

„The impact of nanowater on sperm survival and its biological potential after cryopreservation process”

„Wpływ nanowody na przeżywalność i potencjał biologiczny nasienia po procesie kriokonserwacji”

Streszczenie

Nanowoda (NW; woda poddana działaniu zimnej, niskociśnieniowej plazmy w reaktorze próżniowym) ma specyficzne właściwości fizykochemiczne, które mogą zwiększyć żywotność nasienia po zamrożeniu, a tym samym płodność po procedurach sztucznego zapłodnienia (AI). Głównym celem przeprowadzonych badań było zastosowanie szeregu metod oceny, od badań laboratoryjnych po badanie płodności, w celu oceny przydatności nanowody jako składnika rozrzedzalnika do zamrażania nasienia tryka. Badania obejmowały trzy eksperymentalne części. Część 1, w której celem było zbadanie właściwości nasienia tryka i zdolności do zapłodnienia po zamrożeniu w rozrzedzalniku zawierającym NW oraz porównanie ich z uzyskanymi przy użyciu rozcieńczalnika z DW. Drugim, części pierwszej było określenie korelacji ilościowych między wymiarami główki nasienia a różnymi wskaźnikami jakości nasienia w zamrożonym i rozmrożonym nasieniu tryka. Część 2, miała na celu określenie wpływu genotypu tryka oraz rozrzedzalnika (tj. rozrzedzalnika zawierającego NW uzyskaną po różnych czasach deklustracji) na cechy charakterystyczne zamrożonego-rozmrożonego nasienia tryka. Część 3, w której została podjęta próba oceny wpływu NW dodanej do rozrzedzalnika nasienia zawierającego glicerol (3% i 7%) na właściwości nasienia tryka rozmrożonego i rozmrożonego. W doświadczeniach wykorzystano 16 klinicznie zdrowych tryków (4 Polska Owca Nnizina (PON), 4 rasy Olkuska, 5 linii syntetycznych BCP (Berrichon du Cher x Charolais x PON / Polish Merino) i 3 syntetyczne linie SCP (Suffolk x Charolais x PON / Polish Merino) w wieku 4-12 lat).

Wyniki części pierwszej wykazały, że średni obszar poszczególnych mikroprzedziałów oznaczonych w mikroskopie skaningowym SEM był mniejszy w DW niż w grupie NW (odpowiednio $0,33 \pm 0,29$ vs. $0,94 \pm 0,19 \mu\text{m}^2$). Po rozmrożeniu plemniki wykazywały ruch postępowy (NW $35,5 \pm 18$ vs. DW $9,4 \pm 16,4\%$; $P < 0,05$). Po rozmrożeniu średnia przeżywalność nasienia w rozrzedzalniku NW była większa niż w DW ($236,2 \pm 68,5$ vs. $263,7 \pm 58,3$ min). Ocena morfologii plemników w próbkach nasienia przygotowanych bezpośrednio po rozmrożeniu wykazała odsetek plemników z wadami główek (DW: $8,0 \pm 5,5$ vs. NW: $6,2 \pm 3,9\%$; $P < 0,001$), nieprawidłowości wstawki (DW: $20,7 \pm 16,4$ vs. NW: odpowiednio $13,5 \pm 14,4\%$; $P < 0,01$), a także wady witki (DW: $16,0 \pm 15,4$ vs. NW: $9,0 \pm 7,4\%$;

P <0,01) były większe w DW w porównaniu z NW. Częstotliwość występowania plemników z bliższymi (DW: $0,2 \pm 0,8$ vs. NW: $0,3 \pm 0,6\%$) i dystalnymi (DW: 0 ± 0 vs. NW $0,2 \pm 0,4\%$) kroplami cytoplazmatycznymi była podwyższona (P <0,05) w NW w porównaniu z grupą DW. Porównanie wpływu kriokonserwacji nasienia na stężenia enzymów (ALT, ALP oraz AspAT) w próbkach plazmy nasienia wykazało, że różnica (P <0,001) między dwoma typami rozrzedzalników po rozmrożeniu była znacząca tylko dla stężeń ALP (DW: $2304,2 \pm 1472,1$ vs. NW: $1662,9 \pm 911,7$ U / L). Badania ultrasonograficzne przeprowadzone w 40 dniu po AI wykazały wyższe (P <0,05) wskaźniki płodności u maciorek zapłodnionych NW (n = 60) w porównaniu z nasieniem DW (n = 60; 78,3 vs 58,3%, odpowiednio). Odsetek owiec, które urodziły jagnięta, wynosił odpowiednio 73,3 i 45,0% w grupach NW i DW (p < 0,01).

Wyniki uzyskane w części drugiej nie wykazały znaczącego wpływu czasu deklastracji NW (0'-90 ') na wynikający z tego ruch postępowy plemników tryka po rozmrożeniu. Średni czas przeżycia plemników był większy (P < 0,05) dla NW 15 ' w porównaniu z kontrolą DW (odpowiednio $171,8 \pm 9,6$ vs. $154,5 \pm 6,0$ min). Wady morfologiczne plemników w próbkach przygotowanych z nasienia tryka po rozmrożeniu wykazały, że odsetek plemników z wadami główek był różny (P <0,05) między grupami NW15 'i NW60' (odpowiednio $2,9 \pm 1,3$ vs. 60 ': odpowiednio $21,7 \pm 9,1\%$) i pomiędzy rozrzedzalnikami NW15 'i NW90' (odpowiednio $2,9 \pm 1,3$ vs. $21,4 \pm 7,5\%$). Znaczącą różnicę (P <0,001) w występowaniu nieprawidłowości witki odnotowano między grupami NW15 'i NW45' (odpowiednio $5,6 \pm 0,7$ vs. $2,6 \pm 0,4\%$), a także między grupami NW45 'i NW60' ($2,6 \pm 0,4$ vs. Odpowiednio $3,5 \pm 0,5\%$; P <0,05). Odsetek plemników z luźnymi główkami różnił się (P <0,05) między NW15 ' ($8,8 \pm 1,4\%$) w NW90 ' ($27,2 \pm 2,7\%$) w porównaniu z kontrolą DW ($25,0 \pm 2,0\%$) i był większy w NW60 ' ($26,0 \pm 1,5\%$) w porównaniu z NW30' ($23,9 \pm 2,1\%$; P <0,001); plemniki nekrotyczne występowały częściej w NW15 ' ($20,7 \pm 1,9\%$) w porównaniu do NW90 ' ($17,6 \pm 4,3\%$; P <0,001) i w NW15 '-45 ' (odpowiednio $20,7 \pm 1,8$, $20,0 \pm 2,7$ i $19,8 \pm 2,4\%$) niż w grupie NW90 ' ($17,6 \pm 4,3\%$; P <0,05); a odsetek komórek apoptotycznych był większy (P <0,001) w NW30 ' ($6,12,3\%$) w porównaniu z NW60' ($4,5 \pm 0,7\%$) i większy (P <0,05) w NW30 ' ($6,1 \pm 2,3\%$) niż w grupie NW15 ' ($4,7 \pm 1,1\%$). Jedynie średnie stężenia ALP w plazmie nasienia po rozmrożeniu różniły się istotnie między różnymi badanymi typami rozrzedzalników i były większe (P <0,001) dla DW i NW60'-90 ' ($3755,5 \pm 1799,1$, $3476,4 \pm 1448,5$ i $3494,0 \pm 149,3$ U / l, odpowiednio) niż dla NW15'-30 ' ($2645,3 \pm 1065,3$ i $2679,7 \pm 1190,1$ U / L).



Ruchliwość plemników w rozmrożonych próbkach nasienia była większa ($P < 0,05$) w próbkach rozrzedzonych z NW15-60' niż w próbkach kontrolnych (rozrzedzonych DW) do 150 minuty po rozmrożeniu. Od 165 do 210 minuty inkubacji (w łaźni wodnej w 37°C) ruchliwość plemników była większa ($P < 0,05$) w NW30' w porównaniu z rozrzedzalnikiem DW. Ponadto odsetek ruchliwych plemników był większy ($P < 0,05$) w NW90' w porównaniu z kontrolą DW po 90, 120 i 180 min. oraz był większy w NW45' i w grupie DW po 165 min. inkubacji. Znaczące różnice między różnymi rozrzedzalnikami zawierającymi NW odnotowano po 105, 135, 150, 165 i 180 minutach po rozmrożeniu. Odnotowano znaczące spadki ruchliwości plemników w poszczególnych grupach eksperymentalnych, które występowały w następujących odstępach czasu: DW: czasy 0-90-165 min; NW15': czasy 0-135-165-225 min; NW30': czasy 0-135-165-210-330 min; NW45': czasy 0-150-180 min; NW60': czasy 0-90-150-195 min; i NW90'": czasy 0-105-150-195 min.

Wyniki w części trzeciej wykazały, że ruchliwość plemników była większa ($P < 0,05$) w NW30'-3% w porównaniu z C3% ($38,3 \pm 9,2$ vs. $23,3 \pm 8,8\%$), a średni czas przeżycia plemników był dłuższy ($P < 0,05$) w rozrzedzalniku z dodatkiem NW30' w porównaniu z grupą kontrolną (NW30'-3% vs C3%: 215 ± 4 vs. 189 ± 6 min; i NW30'-7% vs C7% 242 ± 8 vs 217 ± 4 min.). Odsetek plemników z wadami wstawki był mniejszy ($P < 0,05$) w NW15'-3% w porównaniu z C3% ($1,3 \pm 2,5$ vs $4,0 \pm 1,4\%$). W tej części eksperymentu nie wykryto plemników z dystalnymi kroplami cytoplazmatycznymi ani z podwójnymi główkami. Nie stwierdzono istotnych różnic w proporcjach żywych, nekrotycznych oraz apoptotycznych plemników po rozmrożeniu, jednak odsetek nekrotycznych plemników 1 godzinę po rozmrożeniu był większy ($P < 0,05$) w C7% w porównaniu z NW30'-7% ($20,7 \pm 1,9$ vs $17,6 \pm 4,3\%$). Stężenie ALP w rozrzedzalniku przygotowanym z NW30' było niższe ($P < 0,05$) w porównaniu z grupami kontrolnymi (NW30'-3% vs. C3%: $3105,2 \pm 981,6$ vs. $4489,7 \pm 1930,7$ U / L; i NW30'-7% vs C7%: odpowiednio $2633,0 \pm 707,8$ vs. $3956,0 \pm 1116,4$ U / l). Ruchliwość plemników po rozmrożeniu była większa ($P < 0,05$) dla nasienia zamrożonego w NW30'-3% w porównaniu z następującymi grupami kontrolnymi (C3%) od 0 do 150 minut po rozmrożeniu, była większa ($P < 0,05$) w NW15'-C7% niż w grupie C7% od 0 do 120 minut, i była większa ($P < 0,05$) w NW30'-7% niż w C7% po 165 minutach inkubacji. Ruchliwość plemników była większa ($P < 0,05$) w rozrzedzalniku Karety C7% w porównaniu z C3% aż do 150 minuty po rozmrożeniu. W obrębie poszczególnych grup znaczny spadek ruchliwości plemników następował w następujących odstępach czasu: C3%: czasy 0-105-150 min; C7%: czasy 0-105-165-195 min;

Magdalena

NW15 '-3%: czasy 0-90-135-195 min; NW15 '-7%: czasy 0-120-180 min; NW30 '-3%: czasy 0-105-150-195 min; i NW30 '-7%: czasy 0-105-150-180-210 min.

Podsumowując, zastosowanie rozrzedzalnika nasienia przygotowanego z dodatkiem NW wiązało się ze znaczną poprawą zdolności zapłodnienia zamrożonego-rozmrożonego nasienia tryka oraz wpłynęło pozytywnie na plenność zainseminowanych macierek.

Słowa kluczowe: Krioprezerwacja, kriokonserwacja, zamrażanie, nanowoda, nasienie, owca, tryk

Streszczenie akceptuję

Marcin Murawski

„The impact of nanowater on sperm survival and its biological potential after cryopreservation process”

Abstract

Nanowater (NW; water declusterized in the low-temperature plasma reactor) has specific physicochemical properties that could increase semen viability after freezing and hence fertility after artificial insemination (AI) procedures. The main goal of this study was to use an array of evaluation methods, ranging from laboratory testing to a fertility trial, to assess the utility of nanowater as an extender diluent for ram semen freezing. In Part 1, the aim was to examine ram semen characteristics and fertilizing ability after freezing in the media containing NW (nanowater) and compare them to those obtained with the use of DW (deionized water) diluent. The second objective of this study was to determine quantitative correlations between sperm head dimensions and various indices of sperm quality in frozen-thawed ram semen. Experiments described in Part 2 examined the impact of ram genotype and extender diluent (i.e., NW obtained after different declusterization times) on the characteristics of frozen-thawed ram semen and Part 3 was undertaken to evaluate the effects of NW added to glycerol-containing semen extenders (3% and 7%) on the characteristics of frozen-thawed ram semen. The experiments utilized 16 clinically healthy rams (4 Polish Lowland (PON), 4 OIkuska breed, 5 synthetic line BCP (Berrichon du Cher x Charolais x PON/Polish Merino) and 3 synthetic line SCP (Suffolk x Charolais x PON/Polish Merino) aged 4-12 years).

The results of Part 1 revealed that the mean area of individual micro-compartments determined in cryo-SEM electronograms was less in DW than in NW group (0.33 ± 0.29 vs. $0.94 \pm 0.19 \mu\text{m}^2$, respectively). After thawing, spermatozoa in the NW-diluted extender exceeded those in the DW-containing extender in the mean survival time (236.2 ± 68.5 vs. 263.7 ± 58.3 min, respectively) and progressive motility (35.5 ± 18 vs. 29.4 ± 16.4 %, respectively; $P < 0.05$). The assessment of sperm morphology in semen samples prepared immediately after thawing revealed the proportion of sperm with head defects (DW: 8.0 ± 5.5 vs. NW: $6.2 \pm 3.9\%$; $P < 0.001$), midpiece abnormalities (DW: 20.7 ± 16.4 vs. NW: $13.5 \pm 14.4\%$, respectively; $P < 0.01$), and tail defects (DW: 16.0 ± 15.4 vs. NW: $9.0 \pm 7.4\%$; $P < 0.01$) was greater in DW compared with NW extenders. The incidence of spermatozoa with proximal (DW: 0.2 ± 0.8 vs. NW: $0.3 \pm 0.6\%$) and distal (DW: 0 ± 0 vs. NW $0.2 \pm 0.4\%$) cytoplasmic droplets was greater ($P < 0.05$) in NW compared with DW group. The comparison of the influence of semen cryoconservation on enzyme concentrations (ALT, ALP and AspAT) in extender samples showed that the difference ($P < 0.001$) between the two



types of extenders post-thawing was significant only for ALP concentrations (DW: 2304.2 ± 1472.1 vs. NW: 1662.9 ± 911.7 U/L). Ultrasonographic examinations conducted on day 40 post-AI revealed higher ($P < 0.05$) conception rates in ewes inseminated with NW ($n = 60$) compared to DW semen ($n = 60$; 78.3 vs. 58.3%, respectively). The percentages of ewes that carried lambs to term were 73.3 and 45.0% in NW and DW groups, respectively ($P < 0.01$).

There no significant effects of the NW declusterization time (0'-90') on the ensuing progressive motility of ram spermatozoa post-thawing (Part 2). The mean survival time of the spermatozoa was greater ($P < 0.05$) for NW 15' compared with DW control (171.8 ± 9.6 vs. 154.5 ± 6.0 min, respectively). The proportion of spermatozoa with head defects varied ($P < 0.05$) between NW15' and NW60' groups (2.9 ± 1.3 vs. 60': $21.7 \pm 9.1\%$, respectively) and between NW15' and NW90' extenders (2.9 ± 1.3 vs. $21.4 \pm 7.5\%$, respectively). A significant difference ($P < 0.001$) in the occurrence of tail abnormalities was recorded between NW15' and NW45' groups (5.6 ± 0.7 vs. $2.6 \pm 0.4\%$, respectively) and also between NW45' and NW60' groups (2.6 ± 0.4 vs. $3.5 \pm 0.5\%$, respectively; $P < 0.05$). The percentage of spermatozoa with detached heads differed ($P < 0.05$) between NW15' ($8.8 \pm 1.4\%$) and NW60' extender ($4.9 \pm 1.0\%$). Finally, the incidence of proximal cytoplasmic droplet in group NW30' ($0.2 \pm 0.09\%$) was greater compared with those in groups NW60' and NW90' in which no proximal droplets were detected. Flow cytometry of thawed ram ejaculates revealed that the percentage of live cells was greater in NW90' ($27.2 \pm 2.7\%$) compared with DW control ($25.0 \pm 2.0\%$) and it was greater in NW60' ($26.0 \pm 1.5\%$) compared with NW30' group ($23.9 \pm 2.1\%$; $P < 0.001$); necrotic spermatozoa were more abundant in NW15' ($20.7 \pm 1.9\%$) than NW90' ($17.6 \pm 4.3\%$; $P < 0.001$) and in NW15'-45' (20.7 ± 1.8 , 20.0 ± 2.7 and $19.8 \pm 2.4\%$, respectively) than in NW90' group ($17.6 \pm 4.3\%$; $P < 0.05$); and the proportion of apoptotic cells was greater ($P < 0.001$) in NW30' ($6.12.3\%$) compared with NW60' ($4.5 \pm 0.7\%$) and greater ($P < 0.05$) in NW30' ($6.1 \pm 2.3\%$) than in NW15' group ($4.7 \pm 1.1\%$). Only mean ALP concentrations in semen extender post-thaw differed significantly among different extender types studied and were greater ($P < 0.001$) for DW and NW60'-90' (3755.5 ± 1789.1 , 3476.4 ± 1448.5 and 3494.0 ± 1409.3 U/L, respectively) than for NW15'-30' (2645.3 ± 1065.3 and 2679.7 ± 1190.1 U/L). Progressive motility of spermatozoa in thawed semen samples was greater ($P < 0.05$) for semen extenders obtained with NW15-60' than for control (DW-diluted) extenders up to 150 min post-thawing. Subsequently (165-210 min of incubation in a water bath at 37°C), sperm motility was greater ($P < 0.05$) in NW30' compared with DW extender. In addition, the percentage of motile sperm was greater ($P < 0.05$) in NW90' compared with



the DW control at 90, 120 and 180 min, and it was greater in NW45' and in DW group after 165 min of incubation. Significant differences among different NW-containing extenders were noted at 105, 135, 150, 165 and 180 min post-thawing. Within individual experimental groups of extenders, significant declines in sperm progressive motility occurred at the following intervals: DW: Times 0-90-165 min; NW15': Times 0-135-165-225 min; NW30': Times 0-135-165-210-330 min; NW45': Times 0-150-180 min; NW60': Times 0-90-150-195 min; and NW90': Times 0-105-150-195 min.

In Part 3, the sperm progressive motility was greater ($P < 0.05$) in NW30'-3% compared with C3% (38.3 ± 9.2 vs. $23.3 \pm 8.8\%$) and the mean survival time of spermatozoa was greater ($P < 0.05$) in extenders dissolved in NW30' compared with controls (NW30'-3% vs. C3%: 215 ± 4 vs. 189 ± 6 min; and NW30'-7% vs. C7%: 242 ± 8 vs. 217 ± 4 min, respectively). The proportion of spermatozoa with midpiece defects was reduced ($P < 0.05$) in NW15'-3% compared with C3% (1.3 ± 2.5 vs. $4.0 \pm 1.4\%$). No sperm with distal droplets or double heads were detected in this experiment. No significant differences in the proportions of live, necrotic or apoptotic spermatozoa were observed immediately after thawing but the proportion of necrotic spermatozoa 1 h after thawing was greater ($P < 0.05$) in C7% compared with NW30'-7% (20.7 ± 1.9 vs. $17.6 \pm 4.3\%$). Lastly, ALP concentrations in extenders prepared with NW30' were lower ($P < 0.05$) compared with the control groups (NW30'-3% vs. C3%: 3105.2 ± 981.6 vs. 4489.7 ± 1930.7 U/L; and NW30'-7% vs. C7%: 2683.0 ± 707.8 vs. 3956.0 ± 1116.4 U/L, respectively). Sperm progressive motility in thawed semen samples was greater ($P < 0.05$) for semen cryopreserved in NW30'-3% compared with its respective controls (C3%) from 0 to 150 min after thawing, it was greater ($P < 0.05$) in NW15'-C7% than in C7% group from 0 to 120 min, and in was greater ($P < 0.05$) in NW30'-7% than in C7% after 165 min of incubation. Progressive motility was greater ($P < 0.05$) in Kareta extenders C7% compared with C3% (glycerol content) up until 150 min post-thawing. Within individual groups, significant declines in sperm progressive motility occurred at the following intervals: C3%: Times 0-105-150 min; C7%: Times 0-105-165-195 min; NW15'-3%: Times 0-90-135-195 min; NW15'-7%: Times 0-120-180 min; NW30'-3%: Times 0-105-150-195 min; and NW30'-7%: Times 0-105-150-180-210 min. In summary, the use of semen extenders prepared with NW was associated with a substantial improvement in semen quality parameters and fertilizing ability as well as lamb productivity of the ewes inseminated with frozen-thawed ram semen.

Keywords: Cryopreservation, freezing, nanowater, semen, sheep, ram

Stresserovic obceptiga
Muallim.