на плазмената мембрана – $65,6 \pm 0,7\%$.

Получените данни показват, че средата STJ+IMB-2 осигурява най-ефективна защита на сперматозоидите по време на криоконсервация в сравнение с други среди като GTJ и STJ+MP. Тези резултати подчертават важността на избора на подходяща среда за оптимизиране на процесите на криоконсервация и повишаване на процента на оплождане.

Ключови думи: сперматозоиди, еякулат, подвижни сперматозоиди, концентрация, акрозомата, плазмена мембрана.

УВОД

Организацията на възпроизводството при селскостопанските животни е немислима без прилагането на изкуствено осеменяване, което

cryopreserved sperm depending on the synthetic media used: GTJ, STJ+MP, and STJ+IMB-2. This allowed for the determination of the most suitable extender to ensure a higher fertilization rate.

During the study, the main parameters of cryopreserved sperm were analyzed, including motility, percentage of pathological sperm forms, plasma membrane integrity (based on the hypoosmotic swelling test results), and acrosome integrity.

The highest values were achieved with samples diluted with the STJ+IMB-2 medium. In this group, the following results were obtained:

motility – $54,0 \pm 0,4\%$,
velocity (VAP) – $91,8 \pm 3,4\%$,
VSL – $75,5 \pm 3,9\%$,
VCL – $132,0 \pm 3,8\%$,
percentage of anomalies –

$16,75\%$,
acrosome integrity – $24,15 \pm 0,31\%$,
and plasma membrane integrity was $65,6 \pm 0,7\%$.

The obtained data suggest that the STJ+IMB-2 medium provided the most effective protection for sperm during cryopreservation compared to other media such as GTJ and STJ+MP.

These results highlight the importance of selecting an appropriate medium to optimize cryopreservation processes and improve fertilization rates.

Keywords: sperm, ejaculate, medium, motility, concentration, acrosome, plasma membrane.

INTRODUCTION

The organization of livestock reproduction is unimaginable without artificial insemination, which is a modern method of reproduction.

представлява съвременен и широко утвърден метод за репродукция. Процедурата цели ефективното използване на високопродуктивни разплодни мъжки индивиди и служи като основно средство за ограничаване на безплодието и яловостта при женските животни. Изкуственото осеменяване допринася също така за профилактиката и подобряването на здравния статус на стадата, като значително намалява риска от разпространение на инфекциозни заболявания, предавани при естествено чифтосване. Освен това, този метод повишава продуктивността и подобрява породните и продукционни характеристики на животните.

Изкуственото осеменяване е тясно свързано с технологията на криоконсервация на сперма, която има съществено значение за съхранението на генетичните ресурси на различни видове селскостопански животни (Zubets et al., 2000).

В съвременното овцевъдство една от основните приоритетни задачи е устойчивото повишаване на продуктивността, която в значителна степен зависи от биологичното качество на еякулатите, получени от разплодни кочове. Прилагането на биотехнологични подходи за усъвършенстване на условията за краткосрочно и дългосрочно съхранение на сперма от кочове, представлява значителен напредък в областта на животновъдството.

Този подход не само позволява използването на висококачествени семенни проби от разплодни кочове, преминали задълбочена селекционна и генетична оценка, но и ограничава неблагоприятните ефекти, свързани с инбридинга. В резултат се наблюдава съществено подобрене на репродуктивните показатели при овцете-майки, както и повишение на интензивността на растеж при потомството. Въвеждането на

This process is aimed at the efficient use of high-value breeding males and serves as a primary means of combating infertility and barren females.

Artificial insemination also contributes to the prevention and improvement of herds by reducing the spread of infectious diseases transmitted during natural mating.

This method increases animal productivity and enhances their breed and quality traits.

Artificial insemination is closely linked to the technology of sperm cryopreservation, which plays an important role in preserving the genetic resources of various species of farm animals (Zubets et al., 2000).

In modern sheep breeding, one of the priority tasks is the constant increase in productivity, which largely depends on the biological quality of the ejaculate from breeding rams.

The use of biotechnologies to improve both short-term and long-term storage of ram semen represents a significant step forward in animal husbandry.

This approach not only allows for the use of high-value semen samples obtained from breeding rams thoroughly evaluated by various selection and genetic parameters, but also helps to avoid issues related to inbreeding.

It leads to a significant improvement in the reproductive qualities of ewes and an increase in the growth rates of lambs.

The introduction of artificial insemination

изкуствено осеменяване в разплодната практика създава нови възможности за усъвършенстване на генетичния потенциал в овцевъдната продукция (Blackshaw, 1954).

Съвременните репродуктивни технологии предоставят възможност за съхранение и ефективно използване на генофонда на застрашени видове без ограничения във времето. Въпреки това, изкуственото осеменяване с използване на замразена сперма все още не е широко разпространена практика в овцевъдството (Ring et al., 2004). Основните причини за това са ниската криотолерантност на сперматозоидите от кочовете и анатомичните особености на репродуктивния тракт при овцете.

Добре известно е, че различните етапи от обработката на семенния материал по време на криоконсервация неизбежно водят до значителни химични и ултраструктурни промени в сперматозоидите (Quinn et al., 1969). По време на криоконсервация се наблюдава намаляване на броя на подвижните сперматозоиди. Проучвания сочат, че плазмената мембрана на сперматозоидите е основното място на увреждане при т. нар. „студов шок“ (Blackshaw, 1954; Yildiz et al., 2007), което води до загиване на около 40–50% от клетките. Освен това се уврежда и акрозомата (Saacke and White, 1972), което допълнително понижава фертилитета на криоконсервираната сперма в сравнение със свежа сперма.

В областта на биотехнологиите значително внимание се отделя на разработването и усъвършенстването на разредители, предназначени за съхранение на спермата от кочове при изключително ниски температури (–196°C). Всеки от тези разредители играе съществена роля в запазването на жизнеспособността на клетките, като осигурява основни компоненти за

for the breeding stock opens up new opportunities for enhancing the genetic potential of sheep farming (Blackshaw, 1954).

Currently, reproductive technologies offer the ability to preserve and effectively use the gene pool of endangered species without time limitations. However, artificial insemination using frozen semen has not yet become a widely adopted practice in sheep breeding (Ring et al., 2004).

This is due to the low cryotolerance of ram spermatozoa and the anatomical peculiarities of the sheep reproductive tract.

It is well known that various stages of semen processing during cryopreservation inevitably cause significant chemical and ultrastructural changes in spermatozoa (Quinn et al., 1969).

During cryopreservation, a decrease in the number of motile spermatozoa is observed. Research has shown that the plasma membrane of spermatozoa is the primary site of damage during cold shock (Blackshaw, 1954; Yildiz et al., 2007), resulting in the death of 40 to 50% of the cells.

Additionally, damage to the acrosome occurs (Saacke and White, 1972), which reduces the fertility of cryopreserved semen compared to fresh semen.

In the field of biotechnology, significant attention is devoted to the development and improvement of extenders designed for storing ram semen at extremely low temperatures (–196°C).

Each of these extenders plays a crucial role in ensuring cell preservation by providing essential components that prevent temperature shock, supply energy

предотвратяване на температурния шок, снабдяване с енергийни източници, поддържане на оптимално рН и потискане на растежа на патогенни микроорганизми (Zahan, 2017).

Научната общност активно изследва влиянието на биологично активни вещества и други съединения като добавки към семенните разредители, с цел минимизиране на негативните ефекти от криоконсервацията. Основният механизъм на действие на тези добавки е свързан със защитата на сперматозоидите от оксидативен стрес.

Сперматозоидите са особено чувствителни към оксидативен стрес поради ограничените си антиоксидантни защити. Малкият обем и минималното количество цитоплазма не позволяват наличието на пълен набор от защитни ензими, необходими за ефективна неутрализация на окислителни агенти (Efremov et al., 2017).

Проучванията показват, че добавянето на ензимни антиоксиданти, витамини (Azawi and Hussein, 2013), мастни киселини и аминокиселини (Kaya and Kaya, 2018) към семенните разредители може значително да подобри качеството на сперматозоидите.

Освен че защитават клетките от увреждане, тези вещества оказват комплексно въздействие върху мъжката репродуктивна система, като стимулират сперматогенезата и допринасят за общото укрепване на репродуктивното здраве. Това е от особено значение за повишаване на ефективността на криоконсервацията и за съхраняване на репродуктивния потенциал на разплодните мъжки животни (Rotari, 2020; Rotari et al., 2021).

Следователно, разработването и приложението на иновативни добавки представляват важна стъпка към

sources, maintain optimal pH levels, and suppress the growth of pathogenic microorganisms. (Zahan, 2017).

Researchers are actively studying the effects of biologically active substances and other compounds as additives to semen extenders, aiming to minimize the negative effects of cryopreservation.

The key mechanism of action for these additives is the protection of sperm cells from oxidative stress.

Sperm cells are highly sensitive to oxidative stress due to their limited antioxidant defense.

The small volume and minimal cytoplasmic content of these cells prevent them from containing a full set of protective enzymes needed to effectively neutralize oxidative agents (Efremov et al., 2017).

Studies show that the addition of enzymatic antioxidants, vitamins (Azawi and Hussein, 2013), fatty acids, and amino acids (Kaya and Kaya, 2018) to semen extenders can significantly improve sperm quality.

Moreover, these substances not only enhance the qualitative characteristics of sperm by protecting the cells from damage, but they also have a comprehensive effect on the male reproductive system. They stimulate spermatogenesis and contribute to the overall strengthening of reproductive health. This is especially important for increasing the efficiency of cryopreservation and preserving the reproductive potential of breeding males (Rotari, 2020; Rotari et al., 2021).

Thus, the development and application of innovative additives represent an important step in improving

подобряване на жизнеспособността на сперматозоидите при условията на криоконсервация.

Целта на изследването беше да се сравнят параметрите на криоконсервираните сперматозоиди в зависимост от използваната синтетична среда: GTJ, STJ+MP и STJ+IMB-2.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването бе проведено в периода август – октомври 2024 г. на ферма СТЕ „Максимовка“ в района на Ново-Анении. Обект на изследването бяха прясна и криоконсервирана сперма от кочове от породите Асаф и Цигай. Всички животни бяха отглеждани при еднакви условия – с еднакво хранене и ежедневно на паша.

Събирането на сперма се осъществяваше два пъти седмично, сутрин чрез използване на изкуствена вагина. За обездвижване и осигуряване на безопасността на коча-донорния по време на процедурата бе използвана специална стойка, която минимизира стреса.

Обемът на еякулата се измерваше непосредствено след събиране с помощта на стъклена градуирана пипета, което гарантираше точност на измерването. Концентрацията на сперматозоидите се определяше чрез камера на Горяев и се изразяваше в милиарди на 1 ml сперма.

Параметрите на подвижността на сперматозоидите се анализираха с помощта на компютърната система CEROS (Количество проба - 10), което повишаваше прецизността на измерванията. Пробите от сперма се поставяха в термостат, поддържаща температура +37°C.

Еякулати, които отговаряха на критериите за пригодност за по-нататъшна обработка (подвижност поне 80% и концентрация поне 2.5 милиарда/ml), бяха обединявани

sperm viability under cryopreservation conditions.

The aim of the study was to compare the parameters of cryopreserved sperm depending on the synthetic media used: GTJ, STJ+MP, and STJ+IMB-2.

MATERIAL AND METHODS

The research was conducted from August to October 2024 at the STE "Maximovca" farm in the Novo-Anenii district. The subject of the study was freshly collected and cryopreserved semen from Asaf and Tsigai breed rams. All animals were kept under identical conditions: they received the same diet and were grazed daily on pasture.

Semen collection was carried out twice a week in the morning using an artificial vagina.

A special restraint stand was used to secure the donor ram during the procedure, ensuring safety and minimizing stress.

The volume of the ejaculate was measured immediately after collection using a glass graduated test tube, which ensured measurement accuracy. Sperm concentration was determined using a Goryaev counting chamber and expressed in billions per 1 ml of semen.

Sperm motility parameters were analyzed using the CEROS computer system (Nr. samples-10), which increased the accuracy of the measurements. Semen samples were placed on a thermal stage heated to +37°C.

Ejaculates that met the suitability criteria for further processing (motility of at least 80% and concentration of at least 2.5 billion/ml) were pooled to eliminate individual differences and were treated as

(смесвани), за да се елиминират индивидуалните различия и се третираха като една проба сперма.

В анализа на пробите се изучаваха подробно параметрите на подвижността на сперматозоидите:

- **VAP** – средна скорост на движение по изгладена траектория, измервана в микрометри в секунда ($\mu\text{m/s}$).

- **VSL** – скорост на движение по права линия, свързваща началната и крайната точка на траекторията, също измервана в микрометри в секунда ($\mu\text{m/s}$).

- **VCL** – криволинейна скорост, или общото разстояние и скорост на движение по реалната пътека, измервана в микрометри в секунда ($\mu\text{m/s}$).

Цялостта на плазмената мембрана на сперматозоидите се оценяваше с теста за хипоосмотично набъбване (HOST). Морфологичните аномалии на сперматозоидите и целостта на акрозомата се оценяваха с метода на Ханкок, известен с високата си точност (Zähan, 2017).

Спермата се разреждаше чрез разделяне на пробите и използване на три различни разреждателя. Всяка проба сперма се разделяше на три равни части, които след това се разреждаха с тестовите разреждатели в съотношение 1:3.

Първата проба беше разреждана с разреждателя GTJ (глюкоза – 0,8 г; натриев цитрат – 2,8 г; пилешки яйчен жълтък – 20% об./об.; глицерол – 7% об./об.; Spermosan-3 – 50 000 IU; дестилирана вода до 100 ml). Втората проба беше разреждана с разреждателя STJ + MP, а третата – с разреждателя STJ, допълнен с препарата IMB-2.

Замразяването се извърши в 0,1 ml паети в течен азот, след което пробите бяха съхранявани в течен азот при температура -196°C .

Размразяването на криоконсервираната сперма се

a single semen sample.

In the analyzed samples, we thoroughly studied sperm motility parameters (VAP, VSL, VCL):

- **VAP** – the average path velocity of sperm movement along a smoothed trajectory, measured in micrometers per second ($\mu\text{m/s}$).

- **VSL** – the straight-line velocity of sperm movement along the line connecting the start and end points of the trajectory, also measured in micrometers per second ($\mu\text{m/s}$).

- **VCL** – the curvilinear velocity, or the total distance and speed of sperm movement along the actual path, measured in micrometers per second ($\mu\text{m/s}$).

The integrity of the sperm plasma membrane was assessed using the hypoosmotic swelling test (HOST). Morphological abnormalities of sperm and the integrity of the acrosome were evaluated using the Hancock method, which is known for its high accuracy (Zähan, 2017).

Semen was diluted using the method of dividing samples into three different extenders. Each semen sample was divided into three equal parts, which were then diluted with the test extenders in a 1:3 ratio.

The first sample was diluted with the GTJ extender (glucose – 0,8 g; sodium citrate – 2,8 g; chicken egg yolk – 20%/v; glycerol – 7%/v; Spermosan-3 – 50,000 IU; distilled water up to 100 ml). The second sample was diluted with the STJ +MP extender, and the third sample was diluted with the STJ extender supplemented with the IMB-2 preparation.

Freezing was carried out in 0,1 ml pellets in liquid nitrogen vapor, followed by storage in liquid nitrogen (-196°C).

Thawing of cryopreserved semen was performed in penicillin vials at a

осъществяваше в пеницилинови флакони при температура +40 до +42°C, като се прилагаше сух метод на размразяване. Процедурата продължаваше 30–40 секунди и не изискваше допълнително добавяне на разредители.

След размразяването сперматозоидите се инкубираха в термостат при температура +37±1°C. Динамиката на подвижността на сперматозоидите се оценяваше през интервали от един час в рамките на 5 часа.

В рамките на изследването бе обърнато специално внимание на ефекта от биологично активни вещества, добавени като допълнителни компоненти към криопротективната среда, с оглед тяхното влияние върху жизнеспособността, подвижността и морфологичните параметри на сперматозоидите след размразяване. Това е от особена важност за повишаване на успеваемостта на изкуственото осеменяване и подобряване на репродуктивните качества на разплодните мъжки животни.

По този начин резултатите от изследването могат да допринесат значително за оптимизирането на методите за криоконсервиране на сперма, както и за разработването на нови подходи за повишаване качеството на генетичния материал. Те могат да бъдат приложени в практическата работа на специалисти по животновъдство, селекционери и професионалисти в областта на изкуственото осеменяване.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Методът за криоконсервиране на сперма от кочове представлява високоефективна технология, насочена към дългосрочното съхранение на качеството на сперматозоидите. Процесът се осъществява чрез

temperature of +40 to +42°C using the dry thawing method.

The process lasted 30–40 seconds and did not require additional extenders.

After thawing, the semen was incubated in a thermostat at +37±1°C. Sperm motility dynamics were assessed at one-hour intervals over a period of 5 hours.

Within the framework of this research, special attention was given to examining the effects of biologically active substances added to the cryopreservation medium as supplementary components, focusing on their impact on the viability, motility, and morphological parameters of spermatozoa after thawing.

This is of great importance for increasing the success rate of artificial insemination and improving the reproductive performance of breeding males.

Thus, the results of our study may make a significant contribution to optimizing semen cryopreservation methods, as well as to the development of new approaches for improving the quality of genetic material.

They can be applied in the practical work of livestock specialists, breeders, and artificial insemination professionals.

RESULTS AND DISCUSSION

The method of ram semen cryopreservation is a highly effective technology aimed at preserving the quality of spermatozoa over a long period of time.

This process is carried out using

използване на защитни среди, които подпомагат поддържането на жизнеспособността, подвижността и оплождащата способност на сперматозоидите при температура от -196°C .

В този контекст настоящото изследване извърши детайлен анализ на влиянието на различни защитни среди върху подвижността на сперматозоидите, както и върху броя на сперматозоидите, демонстриращи линейно движение след процеса на замразяване и последващо размразяване. Таблица 1 показва данни за подвижността на сперматозоидите от коч след криоконсервация и размразяване, когато те са разреждени с различни разтворители (медиуми).

protective media that help maintain the viability, motility, and fertilizing ability of sperm at a temperature of -196°C .

In this context, the present study conducted a detailed analysis of the effects of various protective media on sperm motility, as well as on the number of spermatozoa exhibiting linear movement after the freezing and subsequent thawing process.

Table 1 presents data on the motility indicators of ram semen diluted with different media after cryopreservation and thawing.

Таблица 1. Динамика на подвижността на криоконсервирана и размразена сперма на кочове след процеса на замразяване и размразяване
Table 1. Dynamics of motility of frozen-thawed rams semen after freezing-thawing

Спецификация / Specification	Параметри / Parameters	Количество проби./ Nr. samples	GTJ	STJ + MP	STJ + IMB-2	
След размразяване / After reanimation	Подвижни сперматозоиди % / motile, %	10	48,6 \pm 1,5	50,3 \pm 0,8	54,0 \pm 0,4**	
	Прогресивна подвижност, %, progressive, %	10	26,4 \pm 1,2	26,2 \pm 1,2	29,8 \pm 0,6*	
	Скорост, $\mu\text{m/s}$ / velocity, $\mu\text{m/s}$	VAP	10	86,9 \pm 3,6	89,2 \pm 3,8	91,8 \pm 3,4
		VSL	10	71,1 \pm 3,4	72,9 \pm 3,8	75,5 \pm 3,9
VCL		10	138,8 \pm 3,8	133,1 \pm 2,2	132,0 \pm 3,8	

Забележка: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Note: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Анализът на получените данни разкри значими разлики в показателите за подвижност на сперматозоидите след процедурата по замразяване и размразяване. Най-високи стойности бяха отчетени при използване на средата STJ + IMB-2, която демонстрира максимални резултати

Analysis of the obtained data revealed significant differences in sperm motility indicators after the freezing-thawing procedure.

The highest results were observed with the use of the STJ + IMB-2 medium, which demonstrated the maximum values

както по отношение на общата, така и на прогресивната подвижност на сперматозоидите. По-конкретно, общата подвижност достигна $54,0 \pm 0,4\%$, което е статистически значимо ($P \leq 0,01$). Прогресивната линейна подвижност също показва положителни резултати – $29,8 \pm 0,6\%$, със статистическа значимост $P \leq 0,05$.

Тези резултати значително надвишават получените при използването на разредителите GTJ и STJ + MP, което показва по-високата ефективност на средата STJ + IMB-2 за запазване на жизнеспособността и подвижността на сперматозоидите след криоконсервиране и размразяване.

Важен показател за биологичната цялост на сперматозоидите след размразяване е способността им да запазят жизнеспособност при температура $+37 \pm 1^\circ\text{C}$.

За оценка на подвижността на сперматозоидите измерванията се извършваха непосредствено след размразяване, а след това през 1, 2, 3, 4 и 5 часа инкубация при температура $+37 \pm 1^\circ\text{C}$. Смята се, че размразената сперма е подходяща за изкуствено осеменяване, ако подвижността е поне 40%, а продължителността на жизнеспособността е най-малко 5 часа при посочената температура на съхранение. Тези данни позволяват да се оцени ефективността на криоконсервирането и да се определи потенциалът на сперматозоидите за успешно оплождане.

Резултатите за подвижността на криоконсервирана и размразена сперма, съхранявана в продължение на 5 часа при $+37 \pm 1^\circ\text{C}$, са представени в Таблица 2.

for both total and progressive motility of spermatozoa. In particular, total motility was recorded at $54.0 \pm 0.4\%$, which is statistically significant ($P \leq 0.01$).

Progressive linear motility in this medium also showed positive results, reaching $29.8 \pm 0.6\%$, with a significance level of $P \leq 0.05$.

These results significantly exceeded those obtained with the GTJ and STJ + MP media, indicating the effectiveness of the STJ + IMB-2 medium in maintaining sperm viability and motility after cryopreservation and thawing.

An important indicator of the biological integrity of sperm after thawing is its ability to maintain viability at a temperature of $+37 \pm 1^\circ\text{C}$.

To assess sperm motility, measurements were taken immediately after thawing, and then at 1, 2, 3, 4, and 5 hours of incubation at $+37 \pm 1^\circ\text{C}$.

It is considered that thawed semen is suitable for artificial insemination if sperm motility is at least 40%, and the duration of viability is at least 5 hours at the specified storage temperature.

These data allow for the evaluation of the effectiveness of cryopreservation and the identification of the sperm's potential for successful fertilization.

The results of motility for frozen-thawed ram semen, stored for 5 hours at $+37 \pm 1^\circ\text{C}$, are presented in Table 2.

Таблица 2. Динамика на подвижността на криоконсервирана и размразена сперма от кочове, съхранявана в продължение на 5 часа при температура +37±1°C

Table 2. Dynamics of motility of frozen-thawed ram semen stored for 5 hours at a temperature of +37±1°C

Време след размразяване (часове) / Thawing (hours)	Параметри / Parameters	GTJ	STJ + MP	STJ + IMB-2	
		Кл. обр./ Nr.samples			
1 час / 1 hour	Подвижни сперматозоиди, % / motile, %	43,6±0,6	44,8±0,5	47,4±0,8**	
	Прогресивна подвижност, % / progressive, %	20,7±0,5	21,2±0,4	22,6±0,7*	
	Скорост, µm/s / velocity, µm/s	VAP	89,6±2,1	83,9±2,9	89,0±2,9
		VSL	74,3±2,4	68,3±2,6	72,6±3,6
VCL		130,7±3,9	129,6±3,9	128,2±2,2	
2 часа / 2 hours	Подвижни сперматозоиди, % / motile, %	39,8±0,9	41,6±0,5	43,8±0,6**	
	Прогресивна подвижност, % / progressive, %	18,0±0,7	19,3±0,5	20,4±0,3**	
	Скорост, µm/s / velocity, µm/s	VAP	80,4±2,4	82,8±1,4	85,1±2,9
		VSL	66,2±2,6	67,9±1,9	68,9±2,9
VCL		128,7±4,5	131,8±3,7	129,8±4,0	
3 часа / 3 hours	Подвижни сперматозоиди, % / motile, %	36,0±1,2	38,0±0,6	40,4±0,8**	
	Прогресивна подвижност, % / progressive, %	16,0±0,6	16,7±0,7	18,0±0,8*	
	Скорост, µm/s / velocity, µm/s	VAP	78,0±2,5	83,3±1,5	82,7±3,1
		VSL	62,2±1,6	67,7±2,2	68,7±3,1*
VCL		125,3±2,8	127,9±3,1	129,8±5,0	
4 часа / 4 hours	Подвижни сперматозоиди, % / motile, %	31,0±1,2	32,1±1,0	35,6±1,6*	
	Прогресивна подвижност, % / progressive, %	14,0±0,8	14,9±0,7	15,9±0,6	
	Скорост, µm/s / velocity, µm/s	VAP	69,7±3,6	78,7±1,9*	86,1±3,6**
		VSL	54,8±3,6	61,9±1,6	70,9±3,6**
VCL		118,0±2,8	126,2±4,4	135,1±5,3**	
5 часа / 5 hours	Подвижни сперматозоиди, % / motile, %	20,3±0,9	22,8±0,7	28,3±2,0**	
	Прогресивна подвижност, % / progressive, %	9,4±0,5	10,6±0,5	11,5±0,6*	
	Скорост, µm/s / velocity, µm/s	VAP	72,6±4,1	73,4±3,0	70,5±3,4
		VSL	58,0±4,4	58,9±3,0	53,0±2,6
VCL		116,5±6,3	117,9±2,9	117,9±4,2	
		VCL	116,5±6,3	117,9±2,9	117,9±4,2

* P≤0,05,** P≤0,01

Анализът на данните, представени в Таблица 2, позволява цялостна оценка на влиянието на различни криопротективни среди – GTJ, STJ + MP и STJ + IMB-2 – върху жизнеспособността на спермата след замразяване и размразяване. След 5 часа съхранение най-висока подвижност на сперматозоидите е отчетена в средата STJ + IMB-2 – $28,3 \pm 2,0\%$. Тези стойности значително превишават резултатите, получени при средата GTJ ($20,3 \pm 0,9\%$) и STJ + MP ($22,8 \pm 0,7\%$), със статистическа значимост $P \leq 0,01$. Това показва по-изразените защитни свойства на средата STJ + IMB-2, която допринася за по-добро съхранение на сперматозоидите при дългосрочно съхранение.

По-висока прогресивна подвижност също е наблюдавана в средата STJ + IMB-2 ($11,5 \pm 0,6\%$) в сравнение с GTJ ($9,4 \pm 0,5\%$) и STJ + MP ($10,6 \pm 0,5\%$). Статистически значимите разлики, потвърдени при $P \leq 0,05$, свидетелстват за предимствата на средата STJ + IMB-2 при запазване на праволинейното движение на сперматозоидите, което е важен фактор за тяхната оплодителна способност.

В настоящото изследване беше оценено и въздействието на криопротективните среди GTJ, STJ + MP и STJ + IMB-2 върху кинетичните параметри на сперматозоидите. Запазването на енергийните ресурси на сперматозоидите е от решаващо значение за способността им да достигнат мястото на оплождане на яйцеклетката. Високата скорост на движение на сперматозоидите е показател за добра жизнеспособност и подвижност на клетките, което от своя страна увеличава вероятността за успешно оплождане. По време на криоконсервацията, особено при фазите на замразяване и размразяване, сперматозоидите са

The analysis of the data presented in Table 2 allows for a comprehensive assessment of the impact of various cryoprotective media – GTJ, STJ + MP, and STJ + IMB-2 – on ram sperm viability after freezing and thawing.

After 5 hours of storage, the highest sperm motility was observed in the STJ + IMB-2 medium, which was $28,3 \pm 2,0\%$. These values significantly exceeded the results obtained with the GTJ medium ($20,3 \pm 0,9\%$) and STJ + MP medium ($22,8 \pm 0,7\%$), with a statistical significance level of $P \leq 0.01$.

This indicates the more pronounced protective qualities of the STJ + IMB-2 medium, which contributes to better sperm preservation during long-term storage.

Higher progressive motility was also observed in the STJ + IMB-2 medium ($11,5 \pm 0,6\%$) compared to GTJ ($9,4 \pm 0,5\%$) and STJ + MP ($10,6 \pm 0,5\%$).

Statistically significant differences confirmed at $P \leq 0,05$ suggest the advantages of the STJ + IMB-2 medium in maintaining linear sperm movement, which is an important factor for their fertilizing ability.

In our study, we also assessed the impact of the cryoprotective media GTJ, STJ + MP, and STJ + IMB-2 on the kinetic parameters of spermatozoa.

The preservation of sperm energy resources is crucial for their ability to reach the fertilization site of the oocyte. High sperm velocity indicates good viability and motility of the cells, which in turn increases the likelihood of successful fertilization.

During cryopreservation, especially during the freezing and thawing stages, spermatozoa are subjected to stress, which can negatively affect their motility

подложени на стрес, който може да повлияе неблагоприятно върху тяхната подвижност и обща жизнеспособност. Кинетичните параметри като VAP, VSL и VCL показаха стабилни стойности през петия час на съхранение с минимални отклонения, които не оказват влияние върху жизнеспособността на сперматозоидите.

Получените резултати подчертават значението на избора на подходяща защитна среда за дългосрочното съхранение на качеството на семенния материал след криоконсервация, особено при условия на съхранение при физиологична температура от $+37 \pm 1^\circ\text{C}$. Тези данни могат да бъдат полезни за по-нататъшни изследвания и практически препоръки в областта на репродуктивната биология и животновъдството.

Един от ключовите критерии при избора на семенен материал е прецизното определяне на броя на нормалните и аномалните форми на сперматозоиди в еякулата. Този процес играе съществена роля при оценката на репродуктивната способност на мъжките животни и, съответно, за успеха на осеменяването. Нормалните сперматозоиди се характеризират с правилна морфология, която пряко влияе върху оплодителната им способност. В същото време наличието на сперматозоиди с аномална структура може значително да намали ефективността на репродуктивните процеси.

Експерименталните данни, представени в Таблица 3, показват процента на аномални сперматозоиди за всеки от използваните разреждатели, което позволява да се направят изводи относно тяхната ефективност и въздействие върху запазването на морфологичните характеристики на семенния материал.

and overall viability.

Kinetic parameters such as VAP, VSL, and VCL showed stable values at the fifth hour of storage, with minimal fluctuations that did not impact sperm viability.

The obtained results highlight the importance of choosing the appropriate protective medium for the long-term preservation of semen quality after cryopreservation, especially under storage conditions at a physiological temperature of $+37 \pm 1^\circ\text{C}$.

These data may be useful for further research and practical recommendations in the field of reproductive biology and animal breeding..

One of the key criteria when selecting semen is the careful determination of the number of both normal and abnormal sperm forms present in the ejaculate. This process plays a crucial role in assessing the reproductive ability of males and, consequently, the success of insemination.

Normal spermatozoa are characterized by proper morphology, which directly impacts their fertilizing ability. At the same time, the presence of spermatozoa with abnormal structure can significantly reduce the efficiency of reproductive processes.

The experimental data presented in Table 3 show the percentage of abnormal spermatozoa for each of the diluents, which allows for conclusions about their effectiveness and impact on preserving the morphological characteristics of semen.

Таблица 3. Морфологични аномалии на замразена и размразена сперма на кочове

Table 3. Morphological anomalies of frozen-thawed ram semen

Спецификация / Specification		Среда за размножаване / Dilution media		
		GTJ	STJ + MP	STJ +IMB-2
		Кл..обр./ Nr.samples		
След възстановяване / After reanimation	Глава / Head	5,7±0,5	5,5±0,3	5,5±0,5
	Врат / Neck	9,1±0,5	9,5±0,5	8,6±0,3
	Опашка / Tail	10,6±0,7	11,2±0,4	9,7±0,5
	Тяло / Body	9,9±0,5	9,6±0,5	9,7±0,4
	Общо, % / Total, %	17,65	17,9	16,75

Данните, представени в Таблица 3 относно морфологичните отклонения на сперматозоидите на кочове след размразяване, показват значително увеличение на процента аномалии (глава, врат, опашка, тяло) при всички среди, което се свързва с въздействието на екстремните температури и механичните увреждания, настъпващи по време на процеса на криоконсервиране. Въпреки това, трябва да се отбележи, че стойностите на всички средни показатели остават под праговите стойности, установени от действащите стандарти.

Средата STJ + IMB-2 демонстрира най-нисък процент аномалии на сперматозоидите – само 16,75%. Този резултат показва подобрените ѝ защитни свойства и способността ѝ по-ефективно да запазва морфологичната цялост на сперматозоидите при условия на криоконсервиране.

Следващият етап от изследването включва определяне процента на сперматозоиди с увредена акрозома в сперматозоиди на кочове, подложени на криоконсервиране, в зависимост от използваната среда за разреждане.

Според данните, представени в изследването (Zahan, 2017), морфологичните промени в акрозомата на сперматозоидите зависят

The data presented in Table 3 regarding the morphological deviations of ram sperm after thawing show a significant increase in the percentage of sperm anomalies (head, neck, tail, body) in all media, which is associated with the effects of extreme temperatures and mechanical damage occurring during the cryopreservation process.

Despite this, it should be noted that the values of all the average indicators remain below the threshold values established by the current standards.

The STJ + IMB-2 medium demonstrated the lowest percentage of sperm anomalies, which was only 16,75%. This result indicates its improved protective properties and ability to more effectively preserve the morphological integrity of sperm under cryopreservation conditions.

The next stage of the study involved determining the percentage of spermatozoa with damaged acrosomes in ram semen subjected to cryopreservation, depending on the diluent used.

According to the data presented in the study (Zahan, 2017), morphological changes in the acrosome of spermatozoa are significantly dependent on the

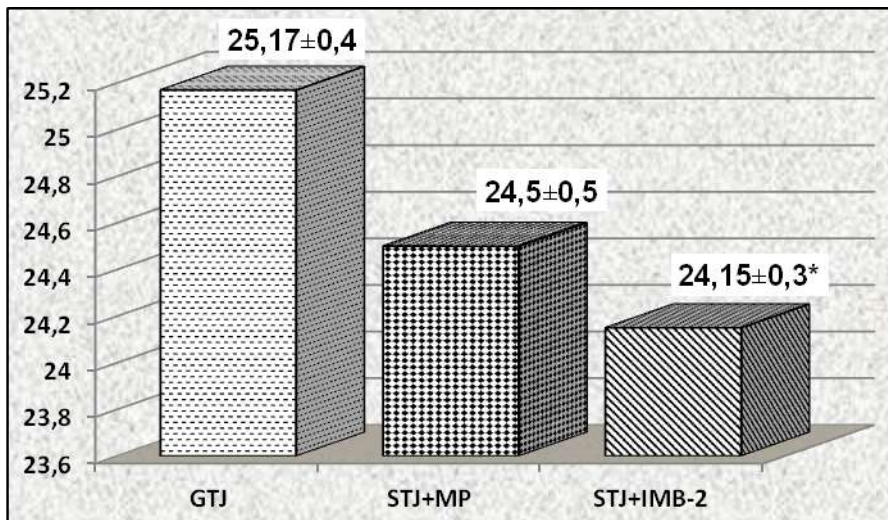
значително от състава на използваната синтетична среда при криоконсервиране. Увреждането на акрозомата, особено при екстремни температурни условия, може значително да намали плодовитостта на сперматозоидите. Това се дължи на механичните и термичните напрежения, настъпващи по време на замразяване и последващо размразяване, които негативно влияят върху целостта на акрозомата и могат да възпрепятстват нормалния процес на оплождане.

Целта на настоящото изследване беше да се определи ефективността на защитните среди GTJ, STJ + MP и STJ + IMB-2 и тяхното влияние върху процента на сперматозоиди с увредена акрозома в сперматозоиди на кочове, подложени на криоконсервиране. Експерименталните данни са представени на Фигура 1.

composition of the synthetic medium used during cryopreservation. Acrosome damage, especially under extreme temperature conditions, can significantly reduce sperm fertility.

This is because mechanical and thermal stresses occurring during freezing and subsequent thawing negatively affect the integrity of the acrosome, which, in turn, may hinder the normal fertilization process.

The aim of this study was to determine the effectiveness of protective media GTJ, STJ + MP, and STJ + IMB-2, and their impact on the percentage of spermatozoa with damaged acrosomes in ram semen subjected to cryopreservation. The experimental data are presented in Figure 1.



* $P \leq 0,05$

Фиг. 1. Сперматозоиди с увредена акрозома при сперма на коч, %
Fig. 1. Sperm with damaged acrosome in ram semen, %

Експерименталните данни, представени на Фигура 1, показват, че след размразяване в средата GTJ нивото на сперматозоиди с увредена акрозома е било $25,17 \pm 0,4\%$. Тази стойност леко превишава нивото в средата STJ + MP, където процентът на сперматозоиди с увредена акрозома е $24,5 \pm 0,5\%$. Най-нисък процент увредени акрозоми е регистриран в средата STJ + IMB-2 – $24,15 \pm 0,3\%$. Тази разлика е статистически значима ($P \leq 0,05$) и показва по-високата ефективност на средата STJ + IMB-2 в предотвратяването на акрозомални увреждания, което може да е от решаващо значение за запазване на оплодителната способност на сперматозоидите след криоконсервиране.

Нашето изследване включваше тестване на замразена и размразена сперма от кочове за устойчивост в хипоосмотична среда. След процеса на замразяване и размразяване бе наблюдавано намаляване на подвижността на сперматозоидите средно между 40-60%. Това показва различна резистентност на сперматозоидите към ултраниски температури, отразявайки тяхната криорезистентност, която зависи основно от целостта на плазмената мембрана на сперматозоидите. Проведеният тест има за цел да оцени функционалната цялост на плазмената мембрана, базирана на способността ѝ да поддържа равновесно състояние между сперматозоидната клетка и околната среда.

Експерименталните данни, представени на Фигура 2, илюстрират целостта на плазмената мембрана на сперматозоидите на кочове в зависимост от използваната криопротективна среда.

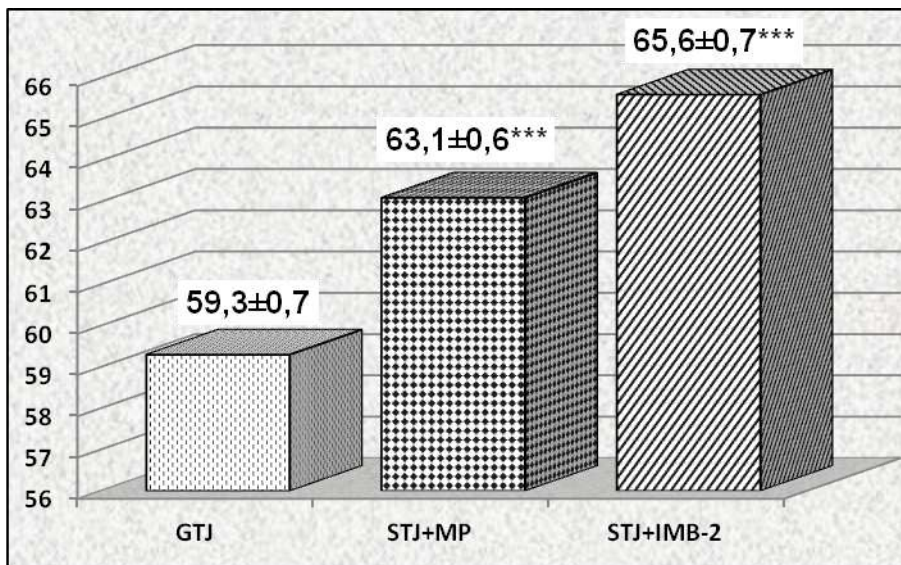
The experimental data presented in Figure 1 indicate that after thawing in the GTJ medium, the level of spermatozoa with damaged acrosomes was $25,17 \pm 0,4\%$. This value slightly exceeds the level in the STJ + MP medium, where the percentage of spermatozoa with damaged acrosomes was $24,5 \pm 0,5\%$. The lowest percentage of damaged acrosomes was recorded in the STJ + IMB-2 medium, which was $24,15 \pm 0,3\%$. This difference is statistically significant ($P \leq 0.05$) and indicates the higher effectiveness of the STJ + IMB-2 medium in preventing acrosomal damage, which could be crucial for maintaining sperm fertility after cryopreservation.

Our research involved testing the frozen-thawed semen of rams for stability in a hypoosmotic medium. After the freezing and thawing process, a decrease in sperm motility was observed, averaging 40-60%.

This indicates varying resistance of spermatozoa to ultra-low temperatures, reflecting their cryoresistance, which primarily depends on the integrity of the sperm plasma membrane.

The conducted test is aimed at evaluating the functional integrity of the plasma membrane, based on its ability to maintain an equilibrium state between the sperm cell and the surrounding environment.

The experimental data, presented in Figure 2, demonstrate the integrity of the plasma membrane of ram spermatozoa depending on the cryopreservation medium used.



*** $P \leq 0,001$

Фиг. 2. Цялост на плазмената мембрана на сперматозоидите при кочове, %
Fig. 2. Integrity of sperm plasma membrane in rams, %

Резултатите от нашето изследване показват намаляване на цялостта на плазмените мембрани на сперматозоидите след размразяване при всички изследвани среди. В средата GTJ цялостта на мембраните е $59,3 \pm 0,7\%$, което съответства на очакваните загуби, свързани с процеса на криопрезервация и последващото размразяване. Въпреки това, средата STJ+MP показва по-високи резултати, като достига $63,1 \pm 0,6\%$ ($P \leq 0,001$), което показва нейната ефективност в защитата на сперматозоидните мембрани от увреждания.

Най-високото ниво на цялост на мембраните е регистрирано при разреждателя STJ + IMB-2 – $65,6 \pm 0,7\%$ ($P \leq 0,001$). Тези резултати подчертават високата ефективност на тази среда в поддържането на функционалната цялост на плазмените мембрани на сперматозоидите, дори след въздействието на увреждащите фактори, свързани с процеса на криопрезервация. Следователно,

The results of our research demonstrate a decrease in the integrity of sperm plasma membranes after thawing in all of the studied media. In the GTJ medium, the integrity of membranes was $59,3 \pm 0,7\%$, which corresponds to the expected losses associated with the cryopreservation process and subsequent thawing. However, the STJ+MP medium showed higher results, achieving $63,1 \pm 0,6\%$ ($P \leq 0,001$), indicating its effectiveness in protecting sperm membranes from damage.

The highest level of membrane integrity was recorded in the STJ + IMB-2 extender, which was $65,6 \pm 0,7\%$ ($P \leq 0,001$). These results highlight the high efficiency of this medium in maintaining the functional integrity of sperm plasma membranes, even after exposure to damaging factors associated with the cryopreservation process.

Therefore, the use of the STJ + IMB-2

използването на средата S_TJ + IMB-2 може значително да увеличи шансовете за успешна оплождаемост и да подобри резултатите от изкуственото осеменяване.

medium may significantly increase the chances of successful fertilization and improve artificial insemination outcomes.

ИЗВОДИ

Изборът на оптимален разреждател за семенна течност е съществен фактор, който значително влияе върху запазването на функционалността на сперматозоидите. Получените резултати имат значима практическа стойност, тъй като са ключов елемент за успешната криоконсервация и ефективното изкуствено осеменяване.

Материалите на статията са подготвени в съответствие с проекта 220101 „Научна подкрепа за оползотворяването на зооветеринарни ресурси, селекция и адаптация на нови породи и хибриди, безвредни лечебни технологии и методи при климатична устойчивост“.

CONCLUSIONS

The choice of the optimal semen extender is an important aspect that significantly influences the preservation of sperm functionality.

The results obtained have significant practical value, as they are a key factor contributing to the successful cryopreservation and effective artificial insemination.

The materials of the article were prepared in accordance with project 220101 “Scientific support for the valorization of zooveterinary resources, selection and adaptation of new breeds and hybrids, harmless curative technologies and methods under climatic resilience conditions”

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Azawi, O. I. and E. K. Hussein**, 2013. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5°C. *Vet. Res. Forum* 3, 157-160.
2. **Blackshaw, A. W.**, 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Australian Journal of Biological Sciences*. 7, 573–582. DOI: 10.1071/BI9540573.
3. **Efremov, E. A., E. V. Kasatonova and Ya. I. Mel'nik**, 2017. Antioksidantnaya terapiya muzhskogo besplodiya kak vozmozhnost' uluchshit' iskhody vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologiy. *Effektivnaya Farmakoterapiya*, 22, 32–43.
4. **Kaya, Ş. Ö., S. Gür and E. Kaya**, 2018. Effect of l-arginine addition on long-term storability of ram semen. *Andrologia* 50:e12945.
5. **Quinn P. J., I. G. White and K. W. Cleland**, 1969. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J. Reprod. Fertil.*, 18, 209-220.
6. **Ring, M. E., W. A. C. McKelvey, I. W. S. Dingwall, K. P. Matthews, F. E. Gebbie, M. J. A. Mylne and J. J. Stewart Robinson**, 2004. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen-thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*, 62, 1236-1244. DOI: 10.1016/j.theriogenology.01.009.
7. **Rotari D.**, 2020. Vosproizvoditel'nye kachestva baranov moldavskogo tipa Karakul'skoy porody. *Rozvedennya i Henetyka Tvaryn*, 59, 92–96.

8. **Rotari S., N. Matveenکو, D. Savka and A. Karapyrya**, 2021. Korrektsiya vosproizvoditel'noy funktsii u khryakov s pomoshch'yu biologicheskii aktivnykh veshchestv. In: Inovații în zootehnie și siguranța produselor animaliere – realizări și perspective (pp. 486–490). Maximovca.
9. **Saacke R. G. and J. M. White**, 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. In *Proceeding 4th NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, Madison, Wisconsin. National Association of Animal Breeders, Columbia, Missouri, USA. p. 22-27.
10. **Yildiz C., P. Ottaviani, N. Law, R. Yearst, L. Liu and C. Mckerlie**, 2007. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*, 133, 3, 585-595. DOI: 10.1530/REP-06-0256.
11. **Zubets M. V., V. P. Burkat, A. A. Behma and L. O. Behma**, 2000. Sovremennyye aspekty kriokonservatsii spermy bykov. *Visnyk Poltavs'koho DSI*, 1, 40–44.
12. **Zahan M.**, 2017. Conservarea resurselor genetice în zootehnie. *Accent. Cluj-Napoca* p. 34-35, 225.