

УДК 636.082: 57.086.13

А.О. Богданюк^{1,2*}, В.В. Гарькавий^{2,3}, М.П. Петрушко¹

Сезонна варіабельність кріорезистентності сперматозоїдів та репродуктивних характеристик цапів зааненської породи

UDC 636.082: 57.086.13

A.O. Bogdaniuk^{1,2*}, V.V. Garkavii^{2,3}, M.P. Petrushko¹

Seasonal Variability in Cryoresistance of Saanen Goats Spermatozoa and Reproductive Characteristics

Реферат: Одним із важливих етапів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) є кріоконсервування гамет. Для одержання високих результатів ДРТ важливо кріоконсервувати сперматозоїди в сприятливий сезон, коли вони мають високу запліднювальну здатність. Оцінювали сезонну варіабельність кріорезистентності сперматозоїдів та репродуктивних характеристик цапів зааненської породи. Після видалення сім'яної рідини сперматозоїди п'яти статевозрілих тварин кріоконсервували у розчині 10%-го гліцерину та 20%-го яєчного жовтка. Запліднювальну здатність сперматозоїдів визначали за частотою запліднення ооцитів та розвитку ембріонів на 7-му добу культивування в умовах *in vitro*. Встановлено, що репродуктивні характеристики цапів зааненської породи у парувальний сезон мають підвищену концентрацію сперматозоїдів та збільшену рухливість. Частота виживання сперматозоїдів цапів після кріоконсервування є сезоннозалежною — у парувальний сезон кількість життєздатних сперматозоїдів була значущо більшою порівняно з непарувальним. Частота запліднення ооцитів після використання нативних та кріоконсервованих сперматозоїдів різних статевих сезонів була значущо вищою в групі парувального сезону. Кількість ембріонів, які розвинулися до стадії бластоцисти, була найменшою після запліднення ооцитів кріоконсервованими сперматозоїдами, отриманими у непарувальний сезон. Встановлено, що кріотолерантність сперматозоїдів та репродуктивні характеристики цапів вищі у парувальний сезон порівняно з непарувальним. Отримані результати дозволять розробити стратегію відтворення сільськогосподарських тварин задля продовольчої безпеки України.

Ключові слова: кріоконсервування, сперматозоїди, цапи, парувальний сезон, здатність до запліднення.

Abstract: Cryopreservation of gametes is one of the important stages of assisted reproductive technologies (ART). To obtain high results using ART, it is essential to cryopreserve sperm in a favorable season, when gametes have a high ability to fertilize oocytes. The aim of this research was to study seasonal variability of spermatozoa cryoresistance and reproductive characteristics of Saanen goats. After removing the seminal fluid, the gametes of five mature animals were cryopreserved in a solution of 10% glycerol and 20% egg yolk. The ability of spermatozoa to fertilize was examined by the embryo development rate on day 7 of *in vitro* culture. Reproductive characteristics of Saanen goats during the breeding season were found to be featured by increased sperm concentration and motility. The survival rate of goat spermatozoa after cryopreservation is seasonally dependent, *i. e.* in the breeding season the number of viable spermatozoa was notably higher than in non-breeding one. The frequency of oocyte fertilization after the use of fresh and cryopreserved spermatozoa derived in different seasons was significantly higher in the breeding season group. The number of embryos which developed to the blastocyst stage was the lowest after fertilization of oocytes with cryopreserved spermatozoa obtained in the non-breeding season. It is concluded that sperm cryotolerance and reproductive characteristics of goats are higher in a breeding season compared to non-breeding one. The findings will allow to develop a strategy in the reproduction of farm animals for the food security of Ukraine.

Key words: cryopreservation, spermatozoa, male goats, seasonality, fertilizing ability.

Допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) застосовуються не тільки у медичній практиці, а й в тваринництві для швидкого збільшення поголів'я на фермах [10]. Контроль за ефективністю штучного осіменіння або запліднення *in vitro*, морфокінетичним розвитком ембріонів та використання методів передімплантаційної генетичної діагностики ембріонів дозволяють покращити генетичні характеристики порід тварин, що робить їх розмноження більш економічно вигідним та

Assisted reproductive technologies (ART) are used not only in medical practice, but also in animal husbandry to rapidly enhance the livestock at farms [8]. Control over the effectiveness of artificial insemination or *in vitro* fertilization, morphokinetic development of embryos and use of pre-implantation genetic testing of embryos can improve the genetic characteristics of animal breeds, that makes their reproduction more cost-effective and accelerates the livestock growth [22, 28]. Cryopreservation is

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

²ТОВ «Інститут Сучасних Ветеринарних Технологій», Черевки, Київська обл., Україна

³ФГ «Тетяна 2011», Черевки, Київська обл., Україна

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²LLC Institute of Contemporary Veterinary Technologies, Cherevki, Kyiv region, Ukraine

³AE Tetyana 2011, Cherevki, Kyiv region, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: baa1995ua@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: baa1995ua@gmail.com

Надійшла 27.06.2021

Прийнята до друку 14.12.2021

Received 27, June, 2021

Accepted 14, December, 2021

© 2022 A.O. Bogdaniuk, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

прискорює ріст поголів'я [22, 28]. Одним із важливих етапів реалізації ДРТ є кріоконсервування [1, 6, 33]. Застосування репродуктивних клітин, які зберігалися за низьких температур, дозволяє зменшити на фермах кількість самців та використовувати аліквоти сперматозоїдів з одного еякуляту для запліднення декількох самиць. У природі для більшості тварин характерним є сезонний період розмноження. Наприклад, кози, місцем існування яких є помірні широти, спарюються восени, а очоковуються навесні [8], що пов'язано з фотоперіодом, зміна якого впливає на гормональну регуляцію репродуктивної системи [8, 23]. Одержати високі результати запліднення можливо за умови кріоконсервування сперми з найкращими показниками [7], а для цього необхідно виявити оптимальний сезон, в який для сперматозоїдів характерні найкращі рухливість, кріорезистентність та здатність до запліднення. Надалі таку сперму можна використовувати у будь-який сезон для штучного осіменіння або запліднення *in vitro* кіз у стимульованому еструсі і таким чином розподіляти протягом року період розмноження та окоту тварин.

Мета дослідження — оцінка сезонної варіабельності кріорезистентності та репродуктивних характеристик сперматозоїдів цапів зааненської породи.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували еякуляти п'яти статевозрілих (18–36-місячних) цапів зааненської породи (*Capra hircus hircus*). Еякуляти отримували на фермерському господарстві «Тетяна 2011» (с. Черевки, Україна) з використанням штучної вагіни та у присутності кози в період еструсу.

Усі маніпуляції з тваринами та їх біологічним матеріалом дозволені комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (протокол №1 від 28.01.2021) та узгоджені з основними положеннями Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1986).

Зразки еякулятів ($n = 130$) отримували раз на два тижні протягом парувального (вересень–грудень, $n = 45$) та непарувального (січень–серпень, $n = 85$) сезонів. Концентрацію та рухливість сперматозоїдів визначали в камері «Makler» (Sefi medical instrument, Ізраїль) під світловим мікроскопом «AmScope B120C» (AmScope, США). Життєздатність клітин оцінювали за кількістю живих

one of the important stages of ART implementation [4, 12, 33]. The use of reproductive cells stored at low temperatures can reduce the number of males on farms and will allow to apply the aliquots of sperm from one ejaculate to fertilize several females. In nature, most animals have a characteristic seasonal mating season. For example, goats, whose habitat is temperate latitudes, mate in fall and goat kids appear in spring [6], due to the photoperiod, the change of which affects the reproductive system hormonal regulation [6, 23]. High results of fertilization can be obtained if the sperm with the best indices is cryopreserved [5]. Therefore it is necessary to identify the optimal season when the spermatozoa are featured with the best motility, cryoresistance and ability to fertilize. In future, such sperm can be used in any season for artificial insemination or *in vitro* fertilization of goats in stimulated estrus and thereby to distribute during the year the period of reproduction and breeding of animals.

The study was aimed to assess the seasonal variability in cryoresistance and reproductive characteristics of spermatozoa of Saanen goats.

Materials and methods

In this research we examined the ejaculates of five adult (18–36-month-old) Saanen goats (*Capra hircus hircus*). Ejaculates were obtained at the Tetyana 2011 farm (Cherevky village, Ukraine) using an artificial vagina and in the presence of a female goat during estrus.

All manipulations with animals and their biological material are approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Minutes N1 dated of January 28, 2021) and agreed with the main provisions of the Law of Ukraine 'On Protection of Animals Against Cruelty' (N3447-IV of 21.02.2006) and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Ejaculate samples ($n = 130$) were obtained every two weeks during mating (September–December, $n = 45$) and non-mating (January–August, $n = 85$) seasons. Spermatozoa concentration and motility were determined in a Makler chamber (Sefi medical instrument, Israel) with an AmScope B120C light microscope (AmScope, USA). Cell viability was assessed by the number of living cells in eosin-nigrosine-stained smears of VitalScreen (FertiPro, Belgium) with a light microscope ($\times 400$).

The semen was removed by centrifugation in a density gradient (Sill-select stock, FertiPro). The

клітин у мазках, забарвлених еозин-нігрозинном VitalScreen (FertiPro, Бельгія) під світловим мікроскопом ($\times 400$).

Сім'яну рідину видаляли шляхом центрифугування в градієнті щільності (Sill-select stock, FertiPro). До преципітату додавали 10%-й розчин гліцерину (BASF, Німеччина) та 20% яєчного жовтка на середовищі WASH з буфером HEPES (IVF Bioscience, Велика Британія). Кінцева концентрація сперматозоїдів у розчині для заморожування складала 200 млн/мл. Вибір протоколу низькотемпературного охолодження було обґрунтовано результатами наших попередніх досліджень [5]. Суспензію сперматозоїдів із кріопротектором переносили у кріосоломинки об'ємом 0,25 мл (Minitube, Німеччина), еквілібрували 30 хв при кімнатній температурі (20°C); 2,5 години при 5°C; 15 хв у парах азоту на відстані 4 см від дзеркала рідкого азоту та занурювали у рідкий азот. Відігрівали зразки на водяній бані (37°C) протягом 30 с. Кріопротектор видаляли шляхом центрифугування, далі визначали рухливість та життєздатність клітин.

Сперматозоїди розподілили на експериментальні групи: 1A — свіжовиділені у парувальний сезон; 1B — свіжовиділені у непарувальний сезон; 2A — кріоконсервовані у парувальний сезон; 2B — кріоконсервовані у непарувальний сезон.

Здатність сперматозоїдів до запліднення оцінювали за темпами розвитку ембріонів протягом 7 діб їх культивування *in vitro*. Для цього отримували незрілі ооцит-кумулосні комплекси у парувальний (вересень–листопад, $n = 136$) та непарувальний (квітень–липень, $n = 73$) сезони. Аспірацію ооцитів з фолікулів яєчників здійснювали після забою 13 та 10 кіз [11] в парувальний та непарувальний сезони відповідно. Незрілі ооцит-кумулосні комплекси поміщали у середовище для дозрівання BO-IVM (IVF Bioscience) на 22–24 години при температурі 38,8°C, 6% CO₂ та 21% O₂. Для запліднення використовували сперматозоїди дослідних груп, які обробляли середовищем для запліднення за протоколом виробника. Зрілі ооцит-кумулосні комплекси переносили у середовище для запліднення та додавали сперматозоїди у кінцевій концентрації 2 млн/мл. Запліднені яйцеклітини переносили у свіже середовище та культивували при температурі 38,8°C, 6% CO₂ та 6% O₂ протягом 7 діб. Для визначення частоти розвитку ембріонів на 7-му добу розвитку підраховували співвідношення кількості бластоцист або морул до кількості запліднених яйцеклітин.

Для статистичної обробки даних використовували програму «Statistica 8» (StatSoft, США).

precipitate was added with 10% glycerol solution (BASF, Germany) and 20% egg yolk on WASH medium with HEPES buffer (IVF Bioscience, UK). The final concentration of sperm in freezing solution was 200 million / ml. The choice of low-temperature cooling protocol was justified by the results of our previous studies [3]. The spermatozoa suspension with cryoprotectant was transferred to 0.25 ml cryostraws (Minitube, Germany), equilibrated for 30 min at room temperature (20°C); 150 min at 5°C; 15 min in nitrogen vapors at a distance of 4 cm from the liquid nitrogen mirror and immersed into liquid nitrogen. The samples were heated in a water bath (37°C) for 30 s. The cryoprotectant was removed by centrifugation, and cell motility and viability were further examined.

Spermatozoa were divided into experimental groups: 1A – freshly released during mating season; 1B – freshly isolated during non-mating season; 2A – cryopreserved during mating season; 2B – cryopreserved during non-mating season.

The ability of spermatozoa to fertilize was assessed by the development rate of embryos during 7 days of their cultivation *in vitro*. For this purpose, immature oocyte-cumulus complexes were obtained during mating (September–November, $n = 136$) and non-mating (April–July, $n = 73$) seasons. Oocytes from ovarian follicles were aspirated after slaughtering 13 and 10 female goats [9] in mating and non-mating seasons, respectively. Immature oocyte-cumulus complexes were placed in BO-IVM (IVF Bioscience) maturation medium for 22–24 hours at 38.8°C, 6% CO₂, and 21% O₂. For fertilization, the spermatozoa from experimental groups were used, which were treated with a medium for fertilization according to the manufacturer's protocol. Mature oocyte-cumulus complexes were transferred to a medium for fertilization and spermatozoa were added at a final concentration of 2 million / ml. The fertilized oocytes were transferred to fresh medium and cultured at 38.8°C, 6% CO₂ and 6% O₂ for 7 days. To determine the embryo development rate on day 7 of *in vitro* culture, the ratio of the number of blastocysts or morulae to the one of fertilized oocytes was counted.

For statistical data processing we used Statistica 8 software (StatSoft, USA). Significance of differences of the indices was determined by the Mann-Whitney U test at $p \leq 0.05$. Data were presented as mean \pm standard deviation.

Results and discussion

The concentration of group 1A spermatozoa was almost twice as high as in group 1B (Fig. 1). However, seasonality did not affect the ejaculate volume, as in the non-mating season it decreased by less than 10%



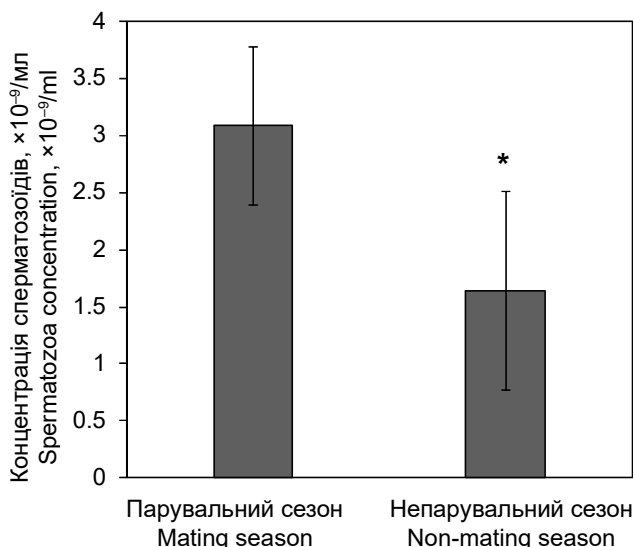


Рис. 1. Концентрація сперматозоїдів у еякулятах цапів зааненської породи у парувальний та непарувальний сезони. * – різниця значуща порівняно з відповідним показником парувального сезону ($p \leq 0,05$).

Fig. 1. Concentration of spermatozoa in the ejaculates of Saanen goats in mating and non-mating seasons. * – difference is significant compared to the corresponding index in mating season ($p \leq 0.05$).

Значущість відмінностей показників визначали за U-критерієм Манна-Вітні при $p \leq 0,05$. Дані наводили як середнє значення \pm стандартне відхилення.

Результати та обговорення

Концентрація сперматозоїдів групи 1A була майже у два рази вищою за групу 1B (рис. 1). Проте сезонність не впливала на об'єм еякуляту, оскільки у непарувальний сезон він знизився менш ніж на 10% порівняно з парувальним (рис. 2), що підтверджується іншими літературними даними [18, 27]. Об'єм еякуляту у досліджувані сезони не відрізнявся, що можна пояснити залежністю показника від віку, маси та харчування цапів [18].

Кількість рухливих та життєздатних сперматозоїдів групи 1A була вищою за таку у групі 1B (рис. 3). Зниження функціональних показників у непарувальний сезон може бути обумовлене змінами концентрації гормонів [4, 9, 12], різницею у вуглеводному [12, 15], білковому [12, 15, 21], ліпідному [12, 17, 26] складах сім'яної рідини та плазматичних мембран сперматозоїдів [2, 12, 29]. За змінами біохімічного складу сім'яної рідини у парувальний та непарувальний сезони можливо визначити причини сезонної варіабельності досліджуваних показників.

Після кріоконсервування рухливість та життєздатність сперматозоїдів значуще зменшувалися

compared to mating one (Fig. 2), that is confirmed by other reported data [17, 27]. The volume of ejaculate did not differ in the studied seasons, that could be explained by the dependence of the index on age, weight and nutrition of goats [17].

The number of motile and viable spermatozoa of group 1A was higher than that of group 1B (Fig. 3). The decrease in functional parameters in the non-mating season may be due to changes in the concentration of hormones [2, 7, 10], difference in carbohydrate [10, 14], protein [10, 14, 21], lipid [10, 16, 26] compositions of seminal fluid and plasma membranes of spermatozoa [10, 16, 29]. According to the changes in biochemical composition of semen in mating and non-mating seasons, it is possible to determine the reasons for the seasonal variability of the studied indices.

After cryopreservation, spermatozoa motility and viability decreased significantly in both group 2A (1.3 times compared to group 1A) and group 2B (1.6 times compared to group 1B) (Fig. 3). However, in group 2A the number of motile sperm was 1.5 times higher than in group 2B. Importantly, there was no significant difference between the motility and viability of spermatozoa of groups 2A and 1B. This fact can be assumed when choosing an artificial insemination strategy in non-mating season [11]. In group 2A, the spermatozoa motility decreased by 20% compared to the initial value before cryopreservation (group 1A), and in the non-mating season it was reduced by 30%.

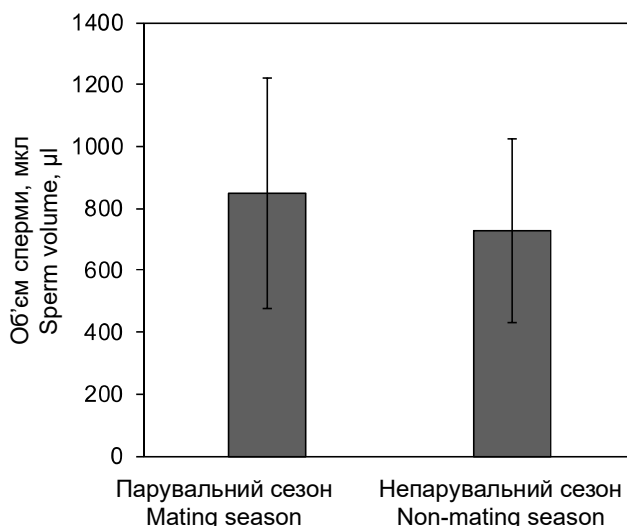


Рис. 2. Об'єм еякуляту цапів зааненської породи у парувальний та непарувальний сезони. Різниця показників об'єму еякуляту у парувальний і непарувальний сезони незначуща ($p \geq 0,05$).

Fig. 2. Volume of ejaculate of Saanen goats during mating and non-mating seasons. Difference in ejaculate volume during mating and non-mating seasons is insignificant ($p \geq 0.05$).

як у групі 2А (у 1,3 раза порівняно з групою 1А), так й у групі 2В (у 1,6 раза порівняно з групою 1В) (рис. 3). Проте у групі 2А кількість рухливих сперматозоїдів була у 1,5 раза більшою порівняно з показником групи 2В. Важливо, що значуща різниця між показниками рухливості та життєздатності сперматозоїдів груп 2А та 1В була відсутня. Цей факт можна враховувати під час вибору стратегії штучного осіменіння у непарувальний сезон [13].

У групі 2А рухливість сперматозоїдів зменшувалася на 20% порівняно з початковим значенням перед кріоконсервуванням (група 1А), а у непарувальний сезон — на 30%. Життєздатними у групі 2А порівняно з групою 1А залишалося 88% сперматозоїдів, а у непарувальний сезон — 85%. Це може вказувати на вищу кріорезистентність клітин у парувальний сезон. Різниця у стійкості до кріопшкоджень у парувальний та непарувальний сезони може виникати через сезонну варіабельність ліпідного складу мембран сперматозоїдів [2, 25, 29], рівня синтезу білків аквапоринів (наприклад, AQP3 та AQP7, що відповідають за проникність кріопротекторів до клітин та захист від осмотичного шоку під час кріоконсервування) [32], білків-ферментів, що захищають від оксидативного стресу у процесі кріоконсервування (супероксиддисмутаза, фосфоліпід гідропероксид глутатіон пероксидаза) [16], білків теплового шоку (наприклад, HSP90, який знаходиться в джгутику сперматозоїда, відповідає за метаболізм АТФ та пов'язаний з кріотолерантністю сперматозоїдів биків [30, 34]). Для виявлення причин зміни стійкості сперматозоїдів цапа до пошкоджень, що виникають під час кріоконсервування, залежно від сезону необхідні подальші молекулярно-генетичні дослідження: визначення різниці в експресії генів білків аквапоринів, білків теплового шоку та білків-ферментів, що захищають від оксидативного стресу у парувальний та непарувальний сезони до і після кріоконсервування.

Зрілі ооцит-корона-кумуляні комплекси запліднювали попередньо підготовленими сперматозоїдами шляхом додавання їх суспензії до яйцеклітин (рис. 4). У статевий сезон 32 ооцити були запліднені сперматозоїдами групи 1А, 21 — 2А, 75 — 2В. У нестатевий сезон 15 ооцитів були запліднені сперматозоїдами групи 1В, 29 — 2А та 28 — 2В.

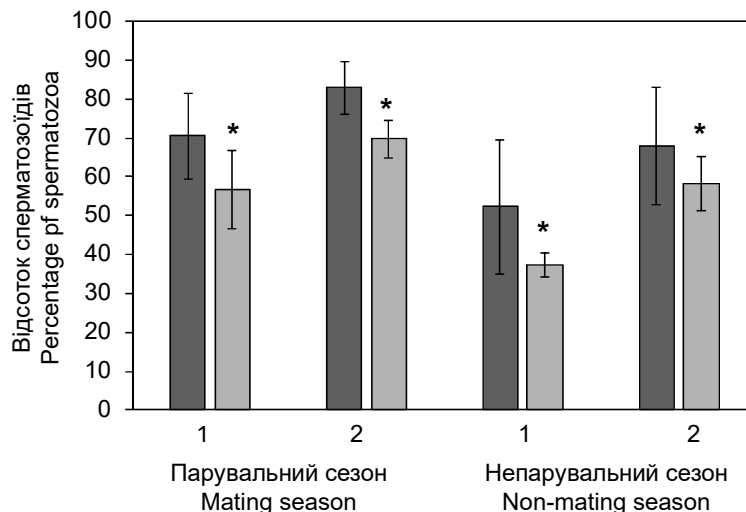


Рис. 3. Відсоток рухливих та життєздатних сперматозоїдів різних досліджуваних груп цапів зааненської породи перед (■) та після (▒) кріоконсервування у парувальний та непарувальний сезони; 1 – рухливість, 2 – життєздатність; * – різниця значуща порівняно з відповідними показниками перед кріоконсервуванням ($p \leq 0,05$).

Fig. 3. Percentage of motile and viable spermatozoa of different studied groups of Saanen goats before (■) and after (▒) cryopreservation in mating and non-mating seasons; 1 – motility, 2 – viability; * – difference is significant compared to the corresponding indices prior to cryopreservation ($p \leq 0.05$).

In group 2A 88% of sperm remained viable compared to group 1A, and 85% for group 2B compared to group 1B. This may indicate higher cryoresistance of cells during mating season. Differences in resistance to cryoinjury may be explained by seasonal variability in the lipid composition of sperm membranes [18, 25, 29], the level of aquaporin protein synthesis (e.g. AQP3 and AQP7 responsible for permeability of cryoprotectants to cells and protection against osmotic shock during cryopreservation) [32], proteins-enzymes, protecting against oxidative stress during cryopreservation (superoxide dismutase, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) [16], heat shock proteins (for example, HSP90, which is located in the spermatozoon flagellum, responsible for ATP metabolism and is associated with cryotolerance of bull spermatozoa [30, 34]). To reveal the reasons of changes in the resistance of goat spermatozoa to a cryopreservation-caused damage depending on the season, further molecular genetic studies are needed, namely they are examining the differences of the gene expression of aquaporin proteins, heat shock proteins and enzyme proteins, protecting against oxidative stress in non-mating seasons before and after cryopreservation.

Mature oocyte-corona-cumulus complexes were fertilized with pre-treated spermatozoa by adding their suspension to oocytes (Fig. 4). During the ma-



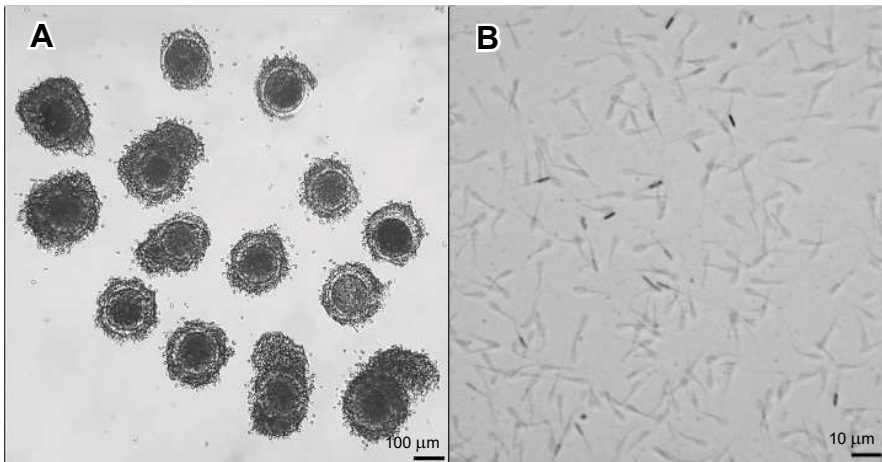


Рис. 4. Гамети кози перед заплідненням: **A** — зрілі ооцит-кумулюсні комплекси; **B** — сперматозоїди.

Fig. 4. Gametes of goats before fertilization: **A** – mature oocyte-cumulus complexes; **B** – sperm.

Через 16–18 годин спостерігали результат запліднення ооцитів *in vitro*, яке визначали за наявністю у перивітеліновому просторі двох полярних тілець (рис. 5). Частота запліднення ооцитів досліджуваних груп була наступною: у парувальний сезон сперматозоїдами групи 1A — (94,8 ± 1,3)%, 2A — (85,7 ± 2,4)%, 2B — (75,3 ± 1,9)%, а в непарувальний сезон — сперматозоїдами групи 1B — (75,9 ± 2,3)%, 2A — (76,7 ± 2,7)%, 2B — (64,3 ± 5,8)%.

Ми отримали високі результати частоти запліднення ооцитів у парувальний сезон, оскільки запліднювали тільки зрілі ооцити. Ці результати відрізняються від даних Z. Wang та співавторів [31], ймовірно тому, що вони використовували ооцити різного ступеня зрілості, що негативно впливало на кількість отриманих зигот.

На 7-му добу культивування в умовах *in vitro* 86 запліднених ооцитів, отриманих у парувальний сезон, досягли стадії бластоцисти, з яких 27 ((82,6 ± 3,7)%) утворилося після запліднення сперматозоїдами групи 1A, 15 ((71,9 ± 9,2)%) — групи

ting season, 32 oocytes were fertilized with spermatozoa of group 1A, 21 ones with 2A, and 75 with 2B. In non-mating season, 15 oocytes were fertilized with spermatozoa of group 1B, 29 ones with 2A and 28 with 2B.

After 16–18 hours, the result of *in vitro* fertilization of oocytes was observed, which was determined by the presence of two polar bodies in the perivitelline space (Fig. 5). The fertilization rate of oocytes of the studied groups was as follows: in mating season with the group 1A

spermatozoa it made (94.8 ± 1.3)%, (85.7 ± 2.4)% for 2A, (75.3 ± 1.9)% for 2B, and in the non-mating season with the group 1B spermatozoa they were (75.9 ± 2.3)%, (76.7 ± 2.7)% for 2A and (64.3 ± 5.8)% for 2B.

We obtained high results in the frequency of oocyte fertilization during the mating season, as only mature oocytes were fertilized. These results

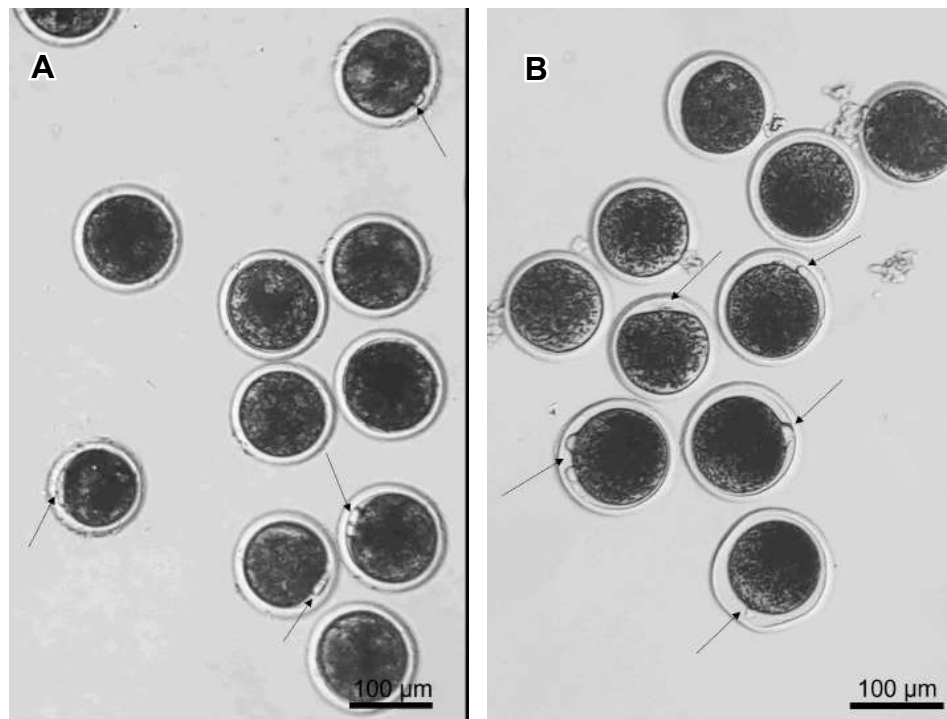


Рис. 5. Яйцеклітини кози через 16–18 годин після запліднення сперматозоїдами груп 1A (**A**) та 1B (**B**). Стілкою відмічено полярні тільця.

Fig. 5. Goat eggs 16–18 h after fertilization with spermatozoa of groups 1A (**A**) and 1B (**B**). Polar bodies are marked with an arrow.

Частота розвитку ембріонів кіз на 7-му добу культивування
Development rate of goat embryos on day 7 of cultivation

Сезон, в який отримано ооцити Season when oocytes were obtained	Кількість ембріонів на стадії бластоцисти у групах, % Number of embryos at blastocyst stage in groups, %			
	1A	1B	2A	2B
Парувальний Mating	82,6 ± 3,7	–	71,9 ± 9,2	57,9 ± 9,7*
Непарувальний Non-mating	–	69,6 ± 9,6*	68,2 ± 11,2*	53,5 ± 6,5*:#

Примітки: * — різниця значуща порівняно з частотою розвитку ембріонів у парувальний сезон після запліднення сперматозоїдами групи 1A ($p \leq 0,01$); # — різниця значуща порівняно з частотою розвитку ембріонів у непарувальний сезон після запліднення сперматозоїдами групи 1B ($p \leq 0,01$).

Notes: * – difference is significant compared to the embryo development rate during mating season after fertilization with group 1A spermatozoa ($p \leq 0.01$); # – difference is significant compared to the embryo development rate during non-mating season after fertilization with group 1B spermatozoa ($p \leq 0.01$).

2A (рис. 6) та 44 ((57,9 ± 9,7)%) — групи 2B. Після запліднення ооцитів у непарувальний сезон було отримано 42 ембріони, 10 ((69,6 ± 9,6)%) з яких — після запліднення сперматозоїдами групи 1B, 18 ((68,2 ± 11,2)%) — групи 2A та 14 ((53,5 ± 6,5)%) — групи 2B.

Аналіз ступеня розвитку отриманих ембріонів на 7-му добу культивування (таблиця) виявив, що після запліднення ооцитів, отриманих у парувальний сезон, сперматозоїдами групи 1A частота бластуляції складала більше 80%. Найменша кількість ембріонів на стадії бластоцисти або морули (менше 60%) спостерігалася після запліднення ооцитів, отриманих у непарувальний сезон, сперматозоїдами групи 2B.

У роботі не було виявлено значущої різниці між частотою розвитку ембріонів у парувальний сезон після запліднення ооцитів сперматозоїдами груп 1A та 2A, проте цей показник значуще зменшувався після використання сперматозоїдів групи 2B. Аналіз розвитку ембріонів після запліднення ооцитів, отриманих у непарувальний сезон, показав схожі результати, що, можливо, пов'язано з порушенням експресії генів білків, які відповідають за здатність до запліднення (наприклад, M6P/IGF2R та LOC101123268, які задіяні у розпізнаванні яйцеклітини сперматозоїдом [20]) та цілісності ДНК [2, 18].

P.V. Pereira та співавт. [19] показали, що морфокінетичні характеристики ембріонів нижчі в анеструсі (навесні) — 51% порівняно з періодом розмноження (восени) — 72% або перехідним періодом (влітку) — 71%, тоді як результати, отримані взимку — 66%, мають проміжне значення. Автори висловлюють різну думку щодо впливу сезону на ембріологічні характеристики видів

differ from the data of Z. Wang *et al.* [31] probably because they used oocytes of different degrees of maturity, which negatively affected the number of zygotes obtained.

On day 7 of *in vitro* culture, 86 fertilized oocytes obtained during mating season reached the blastocyst stage, among which 27 (82.6 ± 3.7%) were formed after fertilization with the group 1A spermatozoa, 15 ((71, 9 ± 9.2)%) with group 2A (Fig. 6) and 44 (57.9 ± 9.7%) with group 2B. After fertilization of oocytes in non-mating season, 42 embryos were obtained, 10 ((69.6 ± 9.6)%) of those after fertilization with sperm group 1B, 18 (68.2 ± 11.2%) with group 2A and 14 (53.5 ± 6.5)% with group 2B.

Analysis of the degree of development of the obtained embryos on day 7 of cultivation (Table) revealed that after fertilization of oocytes with the group 1A spermatozoa obtained in mating season, the blastulation frequency was higher than 80%.

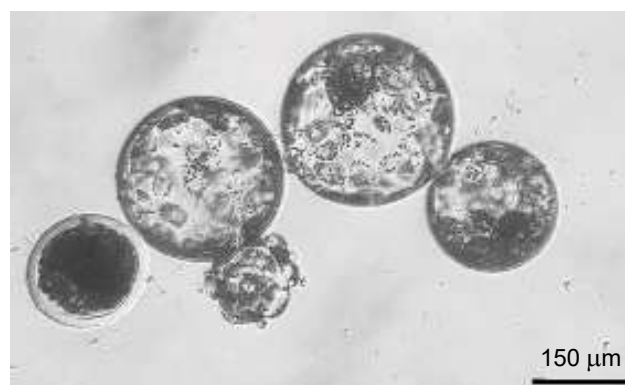


Рис. 6. Ембріони кози після запліднення ооцитів, отриманих у парувальний сезон, сперматозоїдами групи 2A на 7-му добу розвитку.

Fig. 6. Goat embryos after fertilization of oocytes obtained during mating season with spermatozoa of group 2A on day 7 of development.



тварин, яким притаманні фотоперіодичні реакції. Так, темпи дроблення ембріонів у період розмноження прискорюються у верблюдів [3], бізонів [14], буйволів [24].

Таким чином, сезон впливає на кількісні та якісні характеристики сперматозоїдів цапів зааненської породи (концентрація, рухливість та життєздатність). Кріоконсервування знижує рухливість та життєздатність клітин у будь-який сезон, проте значуще у непарувальний. Здатність до запліднення сперматозоїдів, кріоконсервованих у парувальний сезон, відповідає такій у свіжовиділених. Клітини, кріоконсервовані у непарувальний сезон, проявляють найнижчу здатність до запліднення. У парувальний сезон компетентність розвитку ембріонів вища, ніж у непарувальний, що збільшує показник бластуляції та позитивно впливає на якість ембріонів.

Результати дослідження дозволять розробити стратегію відтворення сільськогосподарських тварин задля продовольчої безпеки України.

Висновки

За результатами дослідження встановлено, що репродуктивні характеристики цапів зааненської породи характеризуються значущо вищими показниками загальної кількості сперматозоїдів і збільшенням їх рухливості у парувальний сезон порівняно з непарувальним (у 1,8 та 1,3 раза відповідно) ($p < 0,05$).

Частота виживання сперматозоїдів цапів після кріоконсервування є сезоннозалежною — у парувальний сезон кількість неушкоджених сперматозоїдів ($(72,86 \pm 4,91)\%$) була значущо більшою порівняно з непарувальним ($(58,16 \pm 6,91)\%$) ($p < 0,05$).

Частота запліднення ооцитів після використання свіжовиділених ($(94,8 \pm 1,3)\%$) та кріоконсервованих ($(85,7 \pm 2,4)\%$) сперматозоїдів парувального сезону була значущо вищою порівняно зі сперматозоїдами, отриманими у непарувальний сезон ($p < 0,05$).

Кількість ембріонів, які розвинулися до стадії бластоцисти, була найменшою після запліднення ооцитів кріоконсервованими сперматозоїдами, отриманими у непарувальний сезон ($(53,5 \pm 6,5)\%$) ($p < 0,05$).

Література

1. Копейка ЕФ, Петрушко МП, Пиняев ВИ, и др. Кріоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов лабораторных, сельскохозяйственных и диких животных. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(1): 3–18.

The lowest number of embryos at the blastocyst or morula stage (less than 60%) was observed after fertilization of oocytes obtained in non-mating season in group 2B spermatozoa.

There was no significant difference between the embryo development rate in mating season after fertilization of oocytes with spermatozoa of groups 1A and 2A, but this value decreased strongly when using the group 2B ones. Analysis of the development of embryos obtained after fertilization of oocytes procured in the non-mating season showed similar results, possibly due to impaired expression of genes of proteins responsible for fertility (*e. g.* M6P / IGF2R and LOC101123268, which are involved in recognition of oocytes by spermatozoon [20] and DNA integrity [17, 18].

P.V. Pereira *et al.* [19] showed that the morphokinetic characteristics of embryos were lower in anestrus (spring), *i. e.* 51% compared to the reproductive period (fall) making 72% or the transition period (summer) being 71%, while the results obtained in winter demonstrating 66%, had an intermediate value. The authors suggest differently on the influence of the season on embryological characteristics of animal species characterized by photoperiodic reactions. Thus, the cleavage rate of embryos during reproduction is accelerated in camels [1], bison [13], buffaloes [24].

Thus, the season affects the quantitative and qualitative characteristics of the Saanen goats spermatozoa (concentration, motility and viability). Cryopreservation reduces cell motility and viability in any season, but significantly in non-mating. The ability to fertilize spermatozoa, cryopreserved during mating season, corresponds to that of freshly released. Cryopreserved cells in non-mating season show the lowest ability to fertilize. During mating season, the competence of embryo development is higher than in non-mating one, that increases the blastulation rate and positively affects an embryo quality.

The research results will allow to develop a strategy for the reproduction of farm animals for food security of Ukraine.

Conclusions

In line with the research results, the reproductive characteristics of Saanen goats are characterized by significantly higher indices of total sperm count and increase in their motility in the mating season compared to non-mating one (1.8 and 1.3 times, respectively) ($p < 0.05$).

The survival rate of goat spermatozoa after cryopreservation is seasonally dependent, *i. e.* in mating season the number of intact spermatozoa

2. Павлович ОВ, Гапон ГО, Юрчук ТО, та ін. Ультрa-структурні та функціональні характеристики спермійв людини після кріоконсервування методом вітрифікації. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30(1): 24–33.
3. Al-Bulushi S, Manjunatha BM, de Graaf SP, *et al.* Reproductive seasonality of male dromedary camels. *Anim Reprod Sci.* 2019; 202: 10–20.
4. Barkawi AH, Elsayed EH, Ashour G, *et al.* Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Rumin Res.* 2006; 66(1–3): 209–13.
5. Bogdaniuk A, Garkavii V. The kinetic characteristics of semen from Saanen and Alpine goats after cryopreservation in different freezing media. *Cryobiology.* 2020; 97: 298.
6. Buriak I, Fleck RA, Goltsev A, *et al.* Translation of cryobiological techniques to socially economically deprived populations — Part 1: Cryogenic preservation strategies. *ASME J Med Devices.* 2020; 14(1): 010801 (1–14).
7. Dorado J, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Ani Repro Sci.* 2010; 121(1–2): 115–23.
8. Fatet A, Pellicer-Rubio M, Leboeuf B. Reproductive cycle of goats. *Ani Repro Sci.* 2011; 123(3–4): 211–9.
9. Giriboni J, Gökdağ Ö, Eren V, *et al.* Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. *Ani Repro Sci.* 2019; 200: 43–50.
10. Hadgu A, Fesseha H. Reproductive biotechnology options for improving livestock production: a review. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J.* 2020; 6(1): 13–20.
11. Jaayid TA, Fahid TA, Jasim NY. Oocytes extraction from Iraqi local goat ovaries by using aspiration and *in vitro* fertilization techniques. *Basrah J Agric Sci.* 2013; 26(1): 28–42.
12. Juyena NS, Stelletta C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl.* 2012; 33(4): 536–51.
13. Karatzas G, Karagiannidis A, Varsakeli S, *et al.* Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology.* 1997; 48(6): 1049–59.
14. Krishnakumar S, Whiteside DP, Elkin B, *et al.* Effect of reproductive seasonality on gamete quality in the North American bison (*Bison bison bison*). *Reprod Domest Anim.* 2015; 50(2): 206–13.
15. La Falci VSN, Tortorella H, Rodrigues JL, *et al.* Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology.* 2002; 57(5): 1035–48.
16. Martín-Hidalgo D, Macías-García B, García-Marín LJ, *et al.* Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter. *Ani Repro Sci* [internet]. 2020 Jun 2 [cited Mar 11 2021]; 219: 106513. Available from: <https://www.sciencedirect.com/journal/animal-reproduction-science/doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106513>
17. Mendoz G, White IG, Chow P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology.* 1989; 32(3): 455–66.
18. Ntemka A, Kiossis E, Boscós C, *et al.* Impact of old age and season on Chios ram semen quality. *Small Rumin Res.* 2019; 178: 15–7.
19. Pereira PV, Correia L, Batista R, *et al.* *In vitro* embryo production outcomes in adult goats is affected by season. *Reproduction Fertility and Development.* 2021; 33(2): 149.
20. Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, *et al.* Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev.* 2007; 74(7): 878–92.
21. Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, *et al.* Freezing — thawing procedures remodel the proteome of ram sperm before and after *in vitro* capacitation. *Int J Mol Sci.* [internet]. 2019 Sep 17 [cited Mar 11 2021]; 20(18): 4596. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6769739/pdf/ijms-20-04596.pdf>

((72.86 ± 4.91)%) was significantly higher than in non-mating ((58.16 ± 6.91)%) ($p < 0.05$).

The frequency of oocyte fertilization when using the freshly isolated ((94.8 ± 1.3)%) and cryopreserved ((85.7 ± 2.4)%) spermatozoa in mating season was significantly higher compared to spermatozoa obtained in non-mating season ($p < 0.05$).

The number of embryos that developed to the blastocyst stage was the lowest after fertilization of oocytes with cryopreserved spermatozoa obtained in non-mating season ((53.5 ± 6.5)%) ($p < 0.05$).

References

1. Al-Bulushi S, Manjunatha BM, de Graaf SP, *et al.* Reproductive seasonality of male dromedary camels. *Anim Reprod Sci.* 2019; 202: 10–20.
2. Barkawi AH, Elsayed EH, Ashour G, *et al.* Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Rumin Res.* 2006; 66(1–3): 209–13.
3. Bogdaniuk A, Garkavii V. The kinetic characteristics of semen from Saanen and Alpine goats after cryopreservation in different freezing media. *Cryobiology.* 2020; 97: 298.
4. Buriak I, Fleck RA, Goltsev A, *et al.* Translation of cryobiological techniques to socially economically deprived populations — Part 1: Cryogenic preservation strategies. *ASME J Med Devices.* 2020; 14(1): 010801 (1–14).
5. Dorado J, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Ani Repro Sci.* 2010; 121(1–2): 115–23.
6. Fatet A, Pellicer-Rubio M, Leboeuf B. Reproductive cycle of goats. *Ani Repro Sci.* 2011; 123(3–4): 211–9.
7. Giriboni J, Gökdağ Ö, Eren V, *et al.* Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. *Ani Repro Sci.* 2019; 200: 43–50.
8. Hadgu A, Fesseha H. Reproductive biotechnology options for improving livestock production: a review. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J.* 2020; 6(1): 13–20.
9. Jaayid TA, Fahid TA, Jasim NY. Oocytes extraction from Iraqi local goat ovaries by using aspiration and *in vitro* fertilization techniques. *Basrah J Agric Sci.* 2013; 26(1) 28–42.
10. Juyena NS, Stelletta C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl.* 2012; 33(4): 536–51.
11. Karatzas G, Karagiannidis A, Varsakeli S, *et al.* Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology.* 1997; 48(6): 1049–59.
12. Kopeika EF, Petrushko MP, Piniaviev VI, *et al.* Cryopreservation of reproductive cells and embryos of laboratory, agricultural and wild animals. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2019; 29(1): 3–18.
13. Krishnakumar S, Whiteside DP, Elkin B, *et al.* Effect of reproductive seasonality on gamete quality in the North American bison (*Bison bison bison*). *Reprod Domest Anim.* 2015; 50(2): 206–13.
14. La Falci VSN, Tortorella H, Rodrigues JL, *et al.* Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology.* 2002; 57(5): 1035–48.
15. Martín-Hidalgo D, Macías-García B, García-Marín LJ, *et al.* Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter. *Ani Repro Sci* [internet]. 2020



22. Ribeiro ES, Galvão KN, Thatcher WW, *et al.* Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Anim Reprod.* 2012; 9(3): 370–87.
23. Roca J, Martínez E, Sánchez-Valverde MA, *et al.* Seasonal variations of semen quality in male goats: Study of sperm abnormalities. *Theriogenology.* 1992; 38(1): 115–25.
24. Shahzad Q, Waqas M, Pu L, *et al.* Seasonality and photoperiod influence *in vitro* production of buffalo embryos. *Reprod Domest Anim.* 2020; 55(9): 1115–23.
25. Sklan D, Zeron Y, Roth Z, *et al.* Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. *Theriogenology.* 2007; 67(4): 878–85.
26. Taha TA, Abdel-Gawad EI, Ayoub MA. Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions 2-biochemical and enzymatic properties of seminal plasma. *J Anim Sci.* 2000; 71(02): 325–32.
27. Tbabaa M, Kridli R, Amashe M. Factors affecting scrotal circumference and semen characteristics of Awassi rams. *JJAS.* 2006; 2(3): 243–50.
28. Thomasen JR, Willam A, Egger-Danner C, *et al.* Reproductive technologies combine well with genomic selection in dairy breeding programs. *J Dairy Sci.* 2016; 99(2): 1331–40.
29. van Tilburg MF, Salles MGF, Silva MM. Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3°S). *Int J Biometeorol.* 2015; 59(5): 561–73.
30. Wang P, Wang YF, Wang H, *et al.* HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm. *Zygote.* 2014; 22(2): 239–45.
31. Wang ZG, Xu ZR, Yu SD. Effects of oocyte collection techniques and maturation media on *in vitro* maturation and subsequent embryo development in Boer goat. *Czech J Anim Sci.* 2007; 52(1): 21–5.
32. Yeste M, Morató R, Rodríguez-Gil JE, *et al.* Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology. *Reprod Domest Anim.* 2017; 52(S4): 12–27.
33. Yurchuk T, Petrushko M, Gapon A, *et al.* The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. *Cryobiology.* 2021; 100: 117–24.
34. Zhang XG, Hu S, Han C, *et al.* Association of heat shock protein 90 with motility of post-thawed sperm in bulls. *Cryobiology.* 2015; 70(2): 164–9.
- Jun 2 [cited Mar 11 2021]; 219: 106513. Available from: <https://www.sciencedirect.com/journal/animal-reproduction-science/doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106513>
16. Mendoz G, White IG, Chow P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology.* 1989; 32(3): 455–66.
17. Ntemka A. Kiossis E, Boscós C, *et al.* Impact of old age and season on Chios ram semen quality. *Small Rumin Res.* 2019; 178: 15–7.
18. Pavlovych O, Hapon H, Yurchuk T, *et al.* Ultrastructural and functional characteristics of human spermatozoa after cryopreservation by vitrification. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2020; 30(1): 24–33.
19. Pereira PV, Correia L, Batista R, *et al.* *In vitro* embryo production outcomes in adult goats is affected by season. *Reproduction Fertility and Development.* 2021; 33(2): 149.
20. Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, *et al.* Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev.* 2007; 74(7): 878–92.
21. Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, *et al.* Freezing – thawing procedures remodel the proteome of ram sperm before and after *in vitro* capacitation. *Int J Mol Sci.* [internet]. 2019 Sep 17 [cited Mar 11 2021]; 20(18): 4596. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6769739/pdf/ijms-20-04596.pdf>
22. Ribeiro ES, Galvão KN, Thatcher WW, *et al.* Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Anim Reprod.* 2012; 9(3): 370–87.
23. Roca J, Martínez E, Sánchez-Valverde MA, *et al.* Seasonal variations of semen quality in male goats: Study of sperm abnormalities. *Theriogenology.* 1992; 38(1): 115–25.
24. Shahzad Q, Waqas M, Pu L, *et al.* Seasonality and photoperiod influence *in vitro* production of buffalo embryos. *Reprod Domest Anim.* 2020; 55(9): 1115–23.
25. Sklan D, Zeron Y, Roth Z, *et al.* Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. *Theriogenology.* 2007; 67(4): 878–85.
26. Taha TA, Abdel-Gawad EI, Ayoub MA. Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions 2-biochemical and enzymatic properties of seminal plasma. *J Anim Sci.* 2000; 71(02): 325–32.
27. Tbabaa M, Kridli R, Amashe M. Factors affecting scrotal circumference and semen characteristics of Awassi rams. *JJAS.* 2006; 2(3): 243–50.
28. Thomasen JR, Willam A, Egger-Danner C, *et al.* Reproductive technologies combine well with genomic selection in dairy breeding programs. *J Dairy Sci.* 2016; 99(2): 1331–40.
29. van Tilburg MF, Salles MGF, Silva MM. Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3°S). *Int J Biometeorol.* 2015; 59(5): 561–73.
30. Wang P, Wang YF, Wang H, *et al.* HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm. *Zygote.* 2014; 22(2): 239–45.
31. Wang ZG, Xu ZR, Yu SD. Effects of oocyte collection techniques and maturation media on *in vitro* maturation and subsequent embryo development in Boer goat. *Czech J Anim Sci.* 2007; 52(1): 21–5.
32. Yeste M, Morató R, Rodríguez-Gil JE, *et al.* Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology. *Reprod Domest Anim.* 2017; 52(S4): 12–27.
33. Yurchuk T, Petrushko M, Gapon A, *et al.* The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. *Cryobiology.* 2021; 100: 117–24.
34. Zhang XG, Hu S, Han C, *et al.* Association of heat shock protein 90 with motility of post-thawed sperm in bulls. *Cryobiology.* 2015; 70(2): 164–9.