





UNIwersytet  
PRZYRODNICZY  
WE WROCLAWIU

SZKOŁA DOKTORSKA  
WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ  
KATEDRA ROZRODU Z KLINIKĄ ZWIERZĄT GOSPODARSKICH

lek. wet. Maria Eberhardt

BADANIA NAD WŁAŚCIWOŚCIAMI *IN VITRO* ORAZ ZDOLNOŚCIĄ  
ZAPŁADNIAJĄCĄ PLEMNIKÓW ŻUBRA (*BISON BONASUS*)  
W ASPEKCIE DOSKONAŁENIA METOD KRIOKONSERWACJI  
GAMET MĘSKICH TEGO GATUNKU

Promotorzy

Prof. dr hab. Wojciech Nizański

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Prof. dr hab. Wanda Olech-Piasecka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wrocław 2023

Badania zostały sfinansowane przez:

Fundusz Leśny zgodnie z umową nr OR.271.3.10.2017;

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu z projektu badawczego o numerze N020/0016/20;

w ramach programu “Bon doktoranta Szkoły Doktorskiej UPWr”;

oraz Narodową Agencję Wymiany Akademickiej w ramach grantu nr PPI/APM/2019/1/00044/U/00001.

*Składam serdeczne podziękowania moim Promotorom:*

*Panu Profesorowi Wojciechowi Nizańskiemu oraz Pani Profesor Wandzie Olech*

*Za zaufanie, poświęcony czas oraz opiekę naukową.*

*Pani dr hab. Sylwii Prochowskiej za wszelkie rady,*

*ogromną do mnie cierpliwość,*

*wspólne zbieranie materiału i każdy ukończony razem bieg.*

*Pani mgr Barbarze Smalec – Basiu, bez Ciebie w laboratorium to „ani rusz”!*

*Panu dr hab. Wojciechowi Bieleckiemu oraz pracownikom nadleśnictw*

*za wspólne dyskusje, poleconą literaturę i nieocenioną pomoc*

*w pozyskiwaniu materiału badawczego.*

*Pracownikom Katedry Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich,*

*którzy wspierali mnie podczas tworzenia tej pracy.*

*Pani dr Martinie Colombo za przyjaźń i wsparcie podczas realizacji*

*części planu badawczego w atmosferze słonecznej Italii.*

*Moim przyjaciółom – Dominice Grabolus oraz Bartoszowi Czechowi –*

*za wspieranie i wspólne trwanie na „doktoratowej” ścieżce.*

*Mojemu Mężowi – Bartłomiejowi Jaśkowskiemu –*

*za bezustanne wsparcie i nieziemską cierpliwość.*

*Dziękuję!*

*Moim Rodzicom i Dziadkom*

## SPIS TREŚCI

1. WSTĘP .....	10
2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA .....	11
2.1. Zarys historii żubra .....	11
2.2. Współczesna populacja żubra – problemy i wyzwania .....	13
2.3. Techniki wspomaganego rozrodu jako narzędzie w programach ochrony ginących gatunków .....	13
2.3.1. Zasadność wprowadzenia .....	13
2.3.2. Pozyskiwanie plemników .....	14
2.3.3. Metody oceny plemników .....	15
2.3.4. Kriokonserwacja plemników .....	17
2.3.4.1. Optymalizacja procesu kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra .....	18
2.3.4.1.1. Selekcja plemników w oparciu o gradient gęstości .....	18
2.3.4.1.2. Dobór rozrzedzalnika .....	19
3. HIPOTEZY BADAWCZE I CELE PRACY .....	21
3.1. Hipotezy badawcze .....	21
3.2. Cele badawcze .....	21
4. ZADANIA BADAWCZE ORAZ PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	22
4.1. Zadania badawcze .....	22
4.2. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej .....	22
5. MATERIAŁ I METODY .....	23
5.1. Materiał .....	23
5.2. Metody .....	23
5.2.1. Izolacja plemników .....	23
5.2.2. Przygotowanie plemników do analizy .....	24
5.2.3. Ocena pozyskanych plemników .....	24
5.2.3.1. Wstępna ocena pozyskanych plemników .....	24
Ocena ruchliwości subiektywnej .....	24
Ocena koncentracji i całkowitej liczby plemników .....	25
5.2.3.2. Szczegółowa ocena pozyskanych plemników .....	25
Ocena żywy/martwy z wykorzystaniem barwnika eozynowo-nigrozynowego .....	25
Ocena morfologii plemników .....	26
5.2.3.2.3. Morfometria główek plemników .....	28
5.2.3.2.4. Komputerowo wspomaganą Analizę Nasienia (CASA) .....	29
5.2.3.2.5. Ocena cech strukturalno-funkcjonalnych plemników najądrzowych żubra za pomocą barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej .....	31

5.2.4. Selekcja plemników najądrzowych żubra za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® .....	33
5.2.5. Mrożenie plemników najądrzowych żubra .....	34
5.2.5.1. Rozrzedzalniki wykorzystane do mrożenia plemników żubra.....	34
5.2.5.2. Protokoły mrożenia plemników najądrzowych żubra .....	35
Mrożenie plemników w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris.....	35
Mrożenie plemników w komercyjnym rozrzedzalniku przeznaczonym dla nasienia bydła domowego – Andromed® .....	36
5.2.6. Rozmrażanie plemników.....	36
5.2.7. Porozmrożeniowa ocena plemników najądrzowych żubra.....	36
5.2.8. Adaptacja testu wiązania z osłonką przejrzystą oocytu do oceny mrożonych/roz rozmrożonych plemników najądrzowych żubra .....	36
5.2.9. Analiza statystyczna uzyskanych wyników .....	40
5.3. Schemat doświadczenia.....	40
6. WYNIKI .....	41
6.1. Zadanie badawcze 1. Ocena morfologii, morfometrii oraz cech funkcjonalno- strukturalnych plemników najądrzowych żubra .....	41
6.1.1. Podstawowa ocena plemników .....	41
6.1.2. Morfometria główek plemników żubra .....	41
6.1.3. Charakterystyka cech funkcjonalno-strukturalnych plemników najądrzowych żubra .....	42
6.1.4. Ocena zależności pomiędzy właściwościami plemników, a czasem który upłynął od końca sezonu oraz wiekiem badanych osobników.....	42
6.2. Zadanie badawcze 2. Mrożenie plemników najądrzowych żubra w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu.....	48
6.2.1. Podstawowa ocena plemników .....	48
6.2.2. Ocena efektów kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra za pomocą cytometrii przepływowej.....	49
6.3. Zadanie badawcze 3. Selekcja plemników najądrzowych żubra za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® przed poddaniem ich procesowi kriokonserwacji.....	50
6.4. Zadanie badawcze 4. Przeprowadzenie testu wiązania plemników najądrzowych żubra z heterologiczną osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego.....	55
7. OMÓWIENIE WYNIKÓW .....	62
8. WNIOSKI .....	72
9. PIŚMIENNICTWO.....	73
10. STRESZCZENIE .....	84
11. SUMMARY .....	86
12. ZAŁĄCZNIK 1.....	88
13. ZAŁĄCZNIK 2.....	100
14. ZAŁĄCZNIK 3.....	113

Niniejsza praca doktorska została zrealizowana w oparciu o cykl publikacji, stanowiących integralną część manuskryptu.

Eberhardt M., Prochowska S., Partyka A., Bielas W., Van Soom A., Olech W., Niżański W. The morphology, morphometry and functionality of fresh and cryopreserved wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa. *Sci Rep.* 2023. 24;13(1):13866. doi: 10.1038/s41598-023-40798-y. Punkty MEiN – 140; IF – 4,6 (**załącznik 1**).

Eberhardt M., Prochowska S., Duszewska A.M., Van Soom A., Olech W., Niżański W. The influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa. *BMC Vet Res.* 2022. 18(1):305. doi: 10.1186/s12917-022-03408-z. Punkty MEiN – 140; IF – 2,6 (**załącznik 2**).

Eberhardt M., Colombo M., Prochowska S., Luvoni G.C., Olech W., Niżański W. The first report on the use of a zona pellucida binding assay to compare the effects of European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa cryopreservation in two different extenders. Preprint na platformie bioRxiv. bioRxiv 2023.09.11.557052; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.09.11.557052> (**załącznik 3**).



## SŁOWNIK TERMINÓW

**AI** (artificial insemination) – sztuczna inseminacja

**ALH** (Amplitude of Lateral Head Displacement) – Amplituda bocznych odchyień główki ( $\mu\text{m}$ )

**ART** (Assisted Reproductive Techniques) – techniki wspomaganego rozrodu

**BCF** (Beat Cross Frequency) – częstotliwość bocznych odchyień główki plemnika (Hz)

**HTF** (Human Tubular Fluid) – komercyjne medium do zapłodnienia pozaustrojowego

**IVF** (In vitro fertilization) – zapłodnienie pozaustrojowe

**LIN** (Linearity) – liniowość ruchu plemnika (%)

**MEDIUM\_PCT** (Medium) – odsetek plemników o umiarkowanej szybkości ruchu (%)

**MOT** (Motility) – odsetek plemników ruchliwych (%)

**PI** (Propidium Iodide) – jodek propidyny

**PMOT** (Progressive motility) – odsetek plemników charakteryzujących się ruchem postępowym PMOT (%)

**RAPID\_PCT** (Rapid) – odsetek plemników szybkich (%)

**STATIC\_PCT** (Static) – odsetek plemników statycznych (%)

**STR** (Straightness) – prostoliniowość ruchu plemnika wyrażona stosunkiem VSL/VAP (%)

**TEG** – (Tris - egg yolk – glicerol) rozrzedzalnik na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego z dodatkiem glicerolu

**VAP** (Average path velocity) – średnia prędkość plemnika po przybliżonej ścieżce ruchu ( $\mu\text{m/s}$ )

**VCL** (Curvilinear velocity) – średnia prędkość plemnika po rzeczywistej ścieżce ruchu ( $\mu\text{m/s}$ )

**VSL** (Straight line velocity) – średnia prędkość plemników wzdłuż linii prostej wyznaczonej między początkowym a końcowym położeniem gamety ( $\mu\text{m/s}$ )

**ZBA** (Zona Binding Assay) – test wiązania z osłonką przejrzystą

## 1.WSTĘP

Żubr (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) to najstarszy, obecnie żyjący na Ziemi, przedstawiciel rodziny krętorogich (bovidae) [99]. W obrębie gatunku wyróżnia się trzy podgatunki: żubr białowieski (nizinny) (*Bison bonasus bonasus*), a także obecnie wymarłe: żubr kaukaski (górski) (*Bison bonasus caucasicus*, Turkin i Satunin, 1904) oraz żubr węgierski (*Bison bonasus hungarorum*, Kretzoi, 1946) [99].

Zwierzę to jest największym żyjącym ssakiem lądowym Europy [99]. Żubra cechuje masywna szyja i kark oraz wyraźna dysproporcja między szeroką i masywną klatką piersiową, a niższym i węższym zadem [53]. Samce tego gatunku osiągają masę od 436 do 920 kg, samice natomiast od 340 do 640 kg [53]. W rozrodzie żubr charakteryzuje się sezonowością z okresem rozrodczym przypadającym na lipiec – wrzesień [53].

Na terenie Polski żubr podlega ścisłej ochronie gatunkowej w oparciu o Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 16 grudnia 2016 r. w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt (Dz.U. 2022 poz. 2380). Należy podkreślić, że żubr zaliczany jest do tak zwanych gatunków parasolowych, czyli takich, których ochrona zapewnia bezpieczeństwo innym gatunkom zwierząt dzielącym z nim siedlisko [27,107,116]. Co więcej, jest on również nieodzownym elementem polskiego krajobrazu i historii. Stąd ochrona żubra jest niezwykle istotna nie tylko ze względów ekologicznych, ale i kulturowych.

Choć Polska jest krajem przodującym w restytucji i ochronie tego gatunku, nadal wiele aspektów dotyczących jego rozrodu nie zostało w pełni poznanych. Nowo powstające i wciąż rozwijane na całym świecie banki gamet zagrożonych gatunków kierują dalsze badania fizjologii rozrodu żubrów w stronę kriokonserwacji i wykorzystania, w technikach wspomaganego rozrodu, plemników pozyskanych *post mortem* z najądrzy padłych lub poddanych eliminacji osobników. Stworzenie dobrej jakości rezerwy genetycznej, podobnie jak w przypadku innych chronionych gatunków jest priorytetowe.

## 2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

### 2.1. Zarys historii żubra

Żubra szczegółowo opisał i sklasyfikował w 1758 roku Karol Linneusz. Jednakże, gatunek ten, jak i jego przodkowie znane są ludzkości już od czasów prehistorycznych [99]. Świadczą o tym liczne malowidła i rzeźby, znajdowane podczas prac archeologicznych, a przedstawiające te zwierzęta [114].

Po ustąpieniu lodowców, znaczącą część Europy pokryły lasy, które stały się dostępnym środowiskiem dla żubrów. Intensywny rozwój cywilizacyjny spowodował jednak znaczne ograniczenie obszaru ich naturalnego występowania. Zmniejszenie dostępnych siedlisk wpłynęło na spadek liczebności jego populacji, przyspieszony dodatkowo przez polowania oraz kłusownictwo. W konsekwencji, w XIX stuleciu, przedstawiciele tego gatunku na wolności występowali jedynie na Kaukazie i w Puszczy Białowieskiej [99]. Dzięki swojej unikalności, białowieskie lasy, od czasów Rzeczypospolitej Obojga Narodów uznawane były za „królewszczyznę” i objęte były specjalnym nadzorem. Puszcza Białowieska była zatem obszarem polowań zarezerwowanym jedynie dla władców i ich gości [110]. Szczególny nadzór nad tym obszarem został utrzymany również przez cara Rosji po rozbiorach Polski. Wydany w 1803 roku dekret o ochronie żubra oraz rozpoczęciu jego hodowli przyczynił się do gwałtownego wzrostu jego liczebności [59]. W połowie XIX wieku pogłowie żubrów, żyjących w Puszczy Białowieskiej przekroczyła 1800 osobników. Jednakże, konkurencja pokarmowa, kłusownictwo, toczące się na tych terenach walki narodowo-wyzwoleńcze oraz wojny przyczyniły się do ponownego spadku ich liczby [22]. Pierwszą wojnę światową w Puszczy Białowieskiej przeżyło jedynie 9 osobników. Pomimo podjętych prób odnalezienia i ochrony żyjących przedstawicieli żubra, w kwietniu 1919 roku, znaleziono szczątki ostatniego żyjącego na wolności żubra nizinnego [99].

Los żubra nizinnego podzielił również żubr kaukaski. Ostatni żyjący na wolności przedstawiciel tego podgatunku zginął w 1927 roku [99]. W niewoli pozostał jeden byk – nazwany Kaukasus – który krzyżowany z samicami z podgatunku żubra nizinnego, zapoczątkował linię nizinno-kaukaską [59].

W 1923 roku w Paryżu odbył się Międzynarodowy Kongres Ochrony Przyrody, podczas którego przedstawiony został projekt ratowania żubra, inspirowany podobnym programem realizowanym dla ochrony bizona amerykańskiego. Utworzone w tym

samym roku Międzynarodowe Towarzystwo Ochrony Żubra zrzeszało 15 krajów Europy oraz Stany Zjednoczone [99]. Jako zadanie priorytetowe uznano potrzebę inwentaryzacji ocalałych żubrów. Wszystkie żyjące osobniki zostały skatalogowane w Księdze Rodowodowej Żubrów, wydanej w Niemczech [99,101]. Na całym świecie w ogrodach zoologicznych i zagrodach pokazowych przetrwały zaledwie 54 żubry. Niestety, żaden z nich nie znajdował się na terenie Polski [99]. W 1924 roku do zoo w Poznaniu, sprowadzono zakupioną w Niemczech pierwszą parę żubrów. Gacznina i Hagen miały wtedy 13 lat. Para ta doczekała się dwóch cieląt, które padły nie osiągając dojrzałości płciowej [58]. Kolejną próbę podjęto sprowadzając żubry do utworzonej na terenie Puszczy Białowieskiej zagrody hodowlanej. Wyselekcjonowane do hodowli zwierzęta pochodziły początkowo z Niemiec, z linii białowiesko-kaukaskiej – byk Borusse – oraz samiec żubrobizon – Kobold. Kolejne osobniki sprowadzono ze Szwecji. Były to dwie samice linii białowieskiej – Biserta oraz Biscaya. Wkrótce, do zagrody dotarły również Hagen i Gacznina, a także kolejni przedstawiciele linii białowieskiej – samiec Biörson oraz samica Bilma. W 1936 roku stado uzupełnił kolejny byk linii białowieskiej – Plisch [28,58,93].

W celu wyprowadzenia czystej linii białowieskiej, wszystkie wcześniej sprowadzone żubrobizony oraz żubry linii białowiesko-kaukaskiej zostały przetransportowane do innych lokalizacji. Pozostałe w rezerwacie Plisch, Biskaya oraz Biserta zapoczątkowały obecnie żyjącą populację żubrów białowieskich [93].

Przed rozpoczęciem II wojny światowej na świecie żyło 115 żubrów, z czego 37 na terenie Polski. Pomimo podejmowanych w czasie wojny prób ochrony, po jej zakończeniu pozostały jedynie 103 osobniki, w tym na terenie Polski 44 żubry (<https://smz.waw.pl/historia/>).

Od czasów zakończenia II Wojny Światowej Polska jest głównym krajem zajmującym się restytucją tego gatunku, a Księga Rodowodowa Żubra jest corocznie wydawana w Polsce. Stąd, geny polskich żubrów są niezwykle cenne, a hodowla na terenie Polski stanowi główny fundament linii nizinnej [101].

Pierwsze żubry z białowieskiej hodowli zostały wypuszczone na wolność w 1952 roku. Kolejne dołączyły do nich już rok później [93]. Natomiast pierwsze urodzone na wolności cielę przyszło na świat w 1957 roku i otrzymało imię Potyczka [22].

## **2.2. Współczesna populacja żubra – problemy i wyzwania**

Obecnie na całym świecie żyje 10 536 żubrów, z czego na terenie Polski – 2603, w tym 2394 w stadach wolnych, a 209 w zamkniętych hodowlach (dane na dzień 31.12.2022) [61]. Pomimo tego, że początki odtwarzania populacji były trudne i naznaczone niepowodzeniami, ostatecznie okazały się wielkim sukcesem. Świadczy o tym zmiana statusu żubra w czerwonej księdze gatunków zagrożonych International Union for Conservation of Nature (IUCN). Od 2020 roku żubr jest klasyfikowany jako gatunek bliski zagrożenia, a nie jako narażony na wyginięcie [96]. Należy jednak pamiętać o historii żubra i wyjściowej liczbie osobników, które zapoczątkowały obecnie żyjącą populację. Populacja żubra, poprzez osiągnięcie liczebności bliskiej wyginięciu, uległa efektowi genetycznego wąskiego gardła (z ang. genetic bottleneck), czyli zmniejszenia populacyjnej różnorodności genetycznej [86]. Analiza Księgi Rodowodowej Żubra wykazała, że wszystkie żyjące osobniki posiadają geny zaledwie 12 przodków; w konsekwencji charakteryzują się niską zmiennością genetyczną [87]. Populacja żubra jest mała i podzielona na mniejsze, izolowane od siebie, stada. Niewielka liczebność populacji, w powiązaniu z wysokim stopniem jej homogenetyczności, stanowi jedno z istotnych zagrożeń dla przyszłości gatunku [27,29]. U żyjących obecnie osobników może dojść do obniżenia zdolności adaptacyjnych, zwiększenia podatności na niektóre choroby, zmniejszenia przeżywalności i pogorszenia płodności [27,29]. W konsekwencji, zagrażające żubrom choroby, takie jak gruźlica, brucelozą, nekrotyczne zapalenie napletka, czy telazjoza, mogą eliminować nie tylko pojedyncze osobniki, ale również całe stada [24,27,52,57]. Stąd, nie liczebność populacji, a zachowanie dobrostanu oraz różnorodności genetycznej stanowi obecnie wyzwanie w programie ochrony tego gatunku.

## **2.3. Techniki wspomaganego rozrodu jako narzędzie w programach ochrony ginących gatunków**

### **2.3.1. Zasadność wprowadzenia**

Uboga pula genowa jest niewątpliwym problemem wszystkich zagrożonych populacji. By temu przeciwdziałać programy ochrony zakładają unikanie kojarzeń krewniaczych oraz wzbogacanie puli genowej poprzez wymianę osobników pomiędzy hodowlami. Doskonałym uzupełnieniem programów hodowlanych, zarówno u zwierząt udomowionych, jak i dzikich, jest wprowadzenie technik wspomaganego rozrodu

(ang. Assisted Reproductive Techniques, ART), umożliwiającą wykorzystanie szeregu metod ułatwiających wymianę puli genowej oraz zachowanie zmienności genetycznej [17,43].

Do najczęściej stosowanych metod ART zaliczyć można sztuczną inseminację, zapłodnienie *in vitro* czy transfer zarodków, pozwalające na otrzymanie ciąży z pominięciem przynajmniej jednego z naturalnych etapów tego procesu [23]. Techniki wspomaganego rozrodu są szeroko rozpowszechnione i wciąż udoskonalane w hodowli zwierząt gospodarskich. Ich zastosowanie przyniosło ogromne korzyści, w efekcie szybszego postępu hodowlanego i intensyfikacji produkcji [17,77]. Dobrze poznane i rozwinięte ART stosowane u zwierząt gospodarskich stanowią punkt wyjściowy dla badań nad ich wykorzystaniem w programach ochrony zagrożonych i ginących gatunków [17,29].

### **2.3.2. Pozyskiwanie plemników**

Podstawą implementacji ART do programów hodowlanych jest pozyskanie i zachowanie gamet w taki sposób, by stanowiły jak najwyższej jakości rezerwę genetyczną. Na całym świecie powstają banki genów gromadzące plemniki, oocyty oraz tkanki przedstawicieli zagrożonych gatunków [10,15,29].

W przypadku zwierząt dzikich trudność w pozyskaniu nasienia jest jednym z czynników ograniczających potencjalny rozwój ART. Istnieje szereg metod pozyskania gamet od samców zwierząt takie jak: z wykorzystaniem sztucznej pochwy, wyflukiwanie nasienia z dróg rodnych samicy, elektroejakulacja, czy nacinanie ogonów najądrzy [29]. Każda z tych metod posiada swoje zalety, jak również obarczona jest ograniczeniami, szczególnie trudnymi do uniknięcia w przypadku dzikich zwierząt. W dostępnej literaturze, jak dotąd, znajduje się jedno doniesienie o pozyskaniu plemników od żubra z wykorzystaniem elektroejakulacji [95]. Metoda ta wymaga znieczulenia ogólnego, w konsekwencji postrzegana jest jako niezgodna z szeroko rozumianym dobrostanem zwierzęcia. Co więcej, jak wykazano u innych gatunków zwierząt, jakość nasienia uzyskanego tą metodą nie zawsze jest zadowalająca [29]. Na szczególną uwagę zasługuje możliwość pobrania i konserwowania plemników najądrzowych. Gamety, które osiągną miejsce swojego dojrzewania – ogon najądrza – są wyposażone w odpowiednio wykształcony akrosom oraz posiadają potencjalną zdolność ruchu [68]. Izolacja plemników najądrzowych daje możliwość otrzymania potomstwa w sytuacji, gdy niemożliwa jest ejakulacja, po zabiegu orchidektomii, czy w przypadku nagłej

i niespodziewanej śmierci osobnika [39,68]. Zdolność do zapłodnienia komórki jajowej przez plemniki najądrzowe została udowodniona u wielu gatunków zwierząt udomowionych i dzikich [39,68]. Pozyskane w ten sposób gamety coraz częściej postrzegane są jako źródło cennych genów, które bez ART byłyby bezpowrotnie stracone w momencie śmierci zwierzęcia [39,68]. W przypadku zagrożonych gatunków często jest to jedyna możliwość pobrania gamet nie stojąca w sprzeczności z dobrostanem zwierząt [29,39,68]. Wyizolowane pośmiertnie gamety stanowią nieoceniony skarb w programach ochrony wielu zagrożonych gatunków [29,68]. Jednakże, głównym ograniczeniem efektywności takiej formy pozyskiwania gamet jest zależność pomiędzy jakością nasienia, a czasem jaki upływa między śmiercią zwierzęcia a pobraniem plemników [71,108]. Badania przeprowadzone na plemnikach owcy domowej (*Ovis aries*) wykazały, że do 24 godzin od śmierci zwierzęcia, podstawowe parametry plemników najądrzowych (żywołność, odsetek gamet charakteryzujących się ruchem postępowym) są porównywalne do ejakulowanych. Po upływie doby, obserwowano stopniowe obniżanie się ich jakości [71,108]. Podobne badanie przeprowadzone na plemnikach najądrzowych samców bydła domowego (*Bos taurus*) wykazały możliwość ich wykorzystania nawet do 72 godzin po śmierci zwierzęcia [73]. Z przyczyn etycznych, jak i praktycznych, metoda ta wydaje się być jedyną akceptowalną w przypadku żubrów. Możliwość pośmiertnego pobrania i wykorzystania plemników najądrzowych żubra została kilkakrotnie opisana w literaturze [26,51]. Niestety, właściwości izolowanych w ten sposób gamet nie zostały wyczerpująco zbadane. By w pełni wykorzystać ich potencjał, niezbędne są dalsze badania z wykorzystaniem zaawansowanych metod oceny plemników.

### **2.3.3. Metody oceny plemników**

Komputerowo wspomagana analiza nasienia (ang. Computer Assisted Sperm Analysis, CASA) jest rutynowo stosowaną metodą, zarówno w medycznych, jak i weterynaryjnych laboratoriach andrologicznych [2,118]. System CASA umożliwia obiektywną, szybką i szczegółową ocenę charakterystyki ruchu plemników [36]. Dzięki zastosowaniu komputerowo wspomaganey analizy nasienia możliwa jest również ocena hiperaktywacji plemników, która może być zarówno wynikiem kapacytacji, jak i negatywnego wpływu procesu kriokonserwacji [90]. Niektóre z charakteryzowanych przez system CASA parametrów, pozwalają na wyciągnięcie wniosków dotyczących zamrażalności, a także potencjału zapładniającego badanych plemników [39].

Kolejną z nowoczesnych metod badawczych umożliwiających ocenę cech funkcjonalno-strukturalnych plemników jest cytometria przepływowa w połączeniu z barwieniem fluorescencyjnym. Dzięki dobraniu odpowiednich barwników możliwa jest ocena takich cech plemników jak: ciągłość błon komórkowych, uszkodzenia akrosomu, potencjał mitochondrialny, stres oksydacyjny, struktura chromatyny, fragmentacja DNA, i wiele innych. Jej zaletą jest możliwość szybkiego zbadania znacznej liczby komórek (powyżej 10 000) w ciągu zaledwie kilkunastu sekund. Tak duża liczba ocenionych pojedynczych komórek pozwala na uzyskanie wiarygodnych i dokładnych wyników [83].

Dane z medycyny człowieka wykazały, że podstawowa analiza nasienia nie koreluje ściśle z zapłodnieniem i rozwinięciem się ciąży [85]. Szczegółowe parametry ruchu, oceniane przez system CASA, mogą jednak dostarczyć dokładniejszych informacji na temat potencjału rozrodczego reproduktora [39]. Barwienie fluorescencyjne za pomocą cytometrii przepływowej pozwala przyjrzeć się strukturze plemników, a tym samym dokonać ich funkcjonalnej oceny [45]. Jednakże zarówno wyniki analizy z wykorzystaniem systemu CASA, jak i cytometrii przepływowej nie pozwalają na jednoznaczną ocenę zdolności badanych plemników do zapłodnienia komórki jajowej.

Etap interakcji plemnik-osłonka przejrzysta oocytu jest jednym z najważniejszych etapów prowadzących do zapłodnienia, odzwierciedlającym kompetencje plemników [85]. W związku z tym, test wiązania plemników z osłonką przejrzystą (z ang. Zona Binding Assay - ZBA) został włączony do oceny nasienia przed konwencjonalnym zapłodnieniem *in vitro* (*in vitro* fertilization, IVF) w ludzkich laboratoriach [85]. Test wiązania plemników z osłonką przejrzystą został również wykorzystany w badaniach reprodukcji zwierząt. U bydła zaobserwowano pozytywną korelację między wynikami ZBA a zapłodnieniem *in vitro* [127]. Zastosowanie tego testu do oceny wyników kriokonserwacji nasienia opisano między innymi u takich gatunków jak: pies (*Canis lupus familiaris*) [113], bydło domowe (*Bos taurus*) [31,32], bawół (*Bubalus bubalis*) [48] i świnia domowa (*Sus scrofa domestica*) [16]. Jego dodatkową zaletą jest łatwość wykonania. Dzięki możliwości wykorzystania oocytów izolowanych z mrożonych jajników test ten można włączyć do rutynowej oceny nasienia.

Dotychczas w literaturze szeroko opisano proces spermatogenezy u żubra [20,21], jednakże, zaledwie kilka publikacji dotyczy gamet męskich tego gatunku [47,51,95]. Ze względu na charakter materiału, nielicznie opisywane badania opierały się



na niewielkiej grupie badanej. W pojedynczych pracach, plemniki były charakteryzowane za pomocą tradycyjnych metod oceny nasienia (morfologia, żywotność, ruchliwość subiektywna) [51]. Jednakże nadal nie opracowano opisu kompleksowych badań, które pozwoliłyby na pełną charakterystykę zarówno natywnych, jak i kriokonserwowanych plemników najądrzowych żubra z wykorzystaniem zaawansowanych metod oceny plemników, takich jak system CASA, cytometria przepływowa, czy test czynnościowy –ZBA.

#### **2.3.4. Kriokonserwacja plemników**

Pozyskane i ocenione pod kątem potencjału rozrodczego plemniki mogą zostać zastosowane od razu, jednakże dopiero ich mrożenie pozwala w pełni wykorzystać potencjał ART. Kriokonserwacja plemników w znacznym stopniu przyczyniła się do rozwoju hodowli zwierząt gospodarskich, towarzyszących oraz dzikich. Pozwala ona na rozdzielenie w czasie procesu pozyskania gamet oraz ich wykorzystania. Co więcej, dzięki zastosowaniu kontenerów transportowych, możliwe jest przekazanie dawek inseminacyjnych bez konieczności przemieszczania zwierząt.

Jednakże, proces mrożenia powoduje szereg zmian w strukturze gamety męskiej [62], z których część nie jest w pełni odwracalna po rozmrożeniu [5]. Wewnątrzkomórkowa krystalizacja, toksyczność komponentów rozrzedzalników oraz nasilenie formowania reaktywnych form tlenu (ROS) mogą spowodować uszkodzenia błony komórkowej plemnika [5]. Proces mrożenia i rozmrażania nasienia powoduje funkcjonalne i strukturalne uszkodzenia gamet, m. in. nieprawidłowości akrosomu, niska ruchliwość, obniżony potencjał mitochondrialny, zwiększona przepuszczalność plazmolemy, czy peroksydacja lipidów [5]. Zmiany te mogą przyczynić się do obniżenia ich kompetencji zapłodnieniowej po rozmrożeniu [49].

Dotychczas w literaturze opisano kilka przypadków kriokonserwacji plemników żubra z wykorzystaniem protokołów opracowanych dla nasienia bydła domowego [51,95]. Przytaczane prace dotyczyły zarówno nasienia pozyskanego metodą elektroejakulacji, jak i gamet pobranych *post mortem* [51,95]. Nie przeprowadzono jednak prac, mających na celu optymalizację procesu kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra pozyskanych *post mortem*. Z tego powodu niezbędne są badania charakteryzujące zachodzące w trakcie mrożenia zmiany oraz pozwalające ocenić właściwości plemników po mrożeniu. Analizy te pozwolą wyznaczyć kierunek, w jakim

powinny zmierzać prace nad optymalizacją protokołów postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra.

#### **2.3.4.1. Optymalizacja procesu kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra**

##### **2.3.4.1.1. Selekcja plemników w oparciu o gradient gęstości**

Podczas prac nad optymalizacją protokołu kriokonserwacji, oprócz ograniczania uszkodzeń wynikających z samego procesu mrożenia, należy uwzględnić fakt, że głównym czynnikiem limitującym efektywność procesu kriokonserwacji jest wyjściowa jakość uzyskanych plemników [103]. U knurów wykazano, że próbki nasienia zawierające dużą liczbę funkcjonalnie i morfologicznie nieprawidłowych oraz martwych plemników wykazują niższą tolerancję procesu mrożenia, niż te charakteryzujące się dobrą jakością początkową [70]. W badaniach nad nasieniem człowieka dowiedziono, że uszkodzone komórki uwalniają zawartość akrosomu oraz reaktywne formy tlenu (z ang. Reactive Oxygen Species, ROS), które negatywnie wpływają na prawidłowo funkcjonujące gamety [78]. Dodatkowymi elementami mogącymi mieć niekorzystny efekt na prawidłowo funkcjonujące plemniki są elementy morfotyczne krwi, komórki nabłonkowe oraz fragmenty tkanki najądrzowej. Usunięcie tych zanieczyszczeń może mieć korzystny wpływ na kriokonserwowane gamety [78,109], dlatego dobrą praktyką jest selekcja prawidłowych plemników przed poddaniem ich kriokonserwacji w celu poprawy efektywności tego procesu [70]. Etap wcześniejszej selekcji wydaje się mieć duże znaczenia, zwłaszcza w przypadku plemników pozyskanych z ogonów najądrzy, kiedy to sama metoda ich pozyskiwania, zwiększa ryzyko zanieczyszczenia prób. Celem ograniczenia kontaminacji opracowanych zostało wiele technik oczyszczania nasienia [1,18,62,105]. Jedną z nich jest wirowanie w gradiencie gęstości koloidalnego roztworu krzemionki pokrytej poliwinylpirolidonem (PVP) – Percoll® (Sigma-Aldrich). Jest to metoda wykorzystująca różnice gęstości pomiędzy komórkami o różnej jakości. Męskie gamety z prawidłowym jądrem charakteryzuje wyższa gęstość; w konsekwencji, znajdują się w niższych warstwach wirowanej próby. Ponadto, ruchliwe plemniki opadają w czasie wirowania szybciej niż komórki o zaburzonej ruchliwości, których ruch wymuszany jest jedynie zastosowaną siłą odśrodkową [62]. Wirowanie w gradiencie gęstości Percoll® zostało z powodzeniem wykorzystane do usuwania niepożądanych plemników z ejakulatów bydła domowego, świni domowej, owcy domowej, kury domowej czy człowieka [1,62,66].

#### 2.3.4.1.2. Dobór rozrzedzalnika

Ważnym czynnikiem wpływającym na efektywności procesu kriokonserwacji jest dobór odpowiedniego rozrzedzalnika. Idealny rozrzedzalnik dla plemników najądrzowych żubra powinien umożliwić zachowanie ich jakości oraz mieć prosty protokół niewymagający w pełni wyposażonego laboratorium, dzięki czemu możliwe będzie przeprowadzenie procedury w warunkach terenowych.

Dotychczas opisane w literaturze przypadki mrożenia plemników najądrzowych żubra obejmowały rozrzedzalnik na bazie buforu Tris, glicerolu oraz żółtka jaja kurzego [51]. Wykorzystując ten rozrzedzalnik, uzyskano akceptowalne wyniki porozmrożeniowej oceny gamet obejmującej ruchliwość ogólną (z ang. motility, MOT): 11-48% oraz ruch postępowy (z ang. progressive motility, PMOT) 8-20% [51]. Przygotowanymi, według cytowanego protokołu, plemnikami udało się skutecznie zainseminować samice bydła domowego oraz uzyskać blastocystę żubra w warunkach *in vitro* [25,26,51]. Jednakże, niejednokrotnie, pobieranie materiału odbywa się w warunkach terenowych z dala od w pełni wyposażonego laboratorium, dlatego też nadal istnieje potrzeba usprawnienia protokołu tak, by zajmował on mniej czasu, przy równoczesnym zapewnieniu przynajmniej porównywalnej jakości plemników do tych, mrożonych w pożywce na bazie buforu Tris i żółtka jaja kurzego. Pod tym względem, interesującym wyborem wydaje się komercyjnie dostępny rozrzedzalnik przeznaczony dla nasienia bydła – Andromed®. Produkt ten charakteryzuje się prostym, jednoetapowym, protokołem [94,95] oraz składem wolnym od produktów pochodzenia zwierzęcego – dodatek żółtka jaja lub mleka zastąpiony został fosfolipidami pochodzącymi z soi. Do tej pory w literaturze pojawił się jeden raport dotyczący wykorzystania rozrzedzalnika Andromed® do kriokonserwacji nasienia żubra pozyskanego metodą elektroejakulacji [95]. Nie ma jednak informacji na temat stosowania tego produktu do mrożenia plemników pozyskanych z najądrzy żubra.

Obecnie, biotechnologię reprodukcyjną charakteryzuje tendencja do unikania rozcieńczalników zawierających produkty pochodzenia zwierzęcego. Żółtko jaja lub mleko mogą być potencjalnym źródłem patogennych mikroorganizmów, takich jak wirus ptasiej grypy, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, czy mykoplazmy [124]. Eliminacja potencjalnych patogenów z procesu konserwacji gamet jest ważna dla tworzenia stabilnych rezerw genetycznych, a w przyszłości dla uzyskania potomstwa wolnego od chorób [46,64,124]. Od kilku lat, w badaniach nad opracowywaniem optymalnych

rozzredzalników wolnych od białka pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych dla różnych gatunków zwierząt, dużym zainteresowaniem cieszą się metody modyfikacji płynności błon plemników. Jedną z tych metod jest zastosowanie cyklodekstryn jako nośników cząsteczek cholesterolu [7,9,13,100,124]. Cyklodekstryna ma zdolność do preferencyjnego wiązania się z cząsteczkami cholesterolu w mniej uporządkowanych obszarach błony komórkowej i wbudowywania go. Dodatkowe cząsteczki cholesterolu powodują zwiększenie płynności błony, a tym samym chronią ją przed uszkodzeniami spowodowanymi procesem mrożenia [50,76]. Udana próba kriokonserwacji nasienia przy użyciu rozredzalnika wzbogaconego kompleksem cyklodekstryny i cholesterolu podjęto u blisko spokrewnionego z żubrem bizona amerykańskiego (*Bison bison athabascae*). Jego skuteczność potwierdzono zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [124].

Ze względu na konieczność utworzenia banku plemników, mogących w przyszłości być podstawą zachowania różnorodności genetycznej, rozwój technik wspomaganego rozrodu wydaje się być kluczowym dla przyszłości populacji żubra. Wiele aspektów dotyczących charakterystyki jego gamet, ich oceny oraz możliwości kriokonserwacji nie zostało poznanych. Co więcej, dotychczas uzyskane wyniki zapłodnienia *in vitro* oraz transferu zarodków są niesatysfakcjonujące. Potrzeba uzupełnienia wiedzy o charakterystykę plemników najądrzowych żubra pod kątem wykorzystania ich w ART, stała się przyczyną realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

### **3. HIPOTEZY BADAWCZE I CELE PRACY**

#### **3.1. Hipotezy badawcze**

- I. Plemniki pozyskane *post mortem* z najądrzy żubrów poza sezonem rozrodczym charakteryzują się jakością kwalifikującą je do procesu kriokonserwacji;
- II. Rozrzedzalnik na bazie buforu Tris i żółtka jaja kurzego jest odpowiedni do kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra pozyskanych *post mortem*;
- III. Selekcja plemników w gradiencie gęstości Percoll® przed procesem kriokonserwacji pozwala na uzyskanie lepszej porozmrożeniowej jakości próbek;
- IV. Test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego (ZBA) może być wykorzystywany do oceny jakości pozyskanych plemników.

#### **3.2. Cele badawcze**

Nadrzędnym celem przeprowadzonych badań było ustalenie efektywnego protokołu postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra w kontekście doskonalenia procedur stosowanych w banku plemników tego gatunku.

Podjęta w niniejszej dysertacji tematyka obejmowała cztery szczegółowe cele badawcze:

- I. Morfologiczno – strukturalna charakterystyka plemników najądrzowych żubra;
- II. Ocena efektów kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra.
- III. Ocena wpływu selekcji plemników za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® na ich jakość po rozmrożeniu;
- IV. Zweryfikowanie możliwości wykorzystania testu wiązania z osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego (ZBA) do oceny jakości pozyskanych plemników.

## **4. ZADANIA BADAWCZE ORAZ PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

### **4.1. Zadania badawcze**

W ramach niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane cztery zadania badawcze:

- I. Ocena morfologii, morfometrii oraz cech funkcjonalno – strukturalnych plemników najądrzowych żubra za pomocą podstawowych metod oceny nasienia, pomiarów morfometrycznych oraz barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej;
- II. Mrożenie plemników najądrzowych żubra w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu;
- III. Selekcja plemników najądrzowych żubra za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® przed poddaniem ich procesowi kriokonserwacji;
- IV. Przeprowadzenie testu wiązania plemników najądrzowych żubra z heterologiczną osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego.

### **4.2. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej**

Wyniki otrzymane podczas realizacji zadania I i II zostały przedstawione w publikacji stanowiącej załącznik 1 do niniejszego manuskryptu.

Wyniki otrzymane podczas realizacji zadania III zostały przedstawione w publikacji stanowiącej załącznik 2 do niniejszego manuskryptu.

Wyniki otrzymane podczas realizacji zadania IV zostały przedstawione w postaci preprintu stanowiącego załącznik 3 do niniejszego manuskryptu.

## 5. MATERIAŁ I METODY

### 5.1. Materiał

Materiał do badań stanowiły plemniki najądrzowe pozyskane *post mortem* od samców żubra w wieku od 3 do 20 lat. Zwierzęta pochodziły zarówno z ośrodków hodowli, jak i zagród pokazowych znajdujących się na terenie Polski (12 lokalizacji). Pozyskanie materiału miało miejsce poza sezonem rozrodczym (od września do kwietnia) w latach 2015-2023.

W każdym z zadań wykorzystano plemniki pochodzące od różnej liczby osobników. W tabeli 1 przedstawiono liczbę osobników, od których plemniki wykorzystano w poszczególnych zadaniach badawczych.

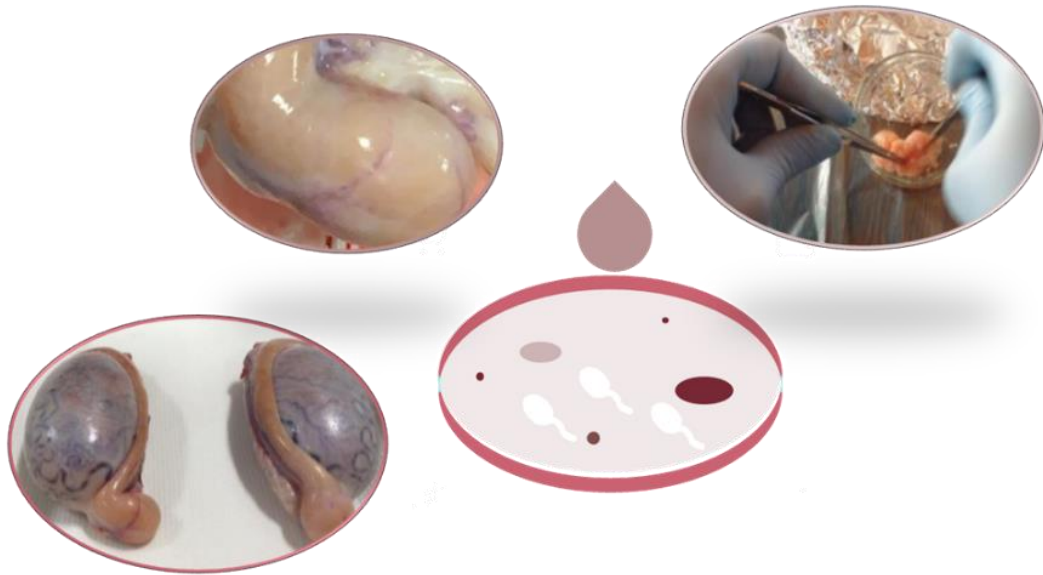
Tabela 1. Liczba osobników żubra, od których plemniki wykorzystano w poszczególnych zadaniach badawczych

Zadanie badawcze	I	II	III	IV
Liczba osobników, od których pozyskano plemniki	27	20	4	1

### 5.2. Metody

#### 5.2.1. Izolacja plemników

Bezpośrednio po śmierci zwierzęcia jądra wraz z najądrzami usuwano z moszny, oddzielano najądrza w celu oczyszczenia z krwi i zanieczyszczeń, opłukiwano je izotonicznym roztworem soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Następnie odcinano oba ogony najądrzy i umieszczano je na osobnych szalkach Petriego, zawierających 4 ml rozrzedzalnika na bazie buforu TRIS (Tris (2,4 g), kwas cytrynowy (1,4 g), glukoza (0,8 g), penicylina (5000 IU) streptomycyna (100 mg) i wodę destylowaną do 100 ml) (pH 6,9, 300 mOsm kg<sup>-1</sup>), utrzymywanego w temperaturze 37°C. W celu pozyskania plemników, ostrzem chirurgicznym wykonywano szereg nacięć ogonów najądrzy w taki sposób, by przeciąć światło kanalików nasiennych i uwolnić gamety do rozrzedzalnika (rycina 1). Następnie szalki umieszczano na stoliku grzewczym (37°C) na 10 minut.



Rycina 1. Schemat pozyskiwania plemników z najądrzy żubra

### 5.2.2. Przygotowanie plemników do analizy

Po 10 minutowej inkubacji rozrzedzalnik zawierający plemniki наносono za pomocą pipety 1000  $\mu$ l na filtr do komórek o wielkości porów 70  $\mu$ m umieszczony w plastikowym falkonie o pojemności 50 ml, celem oczyszczenia gamet z fragmentów tkanek i detrytusów komórkowych.

### 5.2.3. Ocena pozyskanych plemników

#### 5.2.3.1. Wstępna ocena pozyskanych plemników

Otrzymywane po przefiltrowaniu próby zawierające plemniki, niezależnie od etapu badań, poddawane były wstępnej analizie obejmującej ocenę ruchliwości subiektywnej, koncentracji i całkowitej liczby plemników.

#### Ocena ruchliwości subiektywnej

W celu określenia ruchliwości subiektywnej plemników, 10  $\mu$ l próbki nakrapiano na szkiełko podstawowe wcześniej umieszczone na stoliku grzewczym i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Odsetek plemników ruchliwych oceniało trzech niezależnych obserwatorów. Następnie wyciągano średnią z trzech obserwacji. Ocenę ruchliwości subiektywnej przeprowadzano za pomocą mikroskopu kontrastowo-fazowego Nikon Eclipse E200 (powiększenie 400x).



### **Ocena koncentracji i całkowitej liczby plemników**

Do obliczenia koncentracji plemników w jednostce objętości wykorzystywano komorę Thoma o głębokości 0,1 mm przykrytą szkiełkiem nakrywkowym oraz mikroskop kontrastowo-fazowy Nikon Eclipse E200 (200 x). Każdorazowo po przygotowaniu komory weryfikowano obecność pierścieni Newtona. Przed oceną koncentracji plemników, próby rozcieńczano 200-krotnie wodą destylowaną i nakładano w przybliżonej objętości 7  $\mu$ l do wypełnienia każdej siatki [14]. Następnie zliczano komórki w 20 kwadratach (o długości boku 0,05 mm), po 10 z górnej i dolnej siatki. Za każdym razem liczono plemniki znajdujące się wewnątrz kwadratów, jak i na górnych i lewych liniach granicznych. Koncentrację plemników w 1  $\text{mm}^3$  wyliczano ze wzoru: liczba zliczonych plemników x 50 000 (objętość jednego kwadratu (250) x rozcieńczenie (200)).

#### **5.2.3.2. Szczegółowa ocena pozyskanych plemników**

##### **Ocena żywy/martwy z wykorzystaniem barwnika eozynowo-nigrozynowego**

Ocena odsetka plemników żywych i martwych była wykonywana podczas realizacji każdego z zadań badawczych.

##### **Przygotowanie barwnika eozynowo-nigrozynowego**

W celu przygotowania barwnika eozynowo-nigrozynowego mieszano 4,0% roztwór eozyny w 2,9% cytrynianie sodu z 8,0% roztworem nigrozyny w 2,9% cytrynianie sodu w stosunku 1:3, zgodnie z wcześniej stosowanym schematem [82].

##### **Przygotowanie preparatów do oceny odsetka plemników żywych i martwych**

Do oceny odsetka plemników żywych i martwych wykorzystywano przygotowany wcześniej barwnik eozynowo - nigrozynowy [82]. Na ogrzane wcześniej szkiełko podstawowe nakrapiano 10  $\mu$ l próby rozrzedzonej w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris (w zależności od subiektywnej oceny gęstości w stosunku od 1:1 do 1:8) oraz 10  $\mu$ l barwnika eozynowo-nigrozynowego. Łączono obie krople końcówką pipety, a następnie wykonywano rozmaz. Gotowe preparaty ponownie umieszczano na stoliku grzewczym i pozostawiano do wyschnięcia.

## Ocena preparatów eozynowo-nigrozynowych

Wykonane rozmazy analizowano za pomocą mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse E200 (powiększenie 1000x) z wykorzystaniem imersji. W każdym preparacie oceniano 200 plemników. Eozyna niebieska, w przypadku przerwania ciągłości błony komórkowej, wnikała do wnętrza plemników zabarwiając je na różowo. Plemniki o główkach zabarwionych na różowo uznawano za martwe. Gamety, które pozostały niezabarwione, klasyfikowano jako żywe (rycina 2). Wynik przedstawiano jako odsetek plemników żywych.



Rycina 2. Ocena odsetka żywych i martwych plemników przy użyciu barwnika eozynowo-nigrozynowego. A – niezabarwione, żywe plemniki; B – zabarwione, martwe plemniki

## Ocena morfologii plemników

Morfologia plemników była oceniana podczas realizacji każdego z zadań badawczych.

## Przygotowanie preparatów do barwienia

W celu oceny morfologii pozyskanych plemników, wykonywano rozmazy z 10 µl rozrzedzonej w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris próby (w zależności od subiektywnej, wizualnej oceny gęstości w stosunku od 1:1 do 1:8). Po wykonaniu rozmazów preparaty pozostawiano do wyschnięcia na 24 h.

Odczynniki przygotowywano zgodnie z protokołem opisanym przez Watsona i wsp. 1975 [121].

### **Przygotowanie utrwalacza:**

Roztwór 1.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 21,682 g dopełniano wodą destylowaną do 500 ml.

Roztwór 2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 22,254 g dopełniano wodą destylowaną do 500 ml.

Roztwór A: mieszano 200 ml roztworu 1. i 80 ml roztworu 2.

Roztwór B: 9,01 g  $\text{NaCl}$  dopełniano wodą destylowaną do 500 ml.

Roztwór C: formalina 40%.

Pożądaný utrwalacz otrzymywano poprzez zmieszanie 100 ml roztworu A, 150 ml roztworu B, 62,5 ml roztworu C i dopełnienie do 500 ml wodą destylowaną.

### **Przygotowanie Buforu Sorensena**

Roztwór 1.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  – 23,89 g dopełniano wodą destylowaną do 1000 ml.

Roztwór 2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 22,254 g dopełniano wodą destylowaną do 1000 ml i gotowano 30 minut w celu usunięcia  $\text{CO}_2$ .

Aby uzyskać końcowy roztwór mieszano 6,12 ml roztworu 1. i 3,88 ml roztworu 2. - pH 7,0.

Przygotowanie zbuforowanego roztworu Giemsy:

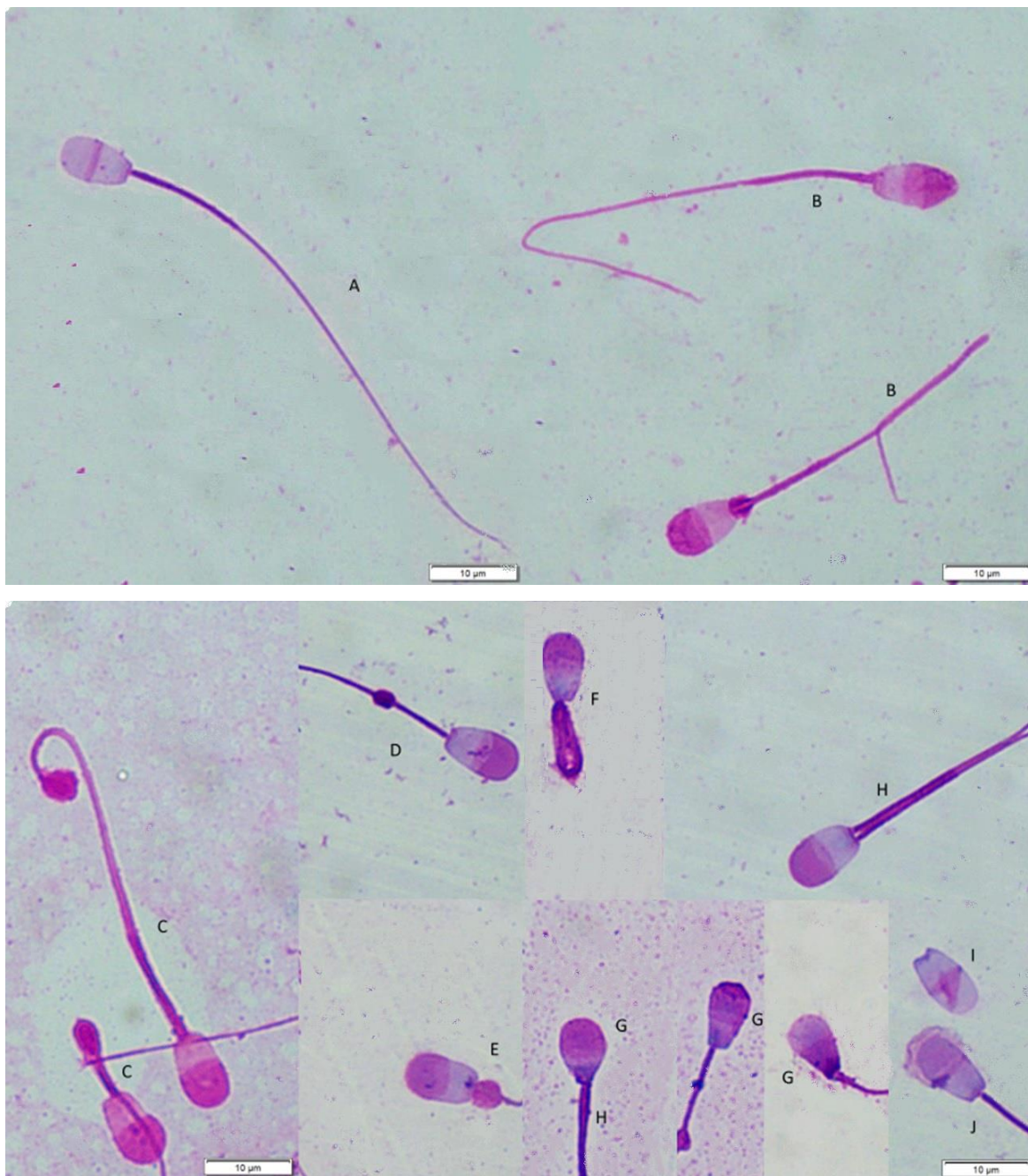
W celu przygotowania zbuforowanego roztworu Giemsy mieszano 3 ml odczynnik Giemsy z 2 ml buforu Sorensena i 30 ml wody destylowanej.

### **Barwienie plemników metodą Watsona**

Po wyschnięciu preparatów umieszczono je we wcześniej przygotowanym utrwalaczu na 15 minut. Po utrwaleniu, płukano je pod bieżącą wodą przez 15 sekund. Następnie suszono przez 20 minut. Po wysuszeniu preparaty umieszczano w szklanych pojemnikach wypełnionych barwnikiem i pozostawiano na 90 minut. Po upływie tego czasu, preparaty płukano wodą destylowaną przez 10 sekund.

### **Ocena morfologii plemników**

Po osuszeniu wybarwione preparaty oceniano za pomocą mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse E200 (powiększenie 1000x) z wykorzystaniem imersji. W każdym preparacie oceniano morfologię 200 plemników. Obliczano odsetek plemników wykazujących zarówno wady pierwotne, jak i wtórne [8]. Zaobserwowane wady zostały przedstawione na rycinie 3.

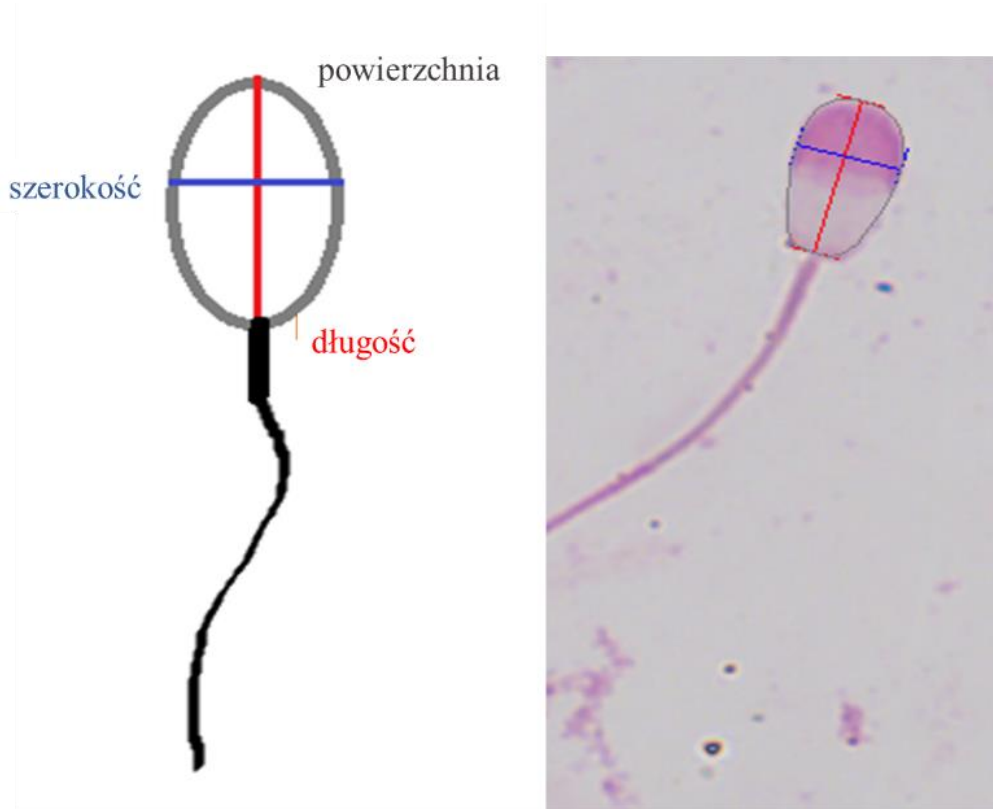


Rycina 3. Zaobserwowane wady morfologiczne plemników najądrzowych żubra, wybarwionych metodą Watsona. A – prawidłowy plemnik żubra, B – zagięcie witki, C – pętla witki, D – kropla protoplazmatyczna w położeniu dalszym, E- kropla protoplazmatyczna w położeniu bliższym, F – wada Daga, G – nieprawidłowy kształt główki, H – wada wstawki, I – luźna główka, J – wady akrosomu

### 5.2.3.2.3. Morfometria główek plemników

Pomiary morfometryczne zostały wykonane podczas realizacji pierwszego zadania badawczego. Morfometrię główek plemników opisano przy użyciu oprogramowania cellSens Dimension Software (Olympus Europa SE & Co. KG).

Długość, szerokość oraz powierzchnię główki mierzone ręcznie na zdjęciach rozmazów barwionych metodą Watsona [121]. Sposób wykonywania pomiarów przedstawiono na rycinie 4. Do pomiarów morfometrycznych wybierano preparaty o najlepszej jakości. Łącznie oceniono 1200 plemników najądrzowych żubra.



Rycina 4. Pomiar morfometryczny główek plemników najądrzowych żubra

#### 5.2.3.2.4. Komputerowo wspomagana Analiza Nasienia (CASA)

Szczegółowa analiza ruchu plemników za pomocą systemu CASA została wykorzystana do oceny ruchu plemników rozmrożonych – w zadaniach III i IV. W zależności od ocenianej subiektywnie gęstości, przed analizą za pomocą systemu CASA, badane próby były rozrzedzane za pomocą rozrzedzalnika opartego na buforze Tris w stosunku od 1:1 do 1:8.

Wspomagana komputerowo analizę ruchu plemników wykonywano za pomocą urządzenia HTM IVOS ver. 12.2 (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) z wykorzystaniem optyki kontrastowo-fazowej w powiększeniu 1,89 x 10 oraz oprogramowania Animal Motility (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). Wykorzystano parametry opracowane do oceny nasienia pozyskanego od samców bydła domowego. Poszczególne ustawienia zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Ustawienia dla poszczególnych parametrów jakimi oceniano plemniki najądrzowe żubra w programie Animal Motility (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA)

Parametr	Ustawienia
Częstotliwość odświeżania obrazu	60 Hz
Liczba analizowanych obrazów	30
Minimalna wielkość główki plemnika	5 pikseli
Minimalny kontrast analizowanych obiektów	80
Minimalna szybkość plemników o ruchu postępowym	50 $\mu\text{m/s}$
Minimalna prostoliniowość plemników o ruchu postępowym	70 %
Wartość graniczna plemników o ruchu wolnym	30 $\mu\text{m/s}$
Wartość graniczna plemników o ruchu wolnym	15 $\mu\text{m/s}$

Oceniane szczegółowe parametry ruchu plemników zostały wyszczególnione w tabeli 3.

Tabela 3. Szczegółowe parametry ruchu plemników oceniane za pomocą programu Animal Motility (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA)

Parametr	skrót	jednostka
Odsetek plemników ruchliwych	MOT	%
Odsetek plemników charakteryzujących się ruchem postępowym	PMOT	%
Średnia prędkość plemnika po rzeczywistej ścieżce ruchu	VCL	$\mu\text{m/s}$
Średnia prędkość plemnika po przybliżonej ścieżce ruchu	VAP	$\mu\text{m/s}$
Średnia prędkość plemnika wzdłuż linii prostej wyznaczonej między początkowym a końcowym położeniem gamety	VSL	$\mu\text{m/s}$
Liniiowość ruchu plemnika	LIN	%
Prostoliniowość ruchu plemnika	STR	%
Amplituda bocznych odchyłeń główki	ALH	$\mu\text{m}$
Częstotliwość bocznych odchyłeń główki plemnika	BCF	Hz
Odsetek plemników szybkich	RAPID_PCT	%
Odsetek plemników o umiarkowanej szybkości ruchu	MEDIUM_PCT	%
Odsetek plemników statycznych	STATIC_PCT	%

#### **5.2.3.2.5. Ocena cech strukturalno-funkcjonalnych plemników najądrzowych żubra za pomocą barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej**

Badanie z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych oraz cytometrii przepływowej prowadzono w każdym zadaniu badawczym oceniając zarówno plemniki przed, jak i po poddaniu ich procesowi kriokonserwacji.

Z powodu różnych odległości pomiędzy miejscami pozyskiwania materiału a laboratorium, optymalny czas na ocenę plemników przed procesem kriokonserwacji wyznaczono na 24 godziny po pobraniu.

Wszystkie testy przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego Guava EasyCyte 5 (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy) za pomocą oprogramowania GuavaSoft™ 3.1.1 (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy). Sondy fluorescencyjne były wzbudzone przez laser argonowy o długości fali 488 nm. Zdarzenia niebędące plemnikami były odrzucane na podstawie wielkości oraz granularności i nie były analizowane.

Dla każdej z prób przeanalizowano 10 000 zdarzeń. Wszystkie wykorzystane barwniki fluorescencyjne zostały zakupione od Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA.

Wszystkie barwienia i analizy przeprowadzono zgodnie z protokołami stosowanym rutynowo w laboratorium Katedry Rozrodu UPWr, opisanymi wcześniej dla innych gatunków zwierząt [83,92,97].

Ocenię podlegały następujące cechy plemników: integralność błony komórkowej, integralność akrosomu, potencjał mitochondrialny, peroksydacja lipidów oraz status chromatyny.

#### **Przygotowywanie próbek do barwienia fluorescencyjnego**

Każdorazowo do wykonania powyższych testów wykorzystywano  $40 \times 10^6$  plemników zawieszonych w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris.

#### **Ocena ciągłości błony komórkowej**

Ciągłość błony komórkowej oceniano za pomocą podwójnego znakowania fluorescencyjnego, zgodnie z wcześniej opisanym protokołem. 300  $\mu\text{L}$  rozcieńczonej próbki wybarwiano z wykorzystaniem 5  $\mu\text{L}$  roztworu roboczego barwnika SYBR-14

(0,1  $\mu$ L SYBR14 + 4,9  $\mu$ L rozrzedzalnika na bazie buforu TRIS) i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 3  $\mu$ L 1,4 mM jodku propidyny (PI). Po 3 minutach inkubacji, analizowano próbki. Populacje wykazujące ujemny wynik pod względem barwienia jodkiem propidyny, a dodatni w barwieniu SYBR-14, wykazywały zieloną fluorescencję. Znajdujące się w nich plemniki były uznawane jako żywe z niezaburzoną ciągłością błony komórkowej. Czerwona fluorescencja charakteryzowała populację plemników martwych. Plemniki emitujące czerwono – zieloną fluorescencję uznawano za zamierające [97].

### **Ocena ciągłości błon akrosomów**

Ciągłość błon akrosomów badanych plemników oceniano przy pomocy barwnika Lektyna (PNA) (Arachis hypogaea Alexa Fluor® 488 conjugate). Rozrzedzone próby mieszano z 10  $\mu$ L roztworu roboczego PNA (1  $\mu$ g/mL), a następnie inkubowano w ciemni przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie czasu inkubacji, próby wirowano przez 3 minut z prędkością (500 x g). Oddzielano supernatant, a zgromadzone na dnie plemniki zawieszano w 500  $\mu$ L rozrzedzalnika na bazie buforu Tris. Następnie dodawano 3  $\mu$ L PI. Po 5-minutowej inkubacji analizowano próby. Plemniki ujemne zarówno wobec lektyny, jak i jodku propidyny klasyfikowano jako żywe z nienaruszonym akrosomem [40].

### **Ocena potencjału błon mitochondrialnych**

Do oceny aktywności błon mitochondrialnych badanych plemników wykorzystywano połączenie barwnika JC-1 (3 mM roztwór JC-1 w DMSO) i jodku propidyny. Do 500  $\mu$ L zawiesiny plemników dodawano 0,67  $\mu$ L roztworu podstawowego JC-1. Próby inkubowano w temperaturze 37°C w ciemności przez 20 minut. Następnie dodawano 3  $\mu$ L PI po 3 minutach inkubacji wykonywano analizę w cytometrze przepływowym. Plemniki emitujące pomarańczową fluorescencję klasyfikowano jako posiadające wysoki potencjał błony mitochondrialnej (HMMP). Natomiast plemniki emitujące zieloną fluorescencję oceniano jako charakteryzujące się niskim potencjałem błon mitochondrialnych [41].

### **Ocena peroksydacji lipidów**

Peroksydację lipidów (LPO) oceniano z wykorzystaniem fluorescencyjnej sondy C11-BODIPY581/591. Do rozcieńczonych prób dodawano 1  $\mu$ L 2 mM roztworu



C11-BODIPY581/591 w etanolu i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C w ciemności. Po inkubacji, próby wirowano przez 3 minuty z prędkością 500 x g. Po usunięciu supernatantu znajdujące się na dnie plemniki zawieszano w 500 µL rozcieńczalnika na bazie buforu Tris. W celu oceny żywotności plemników dodawano 3 µL jodku propidyny. Po 3 minutach inkubacji przeprowadzano analizę w cytometrze przepływowym. Plemniki, które pozostały niezabarwione, klasyfikowano jako żywą populację, niewykazującą peroksydacji lipidów [81].

### **Ocena statusu chromatyny – Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)**

Strukturę chromatyny oceniano za pomocą barwienia oranżem akrydyny (AO) według wcześniej opisanego protokołu SCSA (z ang. Sperm Chromatin Structure Assay). 100 µL próby poddawano krótkiej denaturacji kwasem poprzez dodawanie 200 µL roztworu lizującego (Triton X-100 0,1% (v/v), NaCl 0,15 M i HCl 0,08 M, pH = 1,4). Po 30 s dodawano 600 µL roztworu oranżu akrydyny (AO) [6 µg AO/mL bufor: kwas cytrynowy (0,1 M), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2 M), EDTA (1 mM), NaCl (0,15 M), pH 6]. Po 3 minutach inkubacji, próby analizowano w cytometrze przepływowym. Populacja plemników z prawidłową dwuniciową konfiguracją DNA wykazywała zieloną fluorescencję. Gamety emitujące czerwoną fluorescencję klasyfikowano jako te ze zdenaturowanym DNA [30].

### **5.2.4. Selekcja plemników najądrzowych żubra za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll®**

#### **Przygotowanie roztworów Percoll® 90% i 45%**

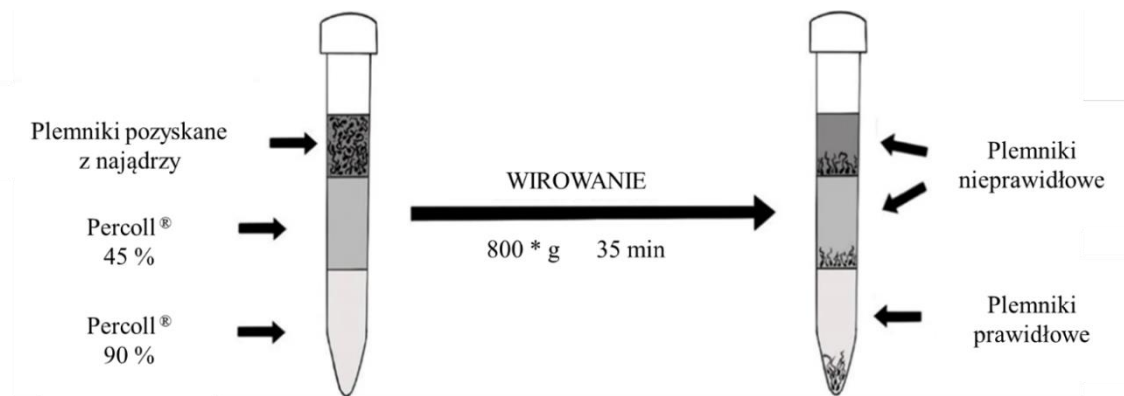
Roztwory Percoll® (45 i 90%) sporządzano zgodnie z opisem Lee et al. (2009) [62]. W celu otrzymania 90% roztwór Percoll® mieszano podstawowy izotonicznym roztwór Percoll® (Isotonic Percoll® Solution (SIP)) z komercyjnym medium HTF (z ang. Human Tubal Fluid) w proporcji 9:1. Roztwór 45% Percoll® przygotowywano poprzez zmieszanie 90% roztworu Percoll® z HTF w równej objętości.

#### **Przygotowanie prób do wirowania w gradiencie gęstości Percoll®**

W celu przygotowania prób do selekcji, na dno falkonów nakładano 2 ml warstwę Percoll® 90%, a na nią 2 ml roztworu Percoll® 45%. Następnie delikatnie nakrapiano 2 ml rozrzedzalnika zawierającego pozyskane plemniki.

## Wirowanie w gradiencie gęstości Percoll®

Przygotowane w wyżej opisany sposób próby wirowano przez 35 minut z prędkością  $800 \times g$ . Następnie usuwano supernatant, a odwirowane plemniki ponownie zawieszano w 1ml HTF i wirowano z prędkością  $800 \times g$  przez 5 minut. Po etapie selekcji, ponownie oceniano koncentrację plemników w otrzymanych próbach. Następnie wyselekcjonowane plemniki rozrzedzano do koncentracji  $200 \times 10^6$  komórek/ml i poddawano mrożeniu według poniżej opisanego protokołu z wykorzystaniem rozrzedzalnika na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu. Na rycinie 5 przedstawiono schemat selekcji plemników za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll®.



Rycina 5. Wirowanie plemników w gradiencie gęstości Percoll®

### 5.2.5. Mrożenie plemników najądrzowych żubra

#### 5.2.5.1. Rozrzedzalniki wykorzystane do mrożenia plemników żubra.

W zależności od etapu badań, plemniki mrożono z wykorzystaniem różnych rozrzedzalników. W tabeli 4 scharakteryzowano rozrzedzalniki wykorzystane w poszczególnych etapach badań.

Tabela 4. Charakterystyka rozrzedzalników wykorzystanych w procesie kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra

Wykorzystany rozrzedzalnik	Skład rozrzedzalnika	Zadanie badawcze
Na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu	(Tris (2,4 g), kwas cytrynowy (1,4 g), glukoza (0,8 g), żółtko jaja kurzego (20% v/v), penicylina (5000 j.m.), streptomycyna (100 mg), woda destylowana do 100 ml	II, III, IV
AndroMed <sup>®</sup> CSS, One-step200 ml, (Minitube GMBH) (Komercyjny rozrzedzalnik przeznaczony do mrożenia nasienia bydła domowego).	fosfolipidy, TRIS, kwas cytrynowy, cukry, przeciwutleniacze, bufony, glicerol i ultra czysta woda, tylozyna, gentamycyna, spektynomycyna, linkomycyna).	IV

#### 5.2.5.2. Protokoły mrożenia plemników najądrzowych żubra

##### Mrożenie plemników w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris

Po wstępnej analizie, w temperaturze pokojowej, próbki zawierające plemniki rozrzedzano rozrzedzalnikiem na bazie buforu Tris do uzyskania stężenia  $200 \times 10^6$  komórek/ml. Następnie próby umieszczano w łaźni wodnej i wkładano do lodówki do temperatury 5°C. Po schłodzeniu, rozrzedzano je ponownie schłodzonym rozrzedzalnikiem do końcowego stężenia  $160 \times 10^6$  komórek/ml. Schłodzony rozrzedzalnik wzbogacany był o glicerol w ilości 6% końcowej objętości. Rozrzedzone próby poddawano 90 minutowej ekwilibracji. Następnie przygotowanymi plemnikami napełniano słomki francuskie o pojemności 0,25 ml (Minitube GMBH) ( $40 \times 10^6$  plemników na słomkę). Wolne końce słomek zamykano alkoholem poliwinylowym (PVA). Przygotowane w ten sposób słomki poddawano mrożeniu w statycznych parach azotu w kontrolowanej temperaturze -120°C przez 15 minut. Następnie zanurzano je w ciekłym azocie i umieszczano w kontenerach do przechowywania.

## **Mrożenie plemników w komercyjnym rozrzedzalniku przeznaczonym dla nasienia bydła domowego – Andromed®**

Plemniki przeznaczone do mrożenia w komercyjnym rozrzedzalniku Andromed®, zostały kriokonserwowane według wcześniej opisanego protokołu przez Krishnakumar i wsp. [60]. Próby zawierające plemniki rozrzedzano w temperaturze pokojowej w Andromed® przygotowanym wcześniej według zaleceń producenta, do końcowej koncentracji  $160 \times 10^6$  plemników/ml. Następnie rozrzedzanymi próbami napełniano słomki francuskie o pojemności 0,25 ml. Wolny koniec słomki zamykano alkoholem poliwinylowym. Przygotowane w ten sposób słomki umieszczano w lodówce na 4 h w celu powolnego schłodzenia do 4°C. Schłodzone słomki, po wyjęciu z lodówki, umieszczano w statycznych parach azotu w kontrolowanej temperaturze -120°C. Po upływie 15 minut, słomki zanurzano w ciekłym azocie, a następnie umieszczano w kontenerze do przechowywania.

### **5.2.6. Rozmrażanie plemników**

Słomki wyjmowano pojedynczo ze zbiornika z ciekłym azotem i umieszczano na 30 sekund w łaźni wodnej (37°C).

### **5.2.7. Porozmrożeniowa ocena plemników najądrzowych żubra**

Po rozmrożeniu plemniki poddawano ocenie: ruchliwości, morfologii, odsetka plemników żywych oraz cech funkcjonalno-strukturalnych, według protokołów opisanych powyżej.

### **5.2.8. Adaptacja testu wiązania z osłonką przejrzystą oocytu do oceny mrożonych/rozmrożonych plemników najądrzowych żubra**

Zdolność mrożonych/rozmrożonych plemników najądrzowych żubra do wiązania z osłonką przejrzystą oocytu została poddana ocenie z wykorzystaniem heterologicznych oocytów pozyskanych z mrożonych/rozmrożonych jajników bydłowych. Test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu został przeprowadzony według protokołu opisanego przez Wheeler i wsp. (1987) [122].

Kontrolę w przeprowadzonym teście ZBA stanowiło komercyjnie mrożone nasienie buhaja o potwierdzonej płodności.

## Wykorzystane odczynniki

Tabela 5. Lista oraz skład poszczególnych rozrzedzalników wykorzystanych w teście ZBA

PBS/PVA		
Składniki	Stężenie	Ilość
PBS	-	dopełniono do 500 ml
PVA	0,1 %	0,5 g
Antybiotyki (50 000 IU/ml Penicyliny G + 25 mg/ml Streptomycyny)	-	1,5 ml
TALP – Tyrode’s – albumin-lactate-pyruvate		
Składniki	Stężenie	ilość na 1 litr
Wodorowęglan sodu	25 mM	1,1003 g/l
BSA	3 mg/ml	3 g
Czerwień fenolowa	10 µg/ml	0,01 g
Penicylina G Na	100 IU/ml = 60 µg/ml	0,06 g
Sól sodowa kwasu mlekowego	9 mM	1,27341 ml
Pirogronian sodu	0,09 mM	0,0099036 g
Glukoza	4,5 mM	W roztworze Tyrode’a
Roztwór Tyrode’a	-	Dopełnić do 1 l
PHE		
	Stężenie	ilość na 1 litr
Epinefryna	25 µM	0,00458 g
Hipotauryna	250 µM	0,0272875 g
D – penicylamina	500 µM	0,074605 g
Pirosiarczan sodu	500 µM	0,05203 g
Sól sodowa kwasu mlekowego	3 mM	424,469697 µl
Roztwór soli fizjologicznej	-	Dopełnić do 1 l
TALP + PHE		
4 µl PHE w 100 µl TALP		

## **Izolacja i przygotowanie oocytów**

Jajniki bydła po pozyskaniu z ubojni przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i wyjmowano z zamrażarki na 12 godzin przed planowanym pobraniem oocytów.

Rozmrożone jajniki umieszczano na płytkach Petriego zawierających medium PBS/PVA i nacinano ostrzem chirurgicznym w celu uwolnienia oocytów. Do eksperymentu wybierano jedynie oocyty z nienaruszoną osłonką przejrzystą. Wyselekcjonowane komórki jajowe przekładano szklaną pipetą do czterodołkowej szalki zawierającej rozrzedzalnik PBS/PVA. Za pomocą pipety automatycznej o pojemności  $200\ \mu\text{L}$  usuwano komórki wieńca promienistego. Przygotowane w ten sposób oocyty dwukrotnie płukano w zmodyfikowanym medium (TALP) [6]. Następnie umieszczano je w  $50\ \mu\text{L}$  kroplach TALP + PHE [63] pod olejem parafinowym (10 oocytów/kropla) w inkubatorze ( $38,5^{\circ}\text{C}$  w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ , 100% wilgotności względnej).

## **Przygotowanie plemników do testu wiązania z osłonką przejrzystą oocytu**

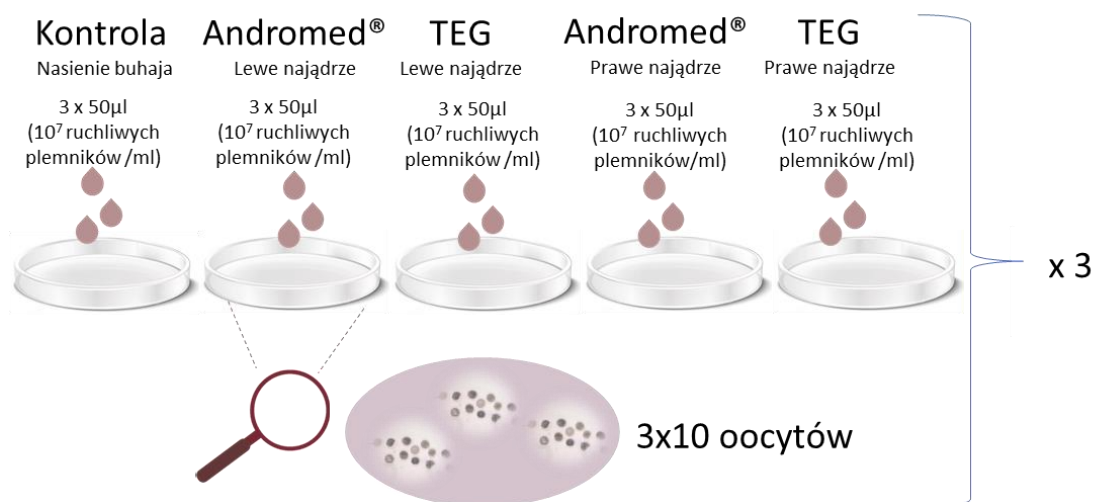
Rozmrożone, w sposób opisany powyżej, plemniki wirowano przy 500 g przez 3 minuty. Zgromadzone na dnie plemniki ponownie zawieszono w TALP+PHE. Ruchliwość subiektywna oraz koncentracja były oceniane w celu ustalenia końcowego rozrzedzenia niezbędnego do uzyskania finalnej koncentracji  $10^7$  plemników ruchliwych/ml.

## **Test wiązania plemników z osłonką przejrzystą oocytu**

Do każdej kropli zawierającej oocyty dodawano  $50\ \mu\text{L}$  przygotowanego nasienia. Oocyty inkubowano z plemnikami przez 3 godziny w temperaturze  $38,5^{\circ}\text{C}$  w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  (wilgotność względna 100%).

Test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu został przeprowadzony w trzech powtórzeniach. Dla każdego powtórzenia rozmrażano po jednej słomce z każdego najądźra i rozrzedzalnika. Jedna słomka komercyjnie zamrożonego nasienia buhaja została rozmrożona w celu utworzenia grupy kontrolnej.

Schemat eksperymentu przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Schemat przeprowadzonego testu wiązania mrożonych/rozrożonych plemników najądrzowych żubra z osłonką przejrzystą oocytu (ZBA)

### Utrwalanie oocytów i ich barwienie

Po zakończeniu inkubacji, kompleksy plemniki-oocyt wielokrotnie pipetowano w celu usunięcia luźno związanych plemników. Następnie kompleksy te utrwalano w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego w PBS przez 10 minut [32]. Po utrwaleniu, kompleksy plemniki-oocyt umieszczano w PBS/PVA i przechowywano w lodówce do następnego dnia.

W celu ustalenia liczby związanych oocytem plemników, kompleksy plemniki-oocyt poddawano barwieniu bis-benzimidem (Hoechst 33342). Na szkiełku podstawowym umieszczano dwie krople zawierające 5 kompleksów plemniki-oocyt. Do każdej z kropli dodawano 10 µl roztworu roboczego Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich/Merck) (0,01 mg/ml) i pozostawiano w ciemności na 5 minut.

Po inkubacji usuwano rozrzedzalnik ze szkiełek. Następnie, do wybarwianych kompleksów, dodawano 5 µl roztworu zapobiegającego blaknięciu (Fluoromount™, Sigma-Aldrich/Merck). Po 2 minutach kompleksy przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i uszczelniano silikonem.

Liczbę plemników związanych z każdym oocytem zliczano pod mikroskopem fluorescencyjnym Zeiss Axiovert (400 x).

### 5.2.9. Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania R - Studio [104].

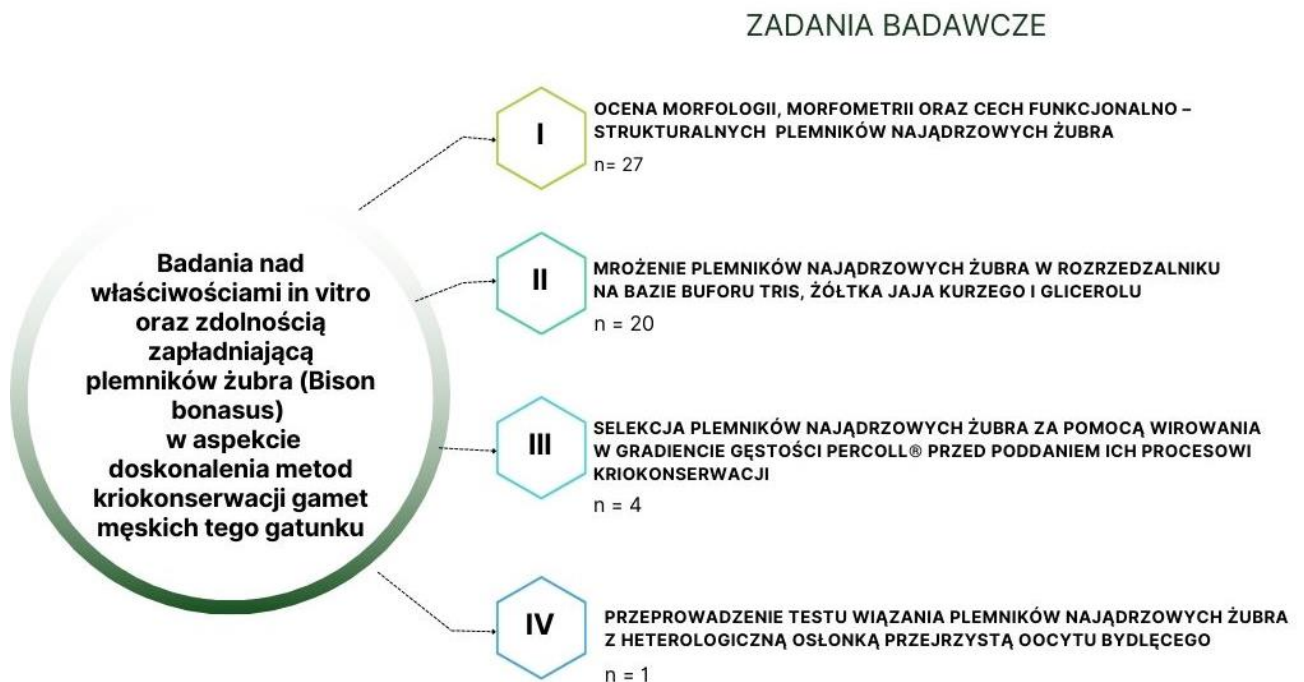
Do oceny zgodności rozkładu danych z rozkładem normalnym wykorzystano test Shapiro-Wilka. W stosownych przypadkach do oceny różnic między grupami zastosowano testy parametryczne (test t-Studenta i ANOVA) lub testy nieparametryczne (U Manna-Whitneya, sumy rang Wilcoxon i Kruskala-Wallis).

Do oceny korelacji między miesiącem pobrania materiału a parametrami nasienia wykorzystano współczynnik korelacji Spearmana. Jako miesiąc nr 1 przyjęto wrzesień, uważany za koniec sezonu rozrodczego u żubrów. Za pomocą tego współczynnika oceniono również korelacje pomiędzy wiekiem zwierzęcia a jakością pozyskanych plemników. Istotność współczynnika korelacji Spearmana oceniono testem t.

Do oceny istotności statystycznej różnic w wynikach między replikami testu ZBA zastosowano asymptotyczny test równości współczynników zmienności.

Różnice uznawano za istotne przy  $p \leq 0,05$ .

### 5.3. Schemat doświadczenia





## 6. WYNIKI

### 6.1. Zadanie badawcze 1. Ocena morfologii, morfometrii oraz cech funkcjonalno-strukturalnych plemników najądrzowych żubra

Wyniki otrzymane podczas realizacji tego zadania zostały przedstawione w publikacji stanowiącej **załącznik 1** do niniejszego manuskryptu.

#### 6.1.1. Podstawowa ocena plemników

Wyniki oceny: całkowitej liczby plemników, ruchliwości subiektywnej, odsetka plemników żywych oraz odsetka plemników o prawidłowej morfologii zostały przedstawione w tabeli 6.

Tabela 6. Charakterystyka plemników najądrzowych żubra pozyskanych *post mortem*, n=27

	Całkowita liczba plemników [x10 <sup>6</sup> ]	Ruchliwość subiektywna [%]	Żywotność [%]	Prawidłowa morfologia [%]
Min.	62,5	0,5	32,5	10,5
Max.	7452	70,0	90,0	83,3
Mediana	1985	40,0	69,8	54,3
Pierwszy kwartyl	605,1	10	61	38,5
Trzeci kwartyl	2748	55	81,3	67,5

#### 6.1.2. Morfometria główek plemników żubra

Wyniki pomiarów długości, szerokości oraz pola powierzchni główek plemników najądrzowych żubra zostały przedstawione w tabeli 7.

Tabela 7. Pomiary morfometryczne główek plemników najądrzowych żubra – długość, szerokość, pole powierzchni, n=1200 plemników

	Długość [μm]	Szerokość [μm]	Pole powierzchni [μm <sup>2</sup> ]
Średnia ± SD	8,5 ± 0,64	4,9 ± 0,5	36,3 ± 4,5
Min.	6,4	3,5	23,7
Max.	11,3	6,7	48,6
Mediana	8,5	5,0	36,9

### 6.1.3. Charakterystyka cech funkcjonalno-strukturalnych plemników najądrzowych żubra

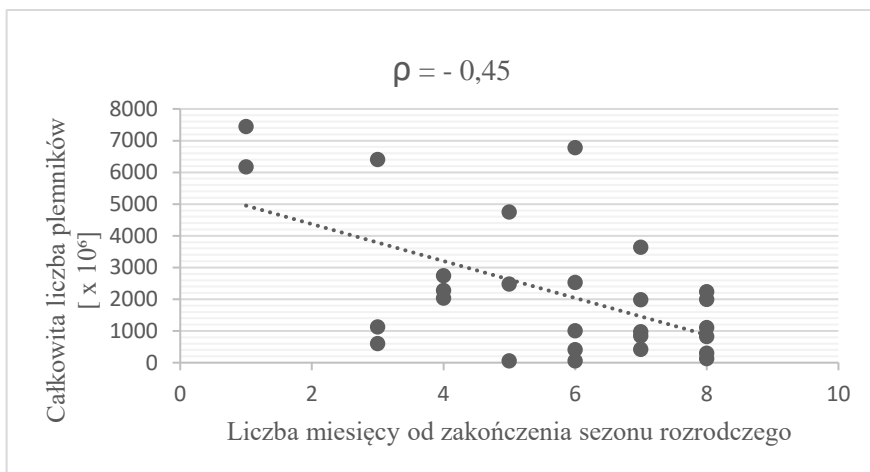
Wyniki oceny cech funkcjonalno-strukturalnych plemników najądrzowych żubra za pomocą barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływownej zostały przedstawione w tabeli 8.

Tabela 8. Funkcjonalno – strukturalna charakterystyka plemników najądrzowych żubra oceniana za pomocą barwienia fluorescencyjnego oraz cytometrii przepływownej, n=27

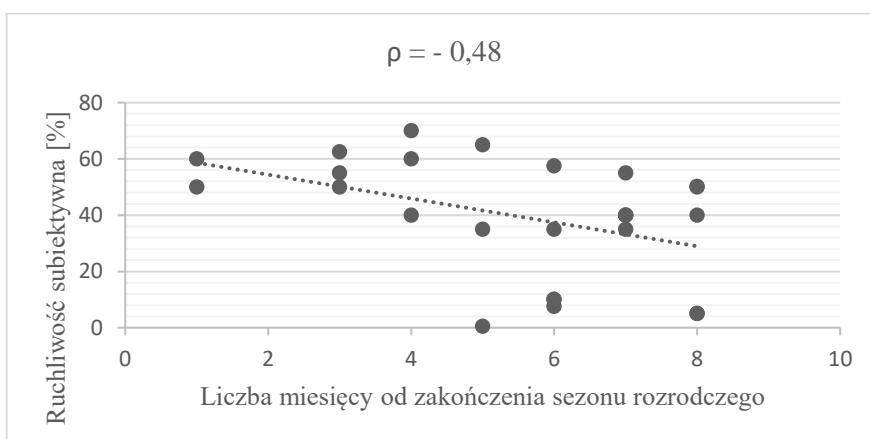
	Plemniki żywe z nienaruszoną błoną komórkową [%]	Plemniki żywe z zachowaną ciągłością akrosomu [%]	Plemniki z uszkodzoną chromatyną [%]	Plemniki żywe bez peroksydacji lipidów [%]	Plemniki żywe z wysokim potencjałem błon mitochondrialnych [%]
Minimum	4,5	26,0	0	8,3	0
Maksimum	80,3	76,6	98,7	63,7	88,8
Mediana	53,2	50,8	0,4	42,1	5,9
Pierwszy kwartyl	40,4	40,8	0,1	29,3	0,2
Trzeci kwartyk	61,4	57,9	4,1	52,0	41,6

### 6.1.4. Ocena zależności pomiędzy właściwościami plemników, a czasem który upłynął od końca sezonu oraz wiekiem badanych osobników.

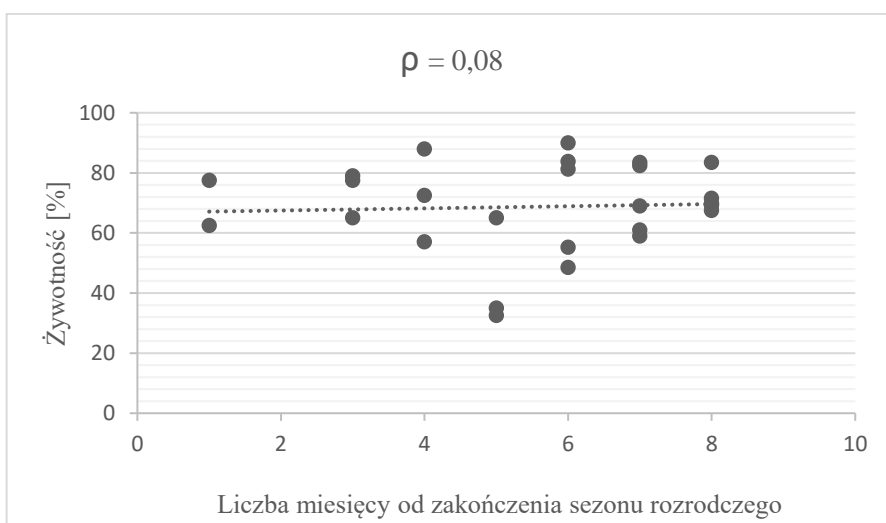
Zaobserwowano dużą zmienność międzyosobniczą związaną z miesiącem pozyskania materiału. Stwierdzono istotną, umiarkowaną, ujemną korelację dla całkowitej liczby plemników, ruchliwości oraz odsetka plemników charakteryzujących się prawidłową morfologią subiektywnej ( $p \leq 0,05$ ). W miarę oddalenia czasowego od sezonu rozrodczego, obserwowano niższe wartości całkowitej liczby plemników oraz ruchliwości subiektywnej. Nie stwierdzono podobnych zależności w przypadku pozostałych właściwości ocenianych plemników. Wyniki oceny korelacji dla poszczególnych parametrów plemników zostały przedstawione na rycinie 7 a-i.



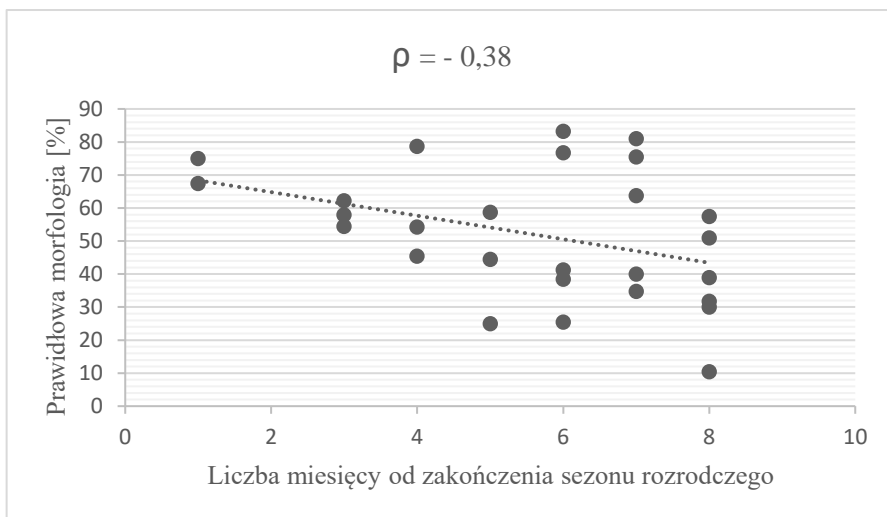
Rycina 7a. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i całkowitą liczbą pozyskanych plemników; n=27; Korelacja rangowa Spearmana;  $p < 0,05$



Rycina 7b. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i ruchliwością subiektywną plemników; n=27; Korelacja rangowa Spearmana;  $p < 0,05$



Rycina 7c. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i żywotnością plemników; n=27; Korelacja rangowa Spearmana;  $p > 0,05$



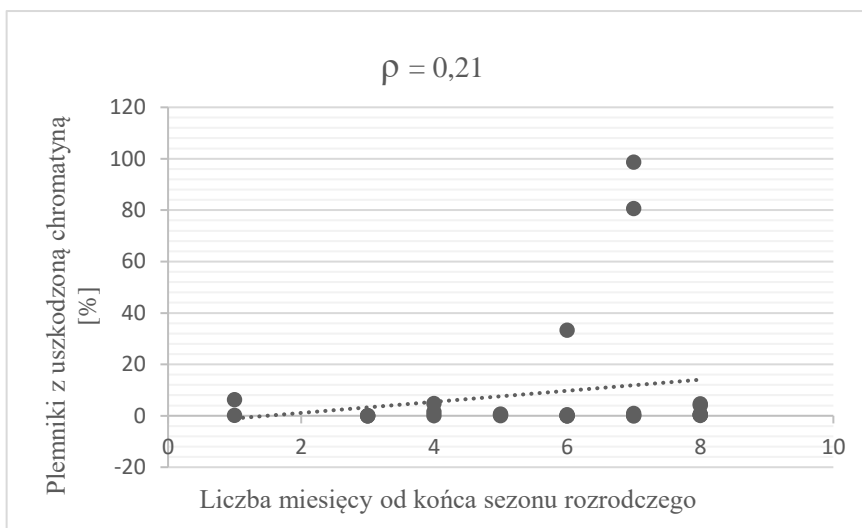
Rycina 7d. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i prawidłową morfologią plemników; n=27; Korelacja rangowa Spearmana; p=0,05



Rycina 7e. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i odstękiem plemników z nienaruszoną błoną komórkową; n = 27; Korelacja rangowa Spearmana; p>0,05



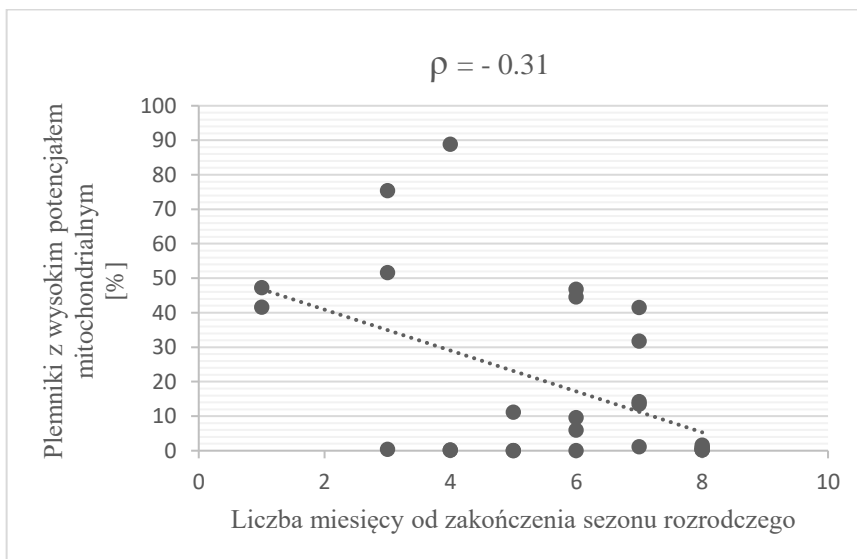
Rycina 7f. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i odsetkiem plemników z prawidłowym akrosomem; n=27; Korelacja rangowa Spearmana;  $p > 0,05$



Rycina 7g. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i odsetkiem plemników z uszkodzoną chromatyną; n = 27; Korelacja rangowa Spearmana;  $p > 0,05$



Rycina 7h. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i odsetkiem plemników bez peroksydacji lipidów; n=27; Korelacja rangowa Spearmana;  $p > 0,05$



Rycina 7i. Korelacja pomiędzy liczbą miesięcy od zakończenia sezonu rozrodczego i odsetkiem plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym; n=27; Korelacja rangowa Spearmana;  $p > 0,05$

W tabeli 9 zostały przedstawione p-wartości dla testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana między czasem, który upłynął od zakończenia sezonu rozrodczego a parametrami pozyskanych plemników.

Tabela 9. Wartości p współczynnika korelacji rang Spearmana między odległością od sezonu hodowlanego a parametrami plemników. Statystycznie istotne korelacje oznaczono gwiazdką;  $p < 0,05$

	Wartość p
Całkowita liczba plemników [ $\times 10^6$ ]	*0,02
Ruchliwość subiektywna [%]	*0,01
Żywotność [%]	0,70
Prawidłowa morfologia [%]	0,05
Plemniki żywe z nienaruszoną błoną komórkową [%]	0,54
Plemniki żywe z prawidłowym akrosomem [%]	0,60
Plemniki z uszkodzoną chromatyną [%]	0,29
Plemniki żywe bez peroksydacji lipidów [%]	0,82
Plemniki żywe z wysokim potencjałem mitochondrialnym [%]	0,11

Podobnych korelacji nie zaobserwowano pomiędzy parametrami plemników a wiekiem zwierząt (tabela 10).

Tabela 10. Wartości współczynnika  $\rho$  korelacji rang Spearmana dla wieku i poszczególnych parametrów nasienia. Nie stwierdzono istotnych korelacji;  $p > 0,05$

	Wartość $\rho$
Całkowita liczba plemników [ $\times 10^6$ ]	0,18
Ruchliwość subiektywna [%]	- 0,11
Żywotność [%]	- 0,07
Prawidłowa morfologia [%]	- 0,02
Plemniki żywe z nienaruszoną błoną komórkową [%]	0,22
Plemniki żywe z prawidłowym akrosomem [%]	0,02
Plemniki z uszkodzoną chromatyną [%]	- 0,11
Plemniki żywe bez peroksydacji lipidów [%]	0,08
Plemniki żywe z wysokim potencjałem mitochondrialnym [%]	0,16

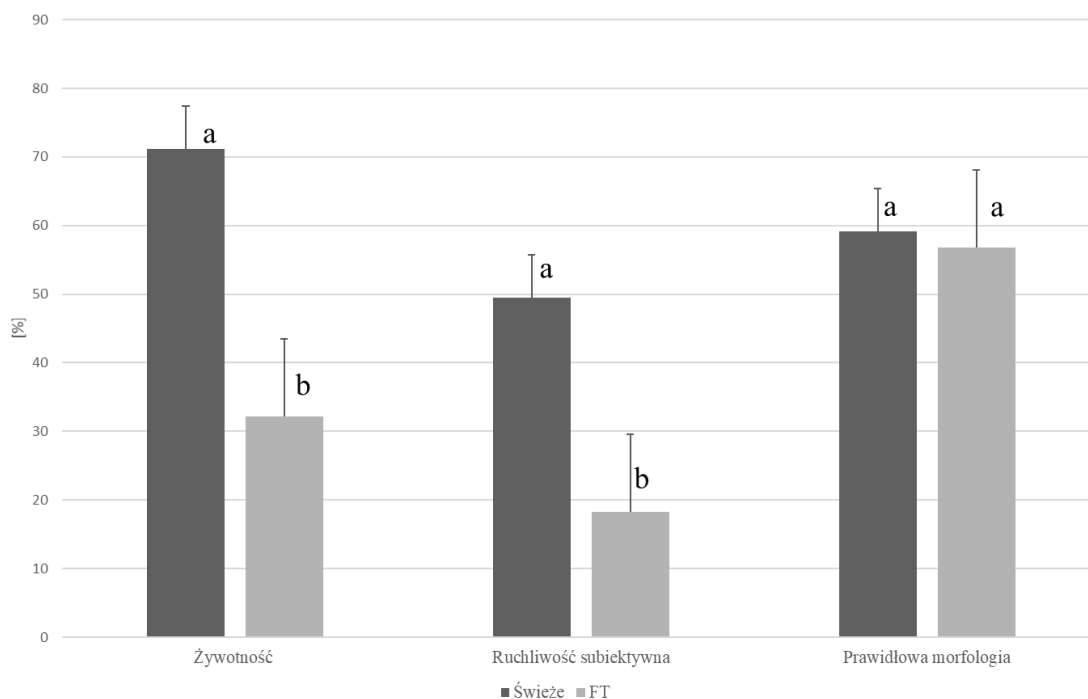
## **6.2. Zadanie badawcze 2. Mrożenie plemników najądrzowych żubra w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu**

Wyniki otrzymane podczas realizacji tego zadania zostały przedstawione w publikacji stanowiącej **załącznik 1** do niniejszego manuskryptu.

### **6.2.1. Podstawowa ocena plemników**

Kriokonserwacja istotnie obniżyła odsetek żywych i ruchliwych plemników. Proces ten nie miał wpływu na morfologię gamet. Porównanie wyników podstawowej oceny plemników z najądrzy żubra przed i po poddaniu ich procesowi mrożenia/rozmrózenia przedstawiono na rycinie 8.



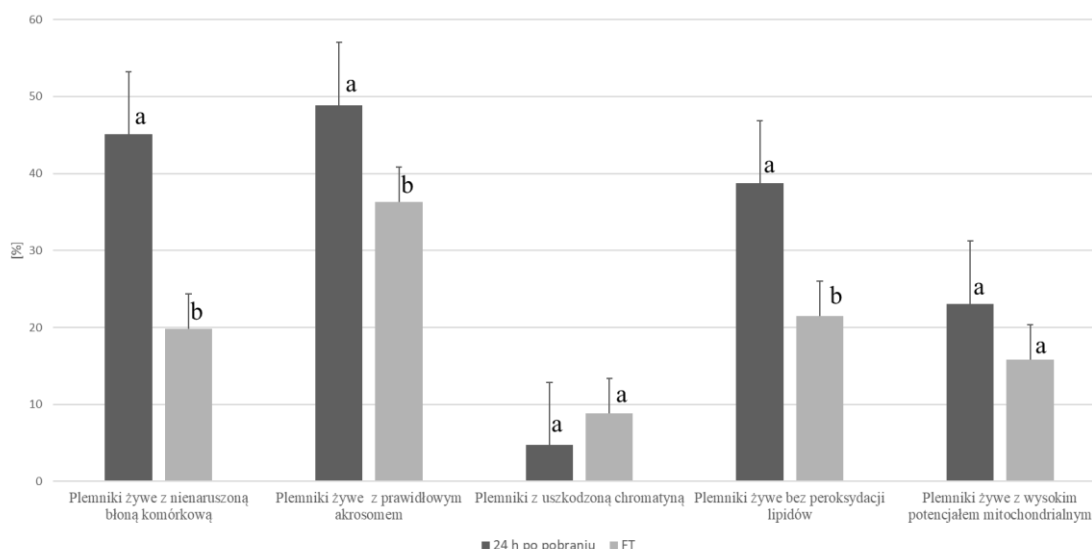


Rycina 8. Porównanie żywotności, ruchliwości i morfologii plemników przed (świeże) i po kriokonserwacji (FT), dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SE; a,b, w obrębie każdego parametru są istotnie różne; n=20; test Wilcoxon dla par obserwacji;  $p < 0,05$

### 6.2.2. Ocena efektów kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra za pomocą cytometrii przepływowej

Porównanie cech funkcjonalno – strukturalnych plemników najądrzowych żubra przed i po poddaniu ich procesowi mrożenia/rozmrózenia przedstawiono na rycinie 9.

Wśród parametrów ocenianych za pomocą barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej istotne różnice przed i po rozmrożeniu stwierdzono dla odsetka żywych plemników charakteryzujących się: nienaruszoną błoną komórkową, nienaruszonym akrosomem oraz obecnością peroksydacji lipidów ( $p < 0,05$ ). Nie stwierdzono różnic w odsetku plemników charakteryzujących się wysokim potencjałem mitochondrialnym i uszkodzoną chromatyną przed i po procesie kriokonserwacji.



Rycina 9. Porównanie cech funkcjonalnych plemników żubra 24 godziny po pobraniu i po kriokonserwacji (FT) ocenianych za pomocą cytometrii przepływowej. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SE; a,b, w obrębie każdego parametru są istotnie różne; n=20; test Wilcoxon dla par obserwacji; p<0,05

### 6.3. Zadanie badawcze 3. Selekcja plemników najądrzowych żubra za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® przed poddaniem ich procesowi kriokonserwacji

Wyniki otrzymane podczas realizacji zadania trzeciego zostały przedstawione w publikacji stanowiącej załącznik 2 do niniejszego manuskryptu.

Wirowanie w gradiencie gęstości Percoll® przyczyniło się do znacznego obniżenia całkowitej liczby plemników w próbach. Straty wahały się od 50,60% do 79,97% (tabela 11).

Tabela 11. Całkowita liczba plemników przed i po wirowaniu w gradiencie gęstości Percoll; n=4

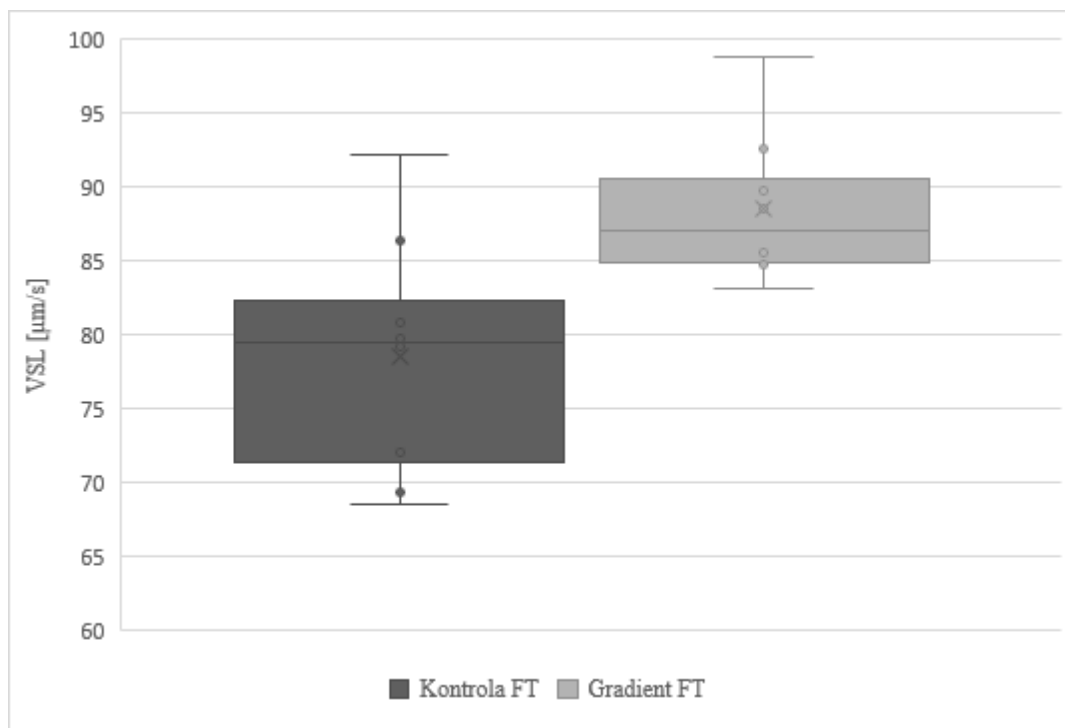
Żubr	Liczba plemników przed wirowaniem [ $\times 10^6$ ]	Liczba plemników po wirowaniu [ $\times 10^6$ ]	Straty (%)
1	454,95	224,75	50,60
2	880,00	176,25	79,97
3	1460,00	620,00	57,53
4	629,00	367,50	41,57

Zarówno w grupie poddanej wirowaniu w gradiencie gęstości Percoll®, jak i kontrolnej, odsetek plemników ruchliwych oraz żywych znacząco różnił się od wartości przed procesem kriokonserwacji. Zarówno odsetek plemników ruchliwych, jak i żywych po rozmrożeniu były istotnie wyższe w próbach poddanych wirowaniu w gradiencie gęstości Percoll® w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic w odsetku plemników charakteryzujących się prawidłową morfologią pomiędzy grupami (tabela 12).

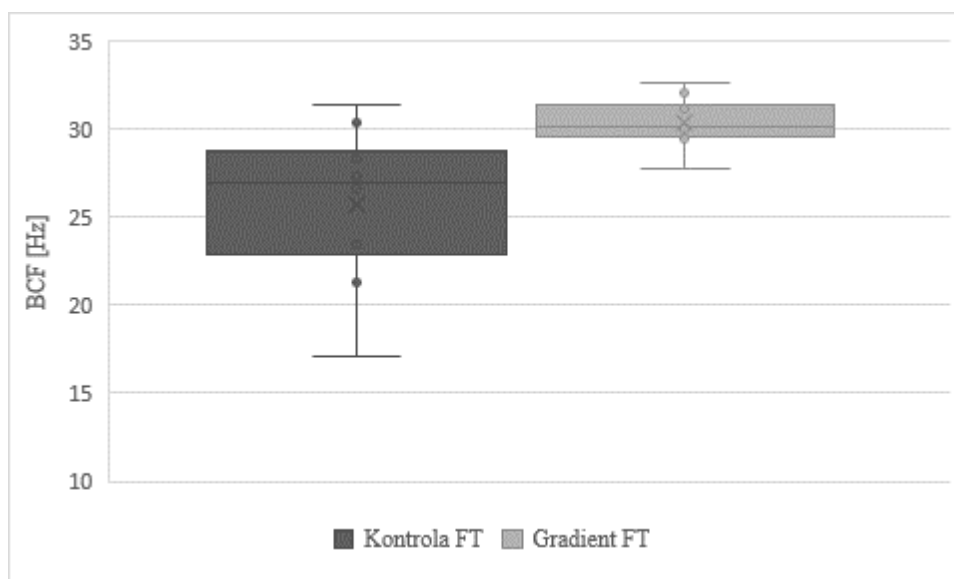
Tabela 12. Porównanie żywotności, ruchliwości subiektywnej oraz morfologii plemników najądrzowych żubra kriokonserwowanych z (Gradient FT) lub bez (Kontrola FT) poprzedzającego etapu wirowania w gradiencie gęstości Percoll®, wszystkie dane zostały przedstawione jako średnia +/- SE; n=4

	Ruchliwość subiektywna (%)	Żywotność (%)	Prawidłowa morfologia (%)
Świeże	53.75 ± 4.30 <sup>a</sup>	84.85 ± 2.12 <sup>a</sup>	74.88 ± 3.14 <sup>a</sup>
Kontrola FT	26.50 ± 5.24 <sup>b</sup>	30.38 ± 4.46 <sup>b</sup>	73.63 ± 2.82 <sup>a</sup>
Gradient FT	50.00 ± 6.05 <sup>a</sup>	53.25 ± 5.39 <sup>c</sup>	75.50 ± 3.60 <sup>a</sup>

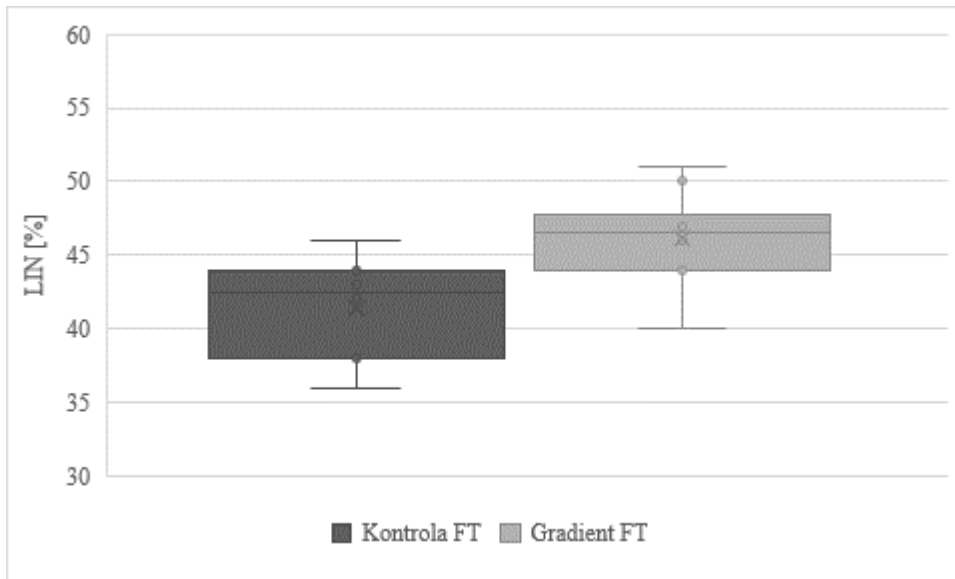
W plemnikach poddanych wirowaniu zaobserwowano wyższe w porównaniu z grupą kontrolną odsetki plemników o następujących parametrach ruchu ocenianych przy pomocy systemu CASA: VSL (p=0,015; rycina 10), BCF (p=0,025; rycina 11), LIN (p=0,007; rycina 12) oraz odsetek plemników szybkich (RAPID\_PCT) (p=0,006; rycina 13). Natomiast, odsetek plemników statycznych (STATIC\_PCT) był wyższy w grupie kontrolnej (p=0,007; rycina 14).



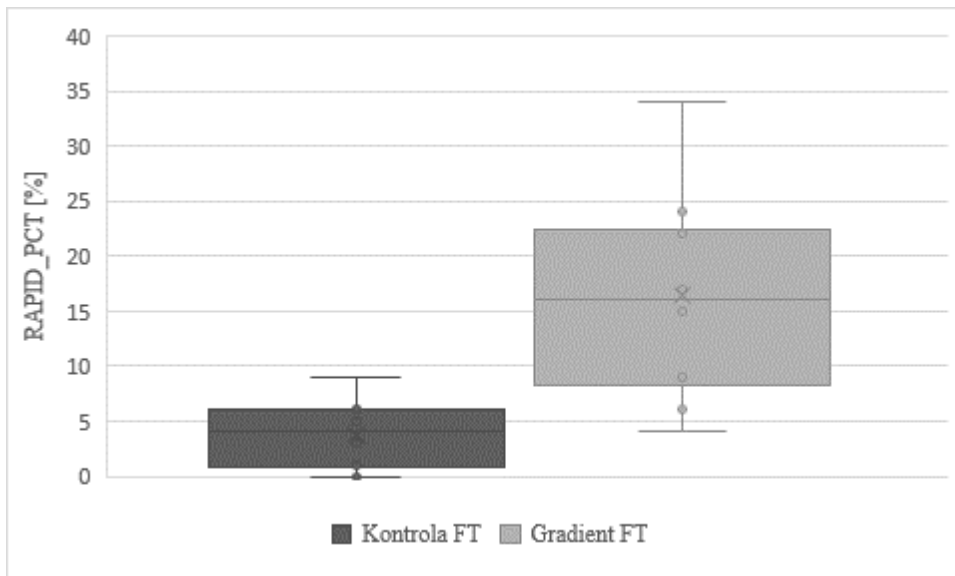
Rycina 10. Porównanie charakterystyki ruchu plemników najądrzowych żubra kriokonserwowanych z (Gradient FT) i lub bez (Kontrola FT) etapu wirowania w gradiencie gęstości Percoll® - VSL- średnia prędkość plemników wzdłuż linii prostej;  $p < 0.05$



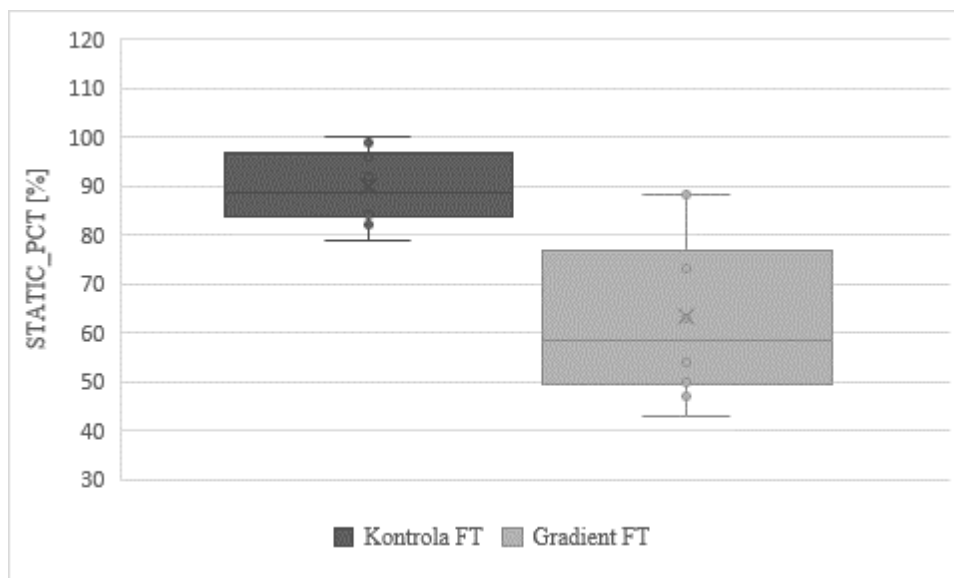
Rycina 11. Porównanie charakterystyki ruchu plemników najądrzowych żubra kriokonserwowanych z (Gradient FT) i lub bez (Kontrola FT) etapu wirowania w gradiencie gęstości Percoll® - BCF- częstotliwość bocznych odchyień główki plemnika;  $p < 0.05$



Rycina 12. Porównanie charakterystyki ruchu plemników najądrzowych żubra krikonserwowanych z (Gradient FT) i lub bez (Kontrola FT) etapu wirowania w gradiencie gęstości Percoll® - LIN- liniowość ruchu;  $p < 0.05$



Rycina 13. Porównanie charakterystyki ruchu plemników najądrzowych żubra krikonserwowanych z (Gradient FT) i lub bez (Kontrola FT) etapu wirowania w gradiencie gęstości Percoll® - RAPID- odsetek plemników szybkich;  $p < 0.05$



Rycina 14. Porównanie charakterystyki ruchu plemników najądrzowych żubra kriokonserwowanych z (Gradient FT) i lub bez (Kontrola FT) etapu wirowania w gradiencie gęstości Percoll® - STATIC\_PCT- odsetek plemników statycznych;  $p < 0.05$

Wyniki oceny cech funkcjonalnych plemników poddanych procesowi kriokonserwacji w obu grupach (Gradient FT; Kontrola FT) ocenianych za pomocą barwienia fluorescencyjnego oraz cytometrii przepływowej zostały przedstawione w tabeli 13. Próby wirowane w gradiencie gęstości Percol® charakteryzowały się istotnie wyższym odsetkiem plemników z nienaruszoną błoną komórkową, nienaruszonym akrosomem oraz wysokim potencjałem mitochondrialnym w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w odsetkach plemników z uszkodzoną chromatyną pomiędzy obiema grupami (Tabela 13).

Tabela 13. Charakterystyka cech funkcjonalnych plemników najądrzowych żubra poddanych kriokonserwacji z wprowadzeniem (Gradient FT) i bez (Kontrola FT) etapu wirowania w gradiencie gęstości Percoll® oceniona za pomocą cytometrii przepływowej. Wszystkie dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SE. a,b,c, w poszczególnych kolumnach oznacza różnice istotne statystycznie; n=4; p<0.05

	Plemniki żywe z nienaruszoną błoną komórkową [%]	Plemniki żywe z prawidłowym akrosomem [%]	Plemniki żywe z wysokim potencjałem mitochondrialnym [%]	Plemniki z uszkodzoną chromatyną [%]	Plemniki żywe bez peroksydacji lipidów [%]
24h od pobrania	51,46 $\pm$ 3,80 <sup>a</sup>	53,23 $\pm$ 5,55 <sup>a</sup>	66,37 $\pm$ 5,89 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	97,43 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>
Kontrola FT	11,86 $\pm$ 3,60 <sup>b</sup>	32,23 $\pm$ 4,60 <sup>b</sup>	20,93 $\pm$ 5,78 <sup>b</sup>	0,09 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	98,15 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>
Gradient FT	29,93 $\pm$ 4,30 <sup>c</sup>	40,79 $\pm$ 3,80 <sup>c</sup>	56,94 $\pm$ 4,67 <sup>c</sup>	0,07 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	99,03 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>

#### 6.4. Zadanie badawcze 4. Przeprowadzenie testu wiązania plemników najądrzowych żubra z heterologiczną osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego

Wyniki otrzymane podczas realizacji zadania czwartego zostały przedstawione w postaci preprintu stanowiącego załącznik 3 do niniejszego manuskryptu.

#### Charakterystyka plemników najądrzowych żubra wykorzystanych w teście ZBA

Wartości podstawowych parametrów pozyskanych z najądrzy plemników zostały przedstawione w tabeli 14.

Tabela 14. Charakterystyka plemników najądrzowych żubra pozyskanych *post mortem*, n=1

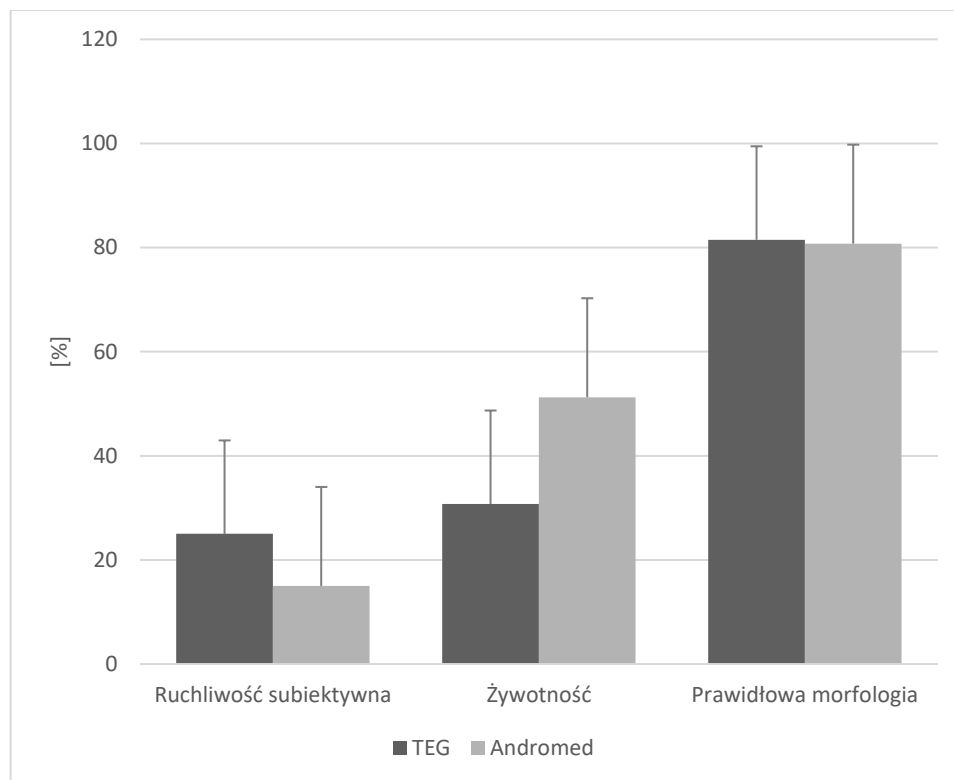
Koncentracja [x10 <sup>6</sup> /ml]	Ruchliwość subiektywna [%]	Żywotność [%]	Prawidłowa morfologia [%]
317,5	60,00	78,80	88,00

## Podstawowa ocena porozmrożeniowej jakości plemników wykorzystanych w teście ZBA

Próby poddane procesowi kriokonserwacji w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu charakteryzowały się wyższym odsetkiem ruchliwych plemników niż te mrożone w rozrzedzalniku Andromed<sup>®</sup>, które wynosiły, odpowiednio, 25 % i 15 % (rycina15).

Odsetek plemników żywotnych oceniany za pomocą barwnika eozynowo-nigrozynowego wynosił 30,75 % dla rozrzedzalnika na bazie buforu Tris (TEG) oraz 51,25 % dla prób mrożonych w Andromed<sup>®</sup> (rycina 15).

Niezależnie od rozrzedzalnika, odsetek plemników charakteryzujących się prawidłową morfologią był podobny i wynosił 81,5 % i 80,75 %, odpowiednio, dla TEG i Andromed<sup>®</sup> (rycina 15)

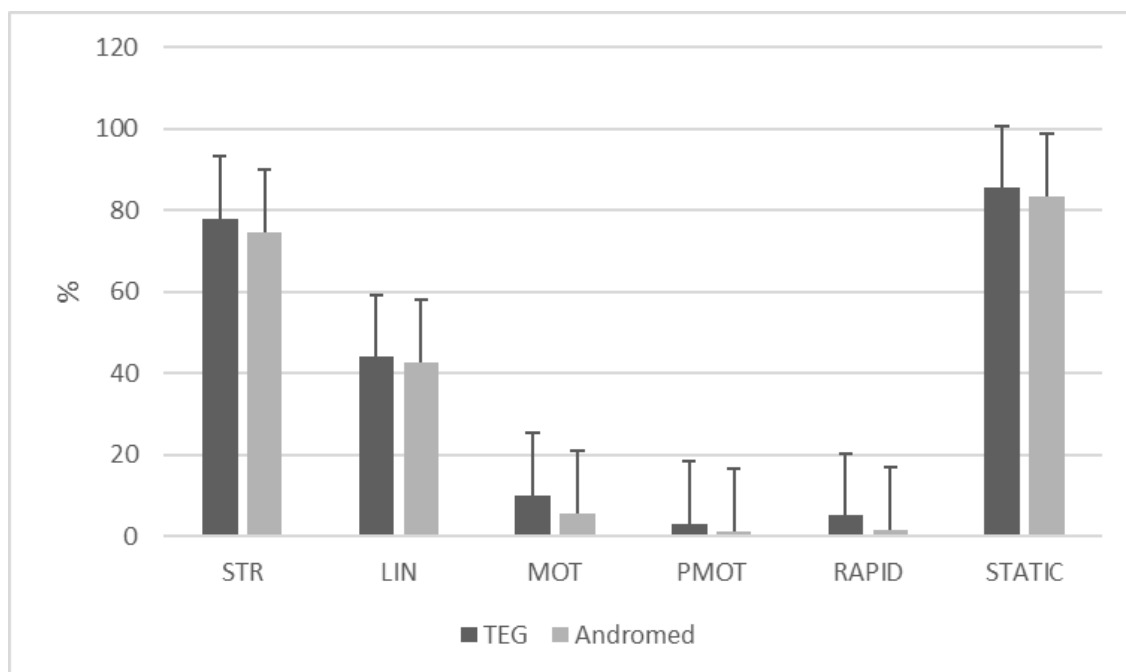


Rycina 15. Charakterystyka plemników najądrzowych żubra zamrożonych/rozmrożonych w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu (TEG) oraz w Andromed<sup>®</sup>



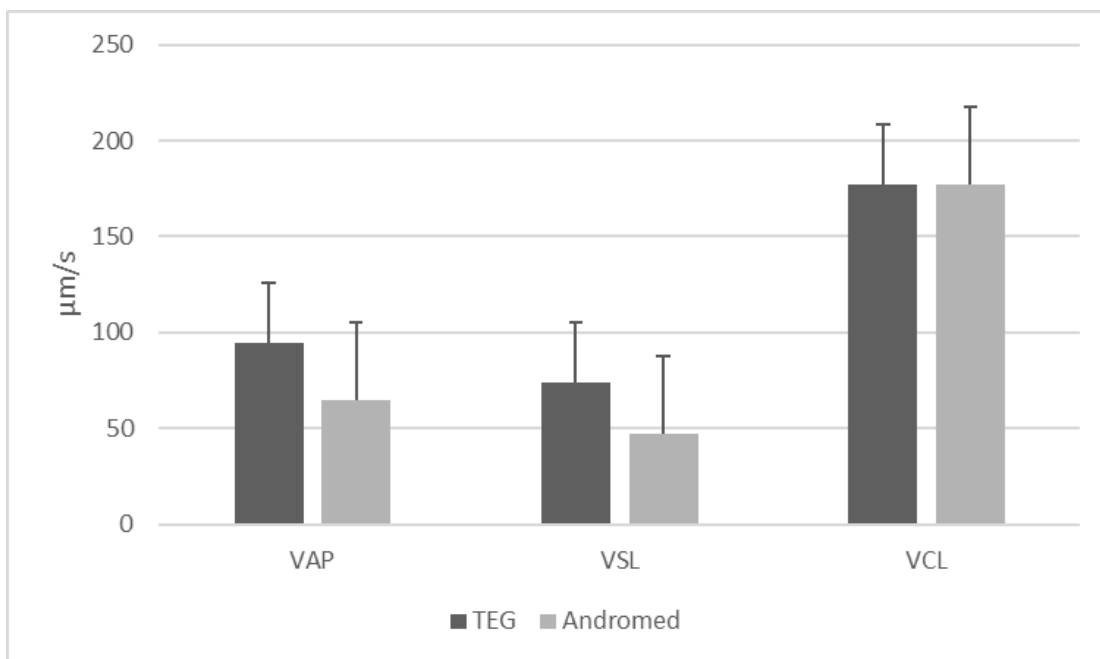
## Szczegółowa charakterystyka ruchu mrożonych/rozmrożonych plemników oceniana za pomocą systemu CASA

Ruchliwość uzyskanych plemników oceniana przy użyciu systemu CASA była niska dla obu rozrzedzalników. Średni odsetek ruchliwości (MOT, %) i ruchliwości postępowej (PMOT, %) był wyższy w przypadku rozrzedzalnika na bazie Tris niż w Andromed<sup>®</sup> i wynosił, odpowiednio, 10% i 3% dla TEG oraz 5,5% i 1% dla Andromed<sup>®</sup>. Odsetek plemników statycznych był podobny w TEG (85,5%) i Andromed<sup>®</sup> (83,5%). Natomiast populacja plemników szybkich była większa w rozrzedzalniku TEG (5,0%) niż w Andromed<sup>®</sup> (1,5%). Podobnie liniowość (LIN) i prostoliniowość (STR) ruchu były wyższe w TEG niż Andromed<sup>®</sup> (rycina 16).



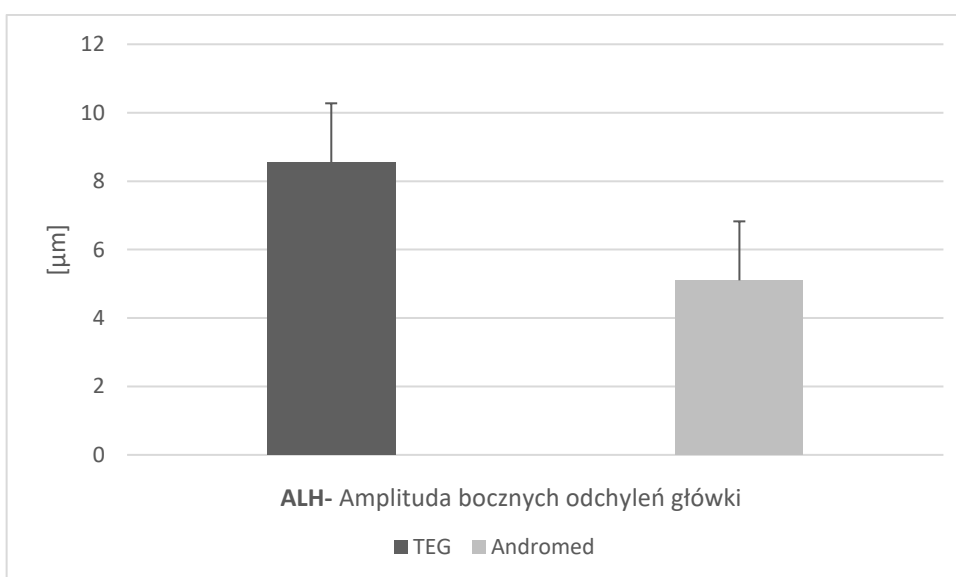
Rycina 16. Charakterystyka ruchu plemników żubra mrożonych/rozmrożonych w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris (TEG) i Andromed<sup>®</sup> oceniana za pomocą systemu CASA - prostoliniowość STR (%); liniowość LIN (%); ruchliwość MOT (%); ruchliwość progresywna PMOT (%); odsetek plemników szybkich RAPID (%); odsetek plemników statycznych STATIC (%)

Średnia VAP i VSL były wyższe w TEG. Prędkość VCL krzywoliniowa była podobna w obu grupach (rycina 17).



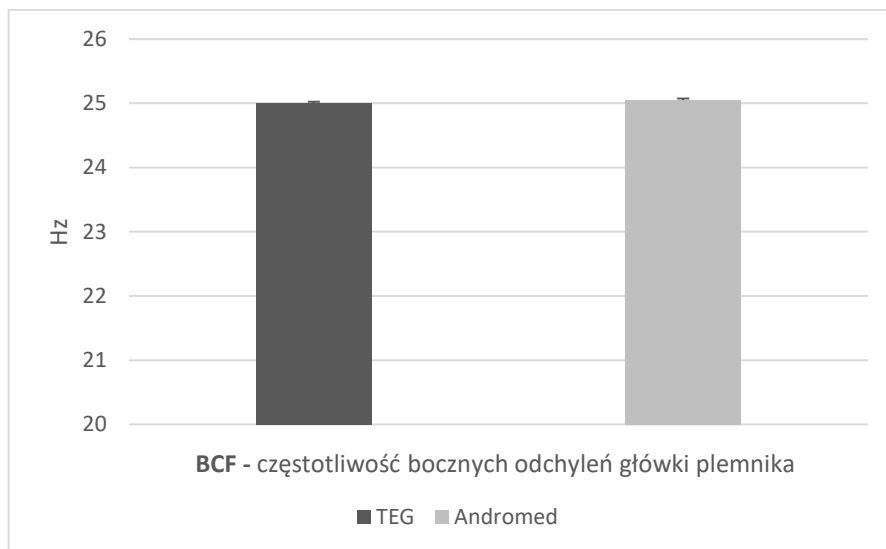
Rycina 17. Porozmrożeniowa charakterystyka ruchu plemników kriokonserwowanych z użyciem rozrzedzalnika na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu (TEG) lub Andromed<sup>®</sup> oceniana za pomocą CASA – średnia prędkość plemnika po przybliżonej ścieżce ruchu – VAP (μm/s); średnia prędkość plemników wzdłuż linii prostej – VSL (μm/s); średnia prędkość plemnika po rzeczywistej ścieżce ruchu – VCL (μm/s)

Średnia ALH była wyższa w TEG niż w Andromed<sup>®</sup> i wynosiła, odpowiednio, 8,55 μm i 5,1 μm (rycina 18).



Rycina 18. Porozmrożeniowa charakterystyka ruchu plemników kriokonserwowanych z użyciem rozrzedzalnika na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu (TEG) lub Andromed<sup>®</sup> oceniana za pomocą CASA – Amplituda bocznych odchyłeń główki – ALH (μm)

Średnia BCF wynosiła 25,05 Hz dla Andromed® i była porównywalna z 25,00 Hz ocenianą w TEG (rycina 19).



Rycina 19. Porozmrożeniowa charakterystyka ruchu plemników kriokonserwowanych z użyciem rozrzedzalnika na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu (TEG) lub Andromed® oceniana za pomocą CASA – częstotliwość bocznych odchyień główki plemnika – BCF (Hz)

### **Funkcjonalno-strukturalna charakterystyka plemników najądrzowych żubra wykorzystanych w teście ZBA**

Odsetek plemników charakteryzujących się nienaruszoną błoną komórkową i akrosomem po rozmrożeniu był wyższy w Andromed® niż w TEG. Inne parametry morfo – funkcjonalne, takie jak odsetek żywych: nieapoptotycznych komórek, komórek o wysokim potencjale mitochondrialnym, nienaruszonej chromatynie i bez peroksydacji lipidów były lepsze w próbach zamrożonych w TEG. Wyniki oceny parametrów funkcjonalnych i strukturalnych ocenianych za pomocą cytometrii przepływowej przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Charakterystyka funkcjonalna plemników najądrzowych żubra kriokonserwowanych w rozrzedzalniku na bazie buforze Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu (TEG) oraz Andromed<sup>®</sup>. Dane przedstawiono jako średnie; n=2

	Plemniki żywe z nienaruszoną błoną komórkową [%]	Plemniki żywe z prawidłowym akrosomem [%]	Plemniki żywe z wysokim potencjałem mitochondrialnym [%]	Plemniki z uszkodzoną chromatyną [%]	Plemniki żywe bez peroksydacji lipidów [%]
TEG	14,54	29,24	34,73	0,10	17,46
Andromed <sup>®</sup>	26,12	55,16	1,39	0,30	8,45

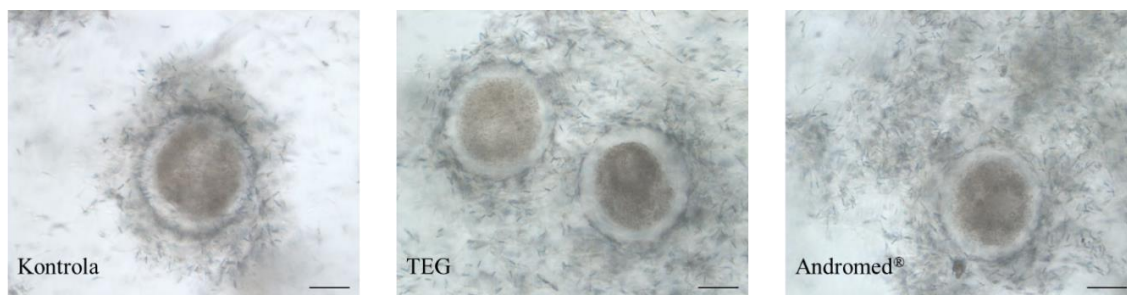
### Test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu

Niezależnie od zastosowanego rozrzedzalnika, plemniki przyłączyły się do wszystkich oocytów. Minimalna liczba związanych plemników wynosiła 29, 3 i 2, odpowiednio, w grupie kontrolnej, w grupie TEG i w grupie Andromed<sup>®</sup>. Najwyższą liczbę związanych plemników zaobserwowano, dla wszystkich powtórzeń, w grupie kontrolnej. Średnia liczba związanych plemników była wyższa w TEG niż w Andromed<sup>®</sup>, ale w obu rozrzedzalnikach była niższa niż w grupie kontrolnej (tabela 16). Reprezentatywne obrazy przedstawiono na rycinach 20 i 21.

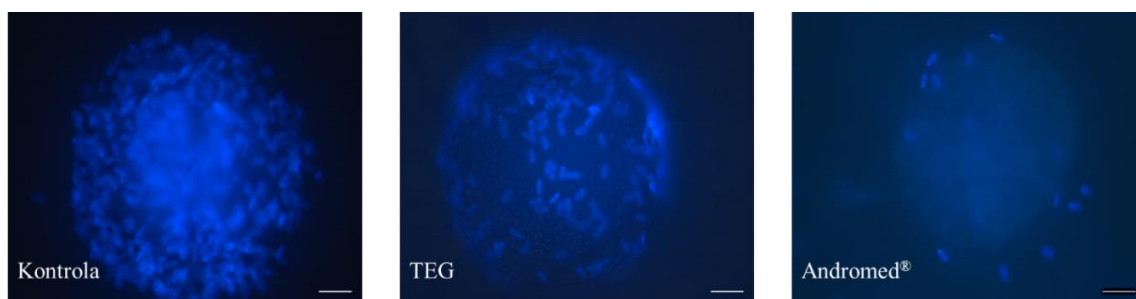
Wartość statystyki testowej w asymptotycznym teście jednorodności współczynników zmienności wyniosła 58,74 ( $p=0,85$ ). Różnice w zmienności wyników dla 6 powtórzeń nie są istotne statystycznie.

Tabela 16. Zdolność plemników najądrzowych żubra kriokonserwowanych w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu (TEG) oraz Andromed<sup>®</sup> do wiązania z heterologiczną osłonką przejrzystą oocytów bydłowych. Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SE z 6 powtórzeń (3 dla prób z lewego najądrza i 3 z prawego), 30 oocytów na powtórzenie w każdej grupie.

	Średnia liczba plemników przyłączonych do oocytu	Odsetek oocytów ze związanymi plemnikami [%]
Kontrola	166,11 $\pm$ 50,60	100,00
TEG	66,26 $\pm$ 7,93	100,00
Andromed <sup>®</sup>	27,37 $\pm$ 2,37	100,00



Rycina 20. Reprezentatywne zdjęcia testu wiązania osłonką przejrzystą oocyta (ZBA) plemników najądrzowych żubra poddanych kriokonserwacji z użyciem dwóch różnych rozrzedzalników: na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu – TEG oraz Andromed<sup>®</sup>, a także nasienia kontrolnego – komercyjnie mrożone nasienie samca bydła domowego. Obiektyw 40x, pasek skali = 50 $\mu$ m



Rycina 21. Reprezentatywne zdjęcia testu wiązania osłonką przejrzystą oocyta (ZBA) plemników najądrzowych żubra poddanych kriokonserwacji z użyciem dwóch różnych rozrzedzalników: na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu – TEG oraz Andromed<sup>®</sup>, a także nasienia kontrolnego – komercyjnie mrożone nasienie samca bydła domowego. Obiektyw 40x, skala = 50 $\mu$ m. Barwienie Hoechst 33342. Obiektyw 40x, pasek skali = 20  $\mu$ m

## 7. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Plemniki najądrzowe pozyskane *post mortem* stanowią rezerwę cennego materiału genetycznego wielu gatunków zwierząt, w tym – szczególnie istotnych – gatunków chronionych i bliskich wyginięcia [39,68]. W przypadku tych ostatnich, w tym również żubra, pozyskanie plemników z najądrzy jest często jedyną możliwością zdobycia gamet od męskich osobników. Ich dalsza konserwacja i wykorzystanie, w ramach technik wspomaganego rozrodu, zwiększa szanse na utrzymanie różnorodności genetycznej, a w konsekwencji zdrowie całej populacji. Aby jednak zachowanie gamet mogło przełożyć się na realny sukces przy odtwarzaniu populacji gatunków zagrożonych i bliskich wyginięcia, niezbędne jest dokładne scharakteryzowanie komórek poddawanych procedurom laboratoryjnym. Niestety, w związku z ograniczonym dostępem i niewielką populacją żubra na świecie, nasienie tego gatunku jak dotąd poznano w niewielkim stopniu. Stąd, badanie na relatywnie dużej liczbie osobników, od których pozyskano *post mortem* plemniki, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy ma duże znaczenie naukowo – poznawcze. Ponadto, luka w opisie cech męskich gamet żubra uniemożliwia porównanie uzyskanych wyników z badaniami nad jego rozrodem prowadzonymi przez innych badaczy. W konsekwencji, rezultaty uzyskane w badaniach własnych porównane zostały z danymi dotyczącymi analogicznych badań u innych gatunków przedstawicieli krętorogich, zbliżonych genetycznie do żubra: bydła domowego (*Bos taurus*), a także dwóch podgatunków bizona amerykańskiego – bizona preriowego (*Bison bison bison*) oraz bizona leśnego (*Bison bison athabascae*).

W dostępnej literaturze istnieją liczne doniesienia na temat uzyskania hybryd żubra i bydła domowego, co pozwala założyć, że budowa, jak i fizjologia gamet obu gatunków wykazuje duże podobieństwo [25,32,33,51,54,55,56,111,126]. Należy jednak pamiętać, że krzyżowanie międzygatunkowe wpływa na płodność uzyskiwanego potomstwa. Udowodniono, że samce wspomnianych hybryd w pokoleniu F1 charakteryzowała niepłodność [33]. Natomiast u byków z pokolenia B1 (wsteczne skrzyżowanie samic F1 z bydłem domowym), w badaniach histologicznych jąder zaobserwowano zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatocytów pierwszego lub drugiego rzędu [33]. Za jedną z przyczyn niepłodności samców hybryd żubra i bydła domowego uznaje się różnice w kariotypie tych gatunków. Genom żubra składa się z 60 chromosomów, wśród których wszystkie autosomy i chromosom X są identyczne z chromosomami osobników bydła domowego. Jednakże, chromosom Y – u żubra mały

i submetacentryczny – znacznie odbiega od tego, występującego w kariotypie samców bydła domowego [34]. Podobne różnice wykazano w budowie chromosomu Y porównując kariotyp bydła domowego oraz bizona amerykańskiego. U samic hybryd bydła domowego i żubra sezon rozrodczy notowany jest w okresie od czerwca do października. Większość kryć obserwuje się – podobnie jak u żubra – latem i wczesną jesienią [54]. Warto zwrócić uwagę na efekt krzyżowania żubra z bliżej z nim spokrewnionym bizonem skutkujący płodnym potomstwem [33]. W konsekwencji, niekontrolowane krzyżowanie tych gatunków stanowi zagrożenie dla czystości obu populacji. Obserwacje dotyczące ich bliskiego pokrewieństwa są jednak obiecujące dla dalszych badań nad właściwościami plemników żubra. Ze względu na podobieństwo gamet, jak i płodność hybryd, komercyjne hodowle bizona amerykańskiego mogą stać się cennym źródłem materiału i danych do odniesienia podczas analizy plemników żubra.

W niniejszych badaniach, całkowita liczba plemników pozyskanych z najądrzy od jednego osobnika żubra była wyższa (Me:  $1985 \times 10^6$ ) niż ta, notowana u bizona preriowego ( $146-830 \times 10^6$ ) [4] oraz bydła domowego ( $440 \times 10^6-1100 \times 10^6$ ) [4,74]. Przeciwnie, odsetek żywych plemników w barwieniu eozynowo-nigrozynowym u żubra (Me: 69,8%) był niższy, niż ten uzyskany u samców bydła domowego (86,2%) [115]. Podobnie, żubra charakteryzowała niższa subiektywna ruchliwość plemników (Me: 40,0%) w stosunku do plemników pozyskanych od bizona preriowego (71,7-78,0% [60,119] i bizona leśnego (62,0%) [60], a także bydła domowego (64,4-80,0%) [67,74]. Zarówno u bizona amerykańskiego, jak i u żubra odnotowano podobny odsetek plemników charakteryzujących się prawidłową morfologią, wynoszący (w zależności od badanej grupy)  $56,8 \pm 16,0\%$ - $70,7 \pm 19,4\%$  dla bizona amerykańskiego [60] oraz 54,3% (10,5-83,3%) dla żubra.

Pomiary morfometryczne wykazały, że główka plemników żubra charakteryzuje się szerokością 5,0  $\mu\text{m}$  (3,5-6,7  $\mu\text{m}$ ), długością 8,5  $\mu\text{m}$  (6,4-11,3  $\mu\text{m}$ ) i powierzchnią 36,9  $\mu\text{m}^2$  (23,7-48,6  $\mu\text{m}^2$ ). Uzyskane wyniki są porównywalne do wcześniej przeprowadzonych pomiarów uzyskanych na mniejszej liczbie osobników ( $n=4$ ) [47]. Wymiary główek plemników żubra są podobne do opisanych u obu podgatunków bizona amerykańskiego (bizon leśny: szerokość  $4,71 \pm 0,19 \mu\text{m}$ , długość  $9,04 \pm 0,44 \mu\text{m}$ , pole powierzchni  $34,72 \pm 2,64 \mu\text{m}^2$ ; bizon preriowy: szerokość  $4,76 \pm 0,22 \mu\text{m}$ , długość  $9,03 \pm 0,32 \mu\text{m}$ , pole powierzchni  $35,64 \pm 1,91 \mu\text{m}^2$ ) [94]. Równocześnie szerokość oraz pole powierzchni główek plemników najądrzowych żubra są większe, natomiast długość

główki plemnika jest mniejsza u żubra w porównaniu do bydła domowego (bydło domowe: szerokość 4,48  $\mu\text{m}$ , długość 8,63, pole powierzchni 29,14  $\mu\text{m}^2$  [42]). Pomiary morfometryczne główek plemników opisano u samców wielu gatunków zwierząt, nie tylko ssaków, [98,125], ale także owadów, ryb [79] i ptaków [106]. Zarówno u ogierów, knurów, jelenia szlachetnego [102], owcy domowej [69,72], jak i ludzi stwierdzono korelację między pomiarami morfometrycznymi a płodnością samców [79]. Podobnych zależności nie wykazano w badaniach nad nasieniem cewkowym kotów [98]. Wykonane pomiary morfometryczne główek plemników najądrzowych żubra stanowią odpowiedni punkt wyjścia dla dalszych badań nad ich wykorzystaniem w celu oceny jakości gamet.

Ocena cech funkcjonalno-strukturalnych za pomocą barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej wykazała, że próby uzyskane z najądrzy żubrów charakteryzuje niższy odsetek plemników z nienaruszoną błoną komórkową oraz prawidłowym akrosomem w porównaniu z próbkami pozyskanymi z najądrzy bydła domowego [12]. Jednakże, w przytaczanym artykule autorzy podkreślają, że analizę materiału przeprowadzono w czasie 2 godzin od pobrania [12]. Dłuższy okres między izolacją, a oceną może być jedną z przyczyn zaobserwowanych w parametrach plemników najądrzowych żubra różnic.

Analizując wyniki oceny plemników żubra należy pamiętać o pewnych uwarunkowaniach wynikających z ich pochodzenia. Pozyskiwanie materiału odbywało się poza sezonem rozrodczym, co mogło mieć przełożenie na liczbę oraz ruchliwość uzyskanych gamet. Dodatkowo, wykorzystane w badaniu gamety pobierano od osobników zakwalifikowanych do eliminacji z powodu poważnego urazu, choroby lub podeszłego wieku. Przyczyny te mogą uzasadniać różnice w jakości plemników pozyskanych z najądrzy żubrów i innych gatunków, kiedy materiał pozyskiwano podczas uboju.

Trudności w ocenie jakości pozyskanych plemników najądrzowych żubra oraz ich potencjału do wykorzystania w ART wynikają także z braku określenia minimalnych wymagań dotyczących parametrów jakości takiego nasienia, analogicznych do tych, stosowanych u zwierząt gospodarskich i towarzyszących. Jednakże, unikatowość gromadzonego materiału podaje w wątpliwość zasadność takich wytycznych. Wydaje się, że w przypadku zwierząt chronionych, kluczowe jest ustalenie czy wybrany protokół postępowania z pozyskanymi gametami pozwala na zachowanie ich w liczbie



wystarczającej do wykorzystania w ART. Z tego powodu spośród 27 prób ocenianych w etapie pierwszym, do mrożenia zakwalifikowano 20 charakteryzujących się minimalną ruchliwością subiektywną na poziomie 35% oraz całkowitą liczbą plemników nie mniejszą  $120 \times 10^6$ .

Do badań nad opracowaniem protokołu postępowania z plemnikami żubra, podobnie jak w przypadku innych chronionych gatunków, wykorzystano dane zgromadzone na temat blisko spokrewnionych gatunków niezagrożonych [17]. W konsekwencji, do kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra zastosowano rozrzedzalnik, którego przydatność została wcześniej opisana w publikacjach dotyczących mrożenia nasienia innych członków rodziny Krętorogich [12,17,64,117] oraz wstępnie udowodniona na niewielkiej grupie żubrów [51].

W niniejszej pracy efekty kriokonserwacji plemników najądrzowych żubrów zostały ocenione za pomocą zarówno podstawowych, jak i zaawansowanych, metod oceny nasienia. Badania skupione były na parametrach, których znaczenie uznaje się za kluczowe w ocenie potencjału zapłodnieniowego ocenianych plemników.

Niezwykle istotnym parametrem oznaczanym podczas oceny efektywności procesu kriokonserwacji jest ciągłość błony komórkowej [45]. Warunkuje ona funkcjonowanie każdej żywej komórki. Oprócz prawidłowej interakcji ze środowiskiem – w przypadku gamet męskich – pośrednio odpowiada ona również za zdolność poruszania [45]. Stąd, szczególnie ważne wydają się być zaobserwowane znaczące różnice w odsetku plemników z nienaruszoną błoną komórkową między próbami świeżymi i rozmrożonymi. Różnice te mieściły się w obszernym przedziale od 4,5 do 63,8%. Obniżenie odsetka plemników z nienaruszoną błoną komórkową mogło pośrednio przełożyć się również na zmniejszenie ich ogólnej ruchliwości. Jednakże uzyskana średnia całkowita ruchliwość plemników po rozmrożeniu nie różniła się od wyników badania pilotażowego dotyczącego wykorzystania plemników najądrzowych żubra do uzyskania hybryd z bydłem domowym na drodze sztucznej inseminacji [51].

Podstawową rolę gamety męskiej jest dostarczenie materiału genetycznego ojca do powstającej zygoty [38], dlatego w protokołach konserwacji plemników ochrona DNA jest niezwykle istotna. W niniejszych badaniach wykazano, że proces kriokonserwacji w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris i żółtka jaja kurzego nie miał wpływu na status

chromatyny badanych gamet. Nawet po zamrożeniu/rozrożeniu, odsetek plemników ze zdenaturowanym DNA w teście SCSA (% DFI) pozostał na stosunkowo niskim poziomie, co jest obiecujące w kontekście wykorzystania tych plemników do ART.

Prawidłowo wykształcony akrosom oraz jego zawartość są niezbędne do penetracji osłonki przejrzystej oocytu [45]. Z tego powodu kolejną istotną cechą gamet męskich, mierzoną podczas oceny efektywności kriokonserwacji jest integralność akrosomu [45]. W prezentowanych badaniach straty w odsetku plemników z prawidłowym akrosomem powstałe podczas procesu zamrażania/rozrażania były niższe w porównaniu do strat w odsetku gamet z prawidłową błoną komórkową. Niemniej jednak zaobserwowane zmiany nie były zaskakujące – podobne obserwacje opisano w poddanych procesowi mrożenia/rozrożenia plemnikach najądrzowych bydła domowego [12].

Zarówno plemniki, jak i każda żywa komórka muszą przeciwdziałać stresowi oksydacyjnemu. Jego przyczyną jest brak równowagi między produkcją reaktywnych form tlenu (ROS), a możliwością ich neutralizacji przez przeciwutleniacze. Jednakże, ROS są niezbędne dla kluczowego procesu kapacytacji, reakcji akrosomalnej oraz fuzji z oocytem [45]. Zaburzenie naturalnie występującej równowagi, a tym samym nadmiar ROS prowadzi do uszkodzenia (peroksydacji) struktury kwasów nukleinowych, białek, lipidów oraz węglowodanów. W konsekwencji, prowadzi to do śmierci komórki [91], przekładając się na obniżenie płodności danego osobnika [45]. Wszystkie komórki zależne od metabolizmu tlenowego posiadają w swoim wnętrzu substraty i enzymy neutralizujące potencjalnie toksyczne ROS, jednakże obrona antyoksydacyjna plemników jest rozwinięta w niewielkim stopniu, co czyni je podatnymi na stres oksydacyjny [80]. Gamety męskie są szczególnie narażone na to zjawisko podczas procesu kriokonserwacji, co wyjaśnia uzyskanie gorszych wyników badanych parametrów plemników w porównaniu z wartościami wyjściowymi [11,89,91]. Głównym źródłem ROS w ejakulacie są znajdujące się w nasieniu uszkodzone plemniki oraz leukocyty [45,80]. Ze względu na zastosowaną metodę pobierania gamet należy założyć, że pozyskane próby były zanieczyszczone także leukocytami, co dodatkowo mogło przyczynić się do zwiększenia odsetka plemników z peroksydacją lipidów.

Podczas oceny skuteczności kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra, należy pamiętać o pewnych ograniczeniach związanych zarówno z pochodzeniem plemników, metodą ich pobierania, jak i samym procesem zamrażania/rozrażania.

Możliwość skutecznego wykorzystania plemników najądrzowych w ramach ART została opisana u wielu gatunków zwierząt hodowlanych i dzikich. Jednakże wykazano, w stosunku do nasienia ejakulowanego, istotne różnice w charakterystyce ruchu plemników, między innymi ich obniżoną prędkość, mniejszą prostoliniowość i liniowość [12,39].

Metoda pozyskania plemników poprzez nacinanie najądrzy wydaje się być najbardziej odpowiednia w przypadku zwierząt dzikich [29]. Jednakże, pomimo swoich zalet, jak każda metoda, również ta posiada swoje ograniczenia. Nawet po zastosowaniu filtrów do komórek, uzyskane próby oprócz – naturalnie tam występujących – prawidłowych, uszkodzonych oraz martwych plemników, mogą zawierać znaczne ilości detrytusów komórkowych [71]. Zarówno obecność gamet martwych i o obniżonej jakości [70], jak i elementów morfotycznych krwi ma negatywny wpływ na prawidłowo funkcjonujące plemniki [1] przekładając się również na ich jakość po rozmrożeniu, potęgując dodatkowo uszkodzenia generowane podczas samego procesu zamrażania. Uszkodzenia te są konsekwencją, między innymi, szoku termicznego, stresu osmotycznego, wewnątrzkomórkowej krystalizacji czy toksyczności krioprotektantów [46]. Plemniki takie wykazują obniżoną zdolność do zapłodnienia komórki jajowej, w porównaniu do świeżego nasienia, wynikający z niższej żywotności oraz zwiększonego odsetka wad subletalnych [120]. Potwierdzają to uzyskane wyniki – we wszystkich ocenianych parametrach zaobserwowano pogorszenie jakości gamet. Wyjątek stanowiła niezmienna liczba plemników o prawidłowej morfologii, a także tych z uszkodzoną chromatyną i o wysokim potencjale mitochondrialnym.

Pomimo wielu niezaprzeczalnych zalet, kriokonserwacja jest dla gamet procesem inwazyjnym [120]. Otrzymane w wyniku procesu mrożenia/rozmrożenia parametry jakościowe plemników żubrzych nie były zaskakujące, gdyż wynikają ze specyfiki samego procesu. Podobne pogorszenie parametrów kriokonserwowanych plemników zostało opisane u wielu gatunków zwierząt, w tym innych przedstawicieli rodziny Krętorogich [12,17,64,117,120]. Ponadto pobieranie plemników z najądrzy zwierząt eliminowanych z różnych powodów w tym z choroby, mogło – już na tym etapie – zdeterminować jakość pozyskanych prób.

Ze względu na charakter pobieranych prób, celem jednego z zadań badawczych była próba oczyszczenia pozyskanych plemników za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll®. Substancja ta, wcześniej popularna w procedurach *in vitro*

u człowieka, została wycofana z medycyny człowieka ze względu na podejrzenie toksyczności [105]. W weterynarii, wirowanie w gradiencie gęstości znalazło zastosowanie podczas przygotowywania nasienia do ART u bydła [3,75,88,112]. W dostępnej literaturze brak jest informacji o wykorzystaniu tej metody do selekcji plemników najądrzowych przed procesem kriokonserwacji. Z tego powodu trudno jest porównać uzyskane wyniki. Zaledwie kilka opublikowanych wcześniej prac uwzględniało w metodyce wirowanie do selekcji plemników pobranych z najądrzy [35,37,44,65]. Dodatkowo, większość badań dotyczyła selekcji rozmrożonego nasienia przed wykorzystaniem go w ART [18,37,84,112]. W niniejszej pracy po raz pierwszy opisano selekcję plemników najądrzowych żubra za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® przed poddaniem ich procesowi kriokonserwacji. Podobny do opisanego protokół został zastosowany przez Álvarez-Rodríguez M. i wsp. [1] u niedźwiedzia brunatnego (*Ursus arctos*). Przytaczane badania dotyczyły selekcji – uzyskanych poprzez ejakulację – plemników przed procesem kriokonserwacji [1].

Podobnie do bydła domowego, świni, oraz wspomnianego niedźwiedzia brunatnego [1], również u żubra, wirowanie w gradiencie gęstości Percoll® pozwoliło na wyselekcjonowanie plemników wysokiej jakości, mniej podatnych na kriouszkodzenia, a w konsekwencji charakteryzujących się wyższą jakością porozmrożeniową. U żubra, jak i we wszystkich przytaczanych badaniach, zastosowana metoda pozwoliła na oddzielenie gamet charakteryzujących się wyższym, niż wyjściowy odsetkiem ruchliwych plemników [3,37,75,84,88,112]. Również Lee i wsp. odnotowali wyższy odsetek żywych i ruchliwych plemników bydła domowego w grupach poddanych wirowaniu w porównaniu z grupą kontrolną [62]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad selekcją ejakulowanych plemników zebu, czy pozyskanych z najądrzy jelenia szlachetnego [37,88].

Zastosowanie selekcji wpłynęło także na poprawę odsetka plemników charakteryzujących się prawidłową morfologią, co zaobserwowano również u niedźwiedzia brunatnego [37]. Podobnego efektu nie odnotowano natomiast w przypadku selekcji nasienia knurów [62].

Ponadto, wirowanie w gradiencie gęstości Percoll® miało istotny wpływ na niektóre szczegółowe parametry ruchu oceniane za pomocą systemu CASA. Zaobserwowano wyższą VSL niż w grupie kontrolnej. Porównywalny efekt opisano również u knurów [84]. W przeciwieństwie do żubra, M. Noguchi i wsp. (2015) [84]

odnotowali podobne zmiany także dla VAP, VCL oraz STR. Autorzy wykazali ponadto obniżenie BCF plemników w nasieniu poddanym selekcji, czego również nie potwierdzono u żubra [84]. Natomiast, zarówno w niniejszych badaniach, jak i w przypadku bydła domowego, w grupie poddanej wirowaniu w gradiencie gęstości Percoll® zaobserwowano wyższą częstotliwość bocznych odchyłeń główki, liniowość ruchu oraz odsetek plemników szybkich [88].

Próby poddane selekcji – w porównaniu z grupą kontrolną – po rozmrożeniu charakteryzowały się wyższym odsetkiem plemników z nienaruszoną błoną komórkową i akrosomem. Podobne wyniki uzyskano u knurów [84] i bydła domowego [105,112]. Nie wszystkie badania są jednak zgodne w tym zakresie. O ile u buhaja wykazano porównywalny efekt wirowania na odsetek plemników z nienaruszoną błoną komórkową, L.Z. Oliveira i wsp. (2012) [88] zaobserwowali po selekcji wzrost odsetka plemników z uszkodzonym akrosomem.

U żubra wykazano pozytywny wpływ selekcji w gradiencie gęstości Percoll® na odsetek plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym. Podobne rezultaty uzyskali Arias i wsp. (2017), oraz Oliveira i wsp. (2012) u bydła domowego [3,88]. Równocześnie, w badaniach własnych, nie stwierdzono różnic w odsetku plemników z uszkodzoną chromatyną pomiędzy grupą badaną a kontrolną, co sugeruje, że wirowanie w gradiencie gęstości Percoll® nie wpływa na wykluczenie komórek z tym defektem. Podobne rezultaty zostały zaobserwowane również u bydła domowego [3].

Dodatkowym atutem, przemawiającym za zasadnością wprowadzenia etapu selekcji do protokołu kriokonserwacji, jest eliminacja detrytusów komórkowych oraz martwych, nieruchliwych plemników, które stanowią potencjalne centra aglutynacji dla prawidłowo funkcjonujących gamet.

Dotychczas potencjał zapładniający zamrożonych plemników pozyskanych z najądrzy żubra oceniano w testach *in vivo* poprzez inseminację jałówek rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń uzyskano hybrydy bydła domowego i żubra [51]. Ponadto, przy użyciu gamet zamrożonych w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtku jaja kurzego i glicerolu uzyskano w warunkach *in vitro* wczesną blastocystę żubra [26]. Wspomniane badania dowodzą zdolności przechowywanych po kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra

do zapłodnienia komórki jajowej. Jednakże, jak dotąd, nie opisano procedur, które pozwoliłyby na klasyfikację i ocenę potencjału zapładniającego przechowywanego materiału. Mając możliwość oceny takiego potencjału, można decydować czy plemniki zamrożone od danego osobnika powinny być w przyszłości wykorzystane do sztucznej inseminacji, czy też ich jakość umożliwia tylko przeprowadzenie zapłodnienia *in vitro*.

Test ZBA umożliwia ocenę zdolności plemnika do przyłączenia się do osłonki przejrzystej oocytu [113]. U bydła domowego wykazano korelację pomiędzy wynikami tego testu, a płodnością *in vivo* [32]. Wiązanie plemnika z komórką jajową jest etapem podstawowym w szeregu prowadzącym do zapłodnienia. Odbywa się poprzez połączenie receptorów na błonie komórkowej plemnika z glikoproteinami osłonki przejrzystej [123]. Dlatego też metoda ta pozwala na ocenę plemników pod kątem zaburzeń struktury błony komórkowej, niewykrywalnych w rutynowych procedurach analizy nasienia [113]. Zdolność do wiązania się z komórką jajową jest charakterystyczną cechą żywych plemników [32,113,127]. Uzyskane wyniki żywotności i integralności błony komórkowej plemników wydają się to potwierdzać również u żubrów.

Zastosowany protokół ZBA, z wykorzystaniem oocytów pokrewnego gatunku, okazał się odpowiedni do oceny plemników najądrzowych żubra. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupach badanych – mrożonych w różnych rozrzedzalnikach – plemniki związały się ze wszystkimi oocytami. Jakość kriokonserwowanych plemników uzyskanych po rozmrożeniu była niska, niezależnie od zastosowanego rozrzedzalnika. Znajduje to odzwierciedlenie w wynikach ich oceny przy użyciu podstawowych metod, CASA oraz cytometrii przepływowej, które potwierdzają wyniki uzyskane dzięki ZBA.

Ruchliwość subiektywna plemników po rozmrożeniu w grupie kontrolnej była wyższa niż w obu grupach badanych. Wyniki szczegółowej charakterystyki ruchu przy użyciu systemu CASA w grupach badanych wykazały jednak lepsze wyniki plemników zamrożonych w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris niż w Andromed<sup>®</sup>. Ponadto potencjał mitochondrialny oceniany za pomocą cytometru przepływowego potwierdził wyniki uzyskane przy użyciu systemu CASA. Przeanalizowana ruchliwość odpowiada wynikom uzyskanym w ZBA, chociaż należy pamiętać, że protokół ZBA został przeprowadzony w oparciu o takie samo stężenie ruchliwych gamet we wszystkich grupach. Tymczasem, odsetek plemników z nienaruszoną błoną komórkową oraz prawidłowym akrosomem po rozmrożeniu był wyższy w grupie Andromed<sup>®</sup> niż w rozrzedzalniku na bazie Tris. Inne parametry cech strukturalnych i funkcjonalnych oraz CASA były bardziej korzystne

w próbach zamrożonych w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris. Ostatecznie, wyniki testu ZBA uzasadniają zastosowanie tego rozrzedzalnika. Wskazuje to, że przeprowadzane do tej pory analizy nie są pomocne przy wykrywaniu konkretnych defektów błony, które wpłynęły na wyniki ZBA. Po związaniu plemnika z osłonką przejrzystą, reakcja akrosomalna wymaga prawidłowo zbudowanego i funkcjonującego akrosomu [19]. Z tego powodu założono, że zastosowanie rozrzedzalnika Andromed<sup>®</sup> może przełożyć się na lepsze wyniki w teście penetracji osłonki przejrzystej lub po zapłodnieniu *in vitro*. Takie założenie wymagałoby jednak powtórzenia porównania rozrzedzalników na większej liczbie prób.

Co ciekawe, w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem gamet bydłych, zaobserwowano dużą zmienność zdolności wiązania plemników w obrębie powtórzeń i między powtórzeniami ZBA, co jednak mogło wynikać ze jakości samych oocytów [127]. Stąd, w prezentowanym eksperymencie, w celu wykluczenia wpływu osobniczego na wyniki, wykorzystano oocyty izolowane z jajników pochodzących od różnych samic bydła domowego. Pomimo tego, również w badaniach własnych, zaobserwowano zmienność pomiędzy powtórzeniami. Jednakże, w każdym z nich plemniki zamrożone w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris wykazywały lepsze wyniki w teście ZBA w porównaniu do tych, zamrożonych w Andromed<sup>®</sup>. Należy jednak podkreślić, że zastosowanie dwóch różnych rozrzedzalników miało na celu wykluczenie ich wpływu na wyniki testu wiązania z osłonką przejrzystą i nie służyło ocenie ich samych. Niezbędne jest kontynuowanie badań mających na celu dobór optymalnego rozrzedzalnika do kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra.

Wprowadzenie testu ZBA do protokołu oceny plemników najądrzowych żubra umożliwia zweryfikowanie zdolności zapłodnieniowej badanych gamet i podjęcie decyzji o ich dalszym przeznaczeniu do ART. Zastosowanie takiego testu, poprzez pominięcie etapu z wykorzystaniem prób biologicznych, umożliwia ocenę gamet bez wykorzystania cennego dla ochrony gatunku materiału.

## 8. WNIOSKI

W niniejszej pracy przedstawione zostały wyniki badań nad właściwościami *in vitro* oraz zdolnością zapładniającą plemników żubra. Podjęta tematyka miała na celu scharakteryzowanie oraz ustalenie efektywnego protokołu postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra w ramach doskonalenia procedur stosowanych w banku plemników tego gatunku. Przeprowadzone badania umożliwiły realizację zadań badawczych i pozwoliły na weryfikację postawionych w pracy hipotez.

Na podstawie przeprowadzonych analiz oraz uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Plemniki najądrzowe żubrów pozyskane pośmiertnie cechują się właściwościami kwalifikującymi je do kriokonserwacji, mimo gorszej ruchliwości i żywotności niż gamety gatunków pokrewnych;
2. Pozyskiwanie plemników z najądrzy żubrów w terminie bliższym sezonu rozrodczego zwiększa prawdopodobieństwo zakwalifikowania ich do mrożenia;
3. Rozrzedzalnik na bazie buforu Tris z dodatkiem żółtka jaja kurzego i glicerolu jest odpowiedni do kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra, a ruchliwość i żywotność otrzymanych po rozmrożeniu gamet pozwala na ich wykorzystania w ART takich jak zapłodnienie *in vitro*;
4. Wirowanie plemników najądrzowych żubra w gradiencie gęstości Percoll® przed procesem kriokonserwacji, poprawia ich jakość po rozmrożeniu;
5. Test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego jest odpowiedni dla plemników żubra i może stanowić cenne uzupełnienie rutynowo stosowanego protokołu ich ewaluacji.



## 9. PIŚMIENICTWO

1. Álvarez-Rodríguez M., Álvarez M., Anel-López L., López-Urueña E., Manrique P., Borragán S., Morrell J.M., de Paz P., Anel L. Effect of colloid (Androcoll-Bear, Percoll, and PureSperm) selection on the freezability of brown bear (*Ursus arctos*) sperm. *Theriogenology*. 2016. 1;85(6):1097-105.
2. Amann R.P, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014. 1;81(1):5-17.e1-3.
3. Arias M., Andara K., Briones E., Felmer R. Bovine sperm separation by swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol*. 2017. 17(2):126-132.
4. Aurini L.C., Whiteside D.P., Elkin BT, Thundathil JC. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm of plains bison (*Bison bison bison*) as a model for salvaging the genetics of wood bison (*Bison bison athabascae*). *Reprod Domest Anim*. 2009. 44(5):815-22.
5. Bailey J., Bilodeau J., Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*. 2000. 21(1):1-7.
6. Bavister, B. D., Yanagimachi, R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*. 1977. 16(2): 228-237.
7. Belala R., Fatmi S., Kaidi R., Iguer-Ouada M. Benefits of cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol loaded cyclodextrins in dog semen cryopreservation. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2016. 167: 22-27.
8. Blom E. The morphological estimation of the spermatozoa defects of bull II. The proposal of new classification of spermatozoa defects (in Polish). *Medycyna Weterynaryjna*. 1981. 37: 239-242.
9. Blommaert D., Franck T., Donnay I., Lejeune J.P., Detilleux J., Serteyn D. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. *Cryobiology*. 2016. 72(1):27-32.
10. Breithoff E., Harrison R., From ark to bank: extinction, proxies and biocapitals in ex-situ biodiversity conservation practices. *International Journal of Heritage Studies*. 2018. 26(1): 37-55.

11. Chatterjee S., Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev.* 2001. 59(4):451-8.
12. Chaveiro A., Cerqueira C., Silva J., Franco J., Moreira da Silva F. Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal. *Iran J Vet Res.* 2015.16(2):188-93.
13. Choi Y., Toyoda Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biology of Reproduction* 1998. 59:1328-1333.
14. Christensen P., Stryhn H., Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology.* 2005 Mar 1;63(4):992-1003.
15. Clarke A.G., The Frozen Ark Project: the role of zoos and aquariums in preserving the genetic material of threatened animals. *Int. Zoo Yb.* 2009. 43: 222-230.
16. Collins E.D., Flowers W.L., Shanks R.D., Miller D.J. Porcine sperm zona binding ability as an indicator of fertility. *Anim Reprod Sci.* 2008.1.104(1):69-82.
17. Comizzoli P., Mermillod P., Maugeat R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev.* 2000. 40(5):493-504.
18. Correa J.R., Zavos P.M. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology.*1996.1;46(7):1225-32
19. Costa M. Z., Oliveira, L. Z., Resende, M. V., Lucio, A. C., Perini, A. P., Miguel, M. C. V., Lima V. F. M. H. Induction of the acrosome reaction test to in vitro estimate embryo production in Nelore cattle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2010. 62, 771-777.
20. Czykier E., Krasieńska M. Cases of spermiogenesis in young European bison. *Acta Theriologica.* 2004. 49: 543-54.
21. Czykier E., Sawicki B., Krasieńska M. Postnatal development of the European bison spermatogenesis. *Acta Theriologica.* 1999. 44: 77-90.
22. Dackiewicz, J. 80 years of bison restitution in Białowieża Forest. *European Bison Conservation Newsletter.* 2009. 2, 123-128. Retrieved from <http://ojs.wisent.org/index.php/czasopismo/article/view/180>.
23. Dębski R., Pisarski T., Rzepołuż J., Szamatowicz M, Szymański W. Stanowisko polskiego towarzystwa ginekologicznego dotyczące technik

- wspomagane go rozrodu w leczeniu niepłodności. [dostęp:27.11.2016]  
<http://www.stomik.com/pliki/rekomendacjawspomaganierozrodu.pdf>
24. Demiaszkiewicz A.W., Filip-Hutsch K., Moskwa B., W. Telazjoza bydła i żubrów w Polsce. *Życie Weterynaryjne*. 2021. 96(5).
  25. Duszewska A. M., Olech W., Trzeciak P., Krzysiak M., Rapala L., Nowak Z., Dabrowski S. The preliminary results of in vitro production of the wisent hybrid embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 2014. 27. 219-219.
  26. Duszewska A.M., Gręda P., Baraniewicz M., Bielecki W., Nizański W., Partyka A., Tracz M., Nowak Z., Chełmońska-Soyta A., Olech W. Obtaining Wisent early blastocyst in vitro is a basic for protection and creation of biodiversity for this threatened species. *Reprod Domest Anim*. 2018.53(3):818-821.
  27. Duszewska, A.M., Baraniewicz-Kołek M., Wojdan J., Barłowska K., Bielecki W., Gręda P., Nizański W., Olech W. Establishment of a Wisent (*Bison bonasus*) Germplasm Bank. *Animals*. 2022. 12. 1239.
  28. Dziedzic T. Dzieje żubra w Puszczy Białowieskiej. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prace Historyczne*. 2008. 135. 83-91.
  29. Eberhardt M., Nizański W., Olech W., Prochowska S. Assisted reproductive techniques in wisents: achievements and further challenges. *Med Weter*. 2021. 77 (6). 279-283.
  30. Evenson D.P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA(®)) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016. 169. 56-75.
  31. Fazeli A.R., Steenweg W., Bevers M.M., de Loos F.A., van den Broek J., Colenbrander B. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet Rec*. 1993. 2;132(1):14-6.
  32. Fazeli A.R., Zhang B.R., Steenweg W., Larsson B., Bevers M.M., van den Broek J., Rodriguez-Martinez H., Colenbrander B. Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 1997.1;48(5):853-63.
  33. Fedyk S., Krasieńska M. Studies on the Spermatogenesis in European Bison and Domestic Cattle Hybrids. *Acta Theriologica*. 1971. XVI. 29: 449-464.
  34. Fedyk S., Sysa P., Chromosomes of European Bison, Domestic Cattle and their Hybrids. *Acta Therioogica*. 1971.XVI. 30: 465-470.

35. Filliers M., Rijsselaere T., Bossaert P., De Causmaecker V., Dewulf J., Pope C.E., Van Soom A. Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 degrees C) on sperm quality. *Theriogenology*. 2008. 70(9):1550-9.
36. Gallagher M.T., Smith D.J., Kirkman-Brown J.C. CASA: tracking the past and plotting the future. *Reprod Fertil Dev*. 2018. 30(6):867-874.
37. García-Álvarez O., Soler A.J., Maulen Z., Maroto-Morales A., Iniesta-Cuerda M., Martín-Maestro A., Fernández-Santos M.R., Garde J.J. Selection of red deer spermatozoa with different cryoresistance using density gradients. *Reprod Domest Anim*. 2016. 51(6):895-900.
38. Gibb Z., Aitken R.J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *Biomed Res Int*. 2016. 2016:9380609.
39. Goovaerts I.G., Hoflack G.G., Van Soom A., Dewulf J., Nichi M., de Kruif A., Bols P.E. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*. 2006. 15;66(2):323-30.
40. Graham J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*. 2001.3;68(3-4):239-47.
41. Gravance C.G., Garner D.L., Baumber J., Ball B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*. 2000;53(9):1691-703.
42. Gravance C.G., Vishwanath R., Pitt C., Garner D.L., Casey P.J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J Androl*. 1998. 19(6):704-9.
43. Herrick J. R., Assisted reproductive technologies for endangered species conservation: developing sophisticated protocols with limited access to animals with unique reproductive mechanisms, *Biology of Reproduction*. 2019.100(5):1158-1170.
44. Hishinuma M., Sekine J. Separation of canine epididymal spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. *Theriogenology*. 2004. 61(2-3):365-72.
45. Hossain M.S., Johannisson A., Wallgren M., Nagy S., Siqueira A.P., Rodriguez-Martinez H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl* 2011.13(3):406-19.
46. Hussain S. A., Lessard C., Anzar M. A strategy for improvement of post thaw quality of bison sperm. *Theriogenology*. 2013. 79, 108-115.
47. Iolchiev B. S., Abilov A. I., Tadzhieva A. V., Bagirov V. A., Nasibov Sh. N., Shaidullin, I. N., Klenovitskiy P. M., Kombarova N. A., Zhilinskii M. A. Biological

- integrity of bison epididymal sperm under cryoconservation and long storage. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. 2017. 52(2): 282-290.
48. Kadirvel G., Kathiravan P., Kumar S. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa. *Theriogenology*. 2011. 75(9):1630-9.
  49. Khan I.M., Cao Z., Liu H., Khan A., Rahman S.U., Khan M.Z., Sathanawongs A., Zhang Y. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. *Front Vet Sci*. 2021. 25;8:609180.
  50. Konyali C., Tomás C., Blanch E., Gómez E.A., Graham J.K., Mocé E. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology*. 2013;67(2):124-131.
  51. Kozdrowski R., Niżański W., Dubiel A., Olech W. Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011. 8;9:31.
  52. Krajewska M., Welz M., Brewczyński P., Orłowska B., Krzysztof A., Gruzlica bydłęca w bieszczadzkiej populacji żubrów. *Życie Weterynaryjne*. 2014.89(2).
  53. Krasieńska M. and Krasieński Z.A. Body mass and measurements of the European bison during postnatal development. *Acta Theriologica*. 2002. 47: 85-106.
  54. Krasieńska M. Crosses of European bison and domestic cattle, Part VI. *Acta theriol*. 1971.16. 26: 413-422.
  55. Krasieńska M. Crosses of wisent and domestic cattle V. *Acta theriol*. 1967. 1: 67-80.
  56. Krasieńska M. Międzypodzajowa hybrydyzacja między *Bos taurus dom.* Linnaeus, 1758 i przedstawicielami rodzaju *Bison* Smith. 1827. *Przeegl. Zool*. 1967. 11: 79-94.
  57. Krasinska M., Krasinski Z.A. Przebieg i dyspersja choroby nekrotycznego zapalenia napletka żubrów na terenie polskiej części Puszczy Białowieskiej. *Parki Narodowe i Rezerwaty Przyrody*. 2010. 29(2): 107-128.
  58. Krasieńska M., Krasieński Z.A. The Restitution of Bison in Captive Breeding in Poland. In: *European Bison*. Springer. 2013. Berlin, Heidelberg.
  59. Krasieński Z.A., Krasieńska M., Raczyński J. Lowland and lowland-Caucasian European bison in the Białowieża Forest, Chrońmy Przyrodę Ojczyzną. 2016. 72 (2): 100-109.

60. Krishnakumar S., Whiteside D.P., Elkin B., Thundathil J.C. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*). *Theriogenology*. 2011. 15. 76(2):252-60.
61. Księga Rodowodowa Żubra 2022, Białowieski Park Narodowy, Białowieża 2023.
62. Lee H.L., Kim S.H., Ji D.B., Kim Y.J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *J Vet Sci*. 2009.10(3):249-55.
63. Leibfried M. L., Bavister B. D. The effects of taurine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. *Gamete research*. 1981. 4(1): 57-63.
64. Lessard C., Danielson J., Rajapaksha K., Adams G. P., McCorkell R. Banking North American buffalo semen. *Theriogenology*. 2009. 71. 1112-1119.
65. Lessley B.A., Garner D.L. Distribution of Pz-peptidase in bovine epididymal and ejaculated semen. *Biol Reprod*. 1983. 28(2):447-59.
66. Lin H.L., Chen Y.H., Lin D.Y., Lai Y.Y., Wu M.C., Chen L.R. Silica-based colloid centrifugation enhances sperm quality in cockerel semen. *Br Poult Sci*. 2020. 61(1):86-91.
67. Lopes G., Soares L., Ferreira P., Rocha A. Tris-egg yolk-glycerol (TEY) extender developed for freezing dog semen is a good option to cryopreserve bovine epididymal sperm cells. *Reprod Domest Anim*. 2015. 50(1):97-103.
68. Luvoni G.C., Morselli M.G. Canine epididymal spermatozoa. A hidden treasure with great potential. *Reprod Domest Anim*. 2017. 52 Suppl 2:197-201.
69. Maroto-Morales A., Ramón M., García-Álvarez O., Montoro V., Soler A.J., Fernández-Santos M.R., Roldan E.R., Pérez-Guzmán M.D., Garde J.J. Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. *Theriogenology*. 2015. 84(9):1536-41.
70. Martinez-Alborcia M.J, Valverde A., Parrilla I, Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS One*. 2012. 7(5):e36550.
71. Martinez-Pastor F., Garcia-Macias V., Alvarez M., Chamorro C., Herraiz P, de Paz P., Anel L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*. 2006. 65. 471-485.
72. Martínez-Rodríguez C., Alvarez M., López-Urueña E., Gomes-Alves S., Anel-López L., Tizado J.E., Anel L., de Paz P. Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate in vitro and correlates with fertility. *Reprod Fertil Dev*. 2015.

73. Martins C. F., Driessen K., Melo Costa P., Carvalho-Neto J. O., de Sousa R. V., Rumpf R., Dode M. N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*. 2009. 116. 50-57.
74. Martins C.F, Rumpf R., Pereira D.C., Dode M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim Reprod Sci*. 2007. 101(3-4):326-31.
75. Mendes J.O. Jr., Burns P.D., De La Torre-Sanchez J.F., Seidel G.E .Jr. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*. 2003. 60(2):331-40.
76. Mocé E., Purdy P.H., Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci*. 2010. 118(2-4):236-247.
77. Morrell J.M. Artificial Insemination: Current and Future Trends. *Artificial Insemination in Farm Animals*. Red. Manafi M. wyd. InTech. 2011, under CC BY-NC-SA 3.0 license, 1-14.
78. Morrell J.M., Moffatt O., Sakkas D., Manicardi G.C., Bizzaro D., Tomlinson M., Nilsson H., Holmes P.V. Reduced senescence and retained nuclear DNA integrity in human spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *J Assist Reprod Genet*. 2004. 21(6):217-22.
79. Morrow E.H., Gage M.J.G. Consistent significant variation between individual males in spermatozoal morphometry. *J Zool* 2001. 254(2):147e53.
80. Nair S. J., Brar A. S., Ahuja C. S., Sangha S. P. S., Chaudhary K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Animal Reproduction Science*. 2006. 96(1-2), 21-29.
81. Neagu V.R., García B.M., Sandoval C.S., Rodríguez A.M., Ferrusola C.O., Fernández L.G., Tapia J.A., Peña F.J. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*. 2010.15;73(5):645-50.
82. Nizański W. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid. Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology*. 2006. 66:470-483.

83. Nizański W., Partyka A., Rijsselaere T. Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reprod Domest Anim.* 2012. 47 Suppl 6:215-21.
84. Noguchi M., Yoshioka K., Hikono H., Iwagami G., Suzuki C., Kikuchi K. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. *Zygote.* 2015. 23(1):68-75.
85. Oehninger S., Franken D.R., Ombelet W. Sperm functional tests. *Fertil Steril.* 2014.102(6):1528-33.
86. Olech W. Analysis of inbreeding in European bison. *Acta Theriol.* 1987. 32:373-87.
87. Olech W. The number of ancestors and their contribution to European bison (*Bison bonasus* L.) population. *Annals of Warsaw Agricultural University - SGGW, Animal Science.* 1999. 35: 111-117.
88. Oliveira L.Z., Arruda R.P., Celeghini E.C., de Andrade A.F., Perini A.P., Resende M.V., Miguel M.C., Lucio A.C., Hossepian de Lima V.F. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia.* 2012. 44(1):9-15.
89. Park N.C., Park H.J., Lee K.M., Shin D.G. Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation. *Asian J Androl.* 2003. 5(3):195-201.
90. Partyka A., Łukaszewicz E., Nizański W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology.* 2012. 77(8):1497-504.
91. Partyka A., Nizański W., Ochota M. Methods of Assessment of Cryopreserved Semen. *Current Frontiers in Cryobiology.* InTech; 2012. dostęp z <http://dx.doi.org/10.5772/33565>.
92. Partyka A., Rodak O., Bajzert J., Kochan J., Nizański W. The Effect of L-Carnitine, Hypotaurine, and Taurine Supplementation on the Quality of Cryopreserved Chicken Semen. *Biomed Res Int.* 2017. 2017:7279341.
93. Parusel, J. B. If it had not been for the European bison of Pszczyna. *European Bison Conservation Newsletter.* 2019. 12: 69-78. dostęp z <http://ojs.wisent.org/index.php/czasopismo/article/view/36>.



94. Pegge R.B., Krishnakumar S., Whiteside D., Elkin B., Parlevliet J.M., Thundathil J.C. Sperm characteristics in plains (Bison bison bison) versus wood (Bison bison athabasca) bison. *Theriogenology*. 2011. 15;75(7):1360-70.
95. Pérez-Garnelo S. S., Oter M., Borque C., Talavera C., Delclaux M., Martínez - Nevado E., Palasz A. T., De la Fuente J. Post-thaw viability of European bison (Bison bonasus) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous in vitro fertilization assay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2006. 37. 116-125.
96. Plumb G., Kowalczyk R., Hernandez-Blanco J.A. Bison bonasus. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T2814A45156279. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T2814A45156279.en>. Dostęp z 30.06. 2023.
97. Polit M., Prochowska S., Nizański W. Comparison of the characteristics of chinchilla epididymal semen after collection, storage at 5°C and cryopreservation. *Reprod Domest Anim*. 2018.53 Suppl 3:29-36.
98. Prochowska S., Napierkowska S., Czech B., Nizański W. Feline sperm head morphometry in relation to male pedigree and fertility. *Theriogenology*. 2023.15;208:119-125.
99. Pucek Z., Belousova I.P., Krasieńska M., Krasieński Z.A., Olech W. European Bison. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Bison Specialist Group. IUCN. 2004. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. ix + 54 pp.
100. Purdy P. H., Graham J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 2004. 48, 36-45.
101. Raczynski J., Bołbot M., Księga Rodowodowa Żubrów – historia i współczesność, Białowieża. 2009. ISBN 978-83-87054-83-0.
102. Ramón M., Soler A.J., Ortiz J.A., García-Alvarez O., Maroto-Morales A., Roldan E.R., Garde J.J. Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. *Biol Reprod*. 2013. 7;89(5):110.
103. Rozati H., Handley T., Jayasena C.N. Process and Pitfalls of Sperm Cryopreservation. *J Clin Med*. 2017.19. 6(9):89.
104. RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
105. Samardzija M., Karadjole M., Matkovic M., Cergolj M., Getz I., Dobranic T., Tomaskovic A., Petric J., Surina J., Grizelj J., Karadjole T. A comparison of BoviPure

- and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci.* 2006. 91(3-4):237-47.
106. Santiago-Moreno J., Estes M.C., Villaverde-Morcillo S., Toledano-Deaz A., Castano C., Velazquez R., Lopez-Sebastian A., Goya A.L., Martínez J.G. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian J Androl.* 2016.18(6):882e8.
107. Schwerk A., Klich D., Wójtowicz E., Olech W. Impact of European Bison Grazing (Bison bonasus (L.) on Species and Functional Traits of Carabid Beetle Assemblages in Selected Habitats in Poland. *Biology.* 2021. 10. 123.
108. Shaken M., Mamoei M., Roshanfekar H., Mirzadeh Kh. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2008. 3. 400-408.
109. Sieme H., Oldenhof H. Sperm cleanup and centrifugation processing for cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2015.1257:343-52.
110. Siminska E., Bech J., Bernacka H., Polska ostoja żubra - największego ssaka Europy. Cz.1. Historia żubra i jego losy na ziemiach polskich. *Przegląd hodowlany.* 2011. 5.
111. Singina G., Bagirov V., Taradajnic T., Shedova E., Lebedeva I., Zinovieva N. P 236. In vitro production of cattle-wisent hybrid embryos; Special Issue: Proceedings of the 20th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) and the 13th Conference of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA). 2016. Lisbon, Portugal, 27-29.
112. Somfai T., Bodó S., Nagy S., Papp A.B., Iváncsics J., Baranyai B., Gócza E., Kovács A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2002. 37(5):285-90.
113. Ström Holst B., Larsson B., Linde-Forsberg C., Rodriguez-Martinez H. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J Reprod Fertil.* 2000.119(2):201-6.
114. Szytych D. Żubr w kulturze. *Życie Weterynaryjne.* 2014, 89.10.
115. Tajik P., Arman A., Taktaz T. Bovine epididymal sperm morphology obtained from caput, corpus and cauda epididymides. *Pak J Biol Sci.* 2007.1.10(21):3936-9.
116. Thor K.A., Ołdak K.A., Klich D., Gajewska K., Popczyk B., Klimaszewski K., Olech W., Artificial Waterholes for European Bison as Biodiversity Hotspots in Forest

- Ecosystems: Ecological Effects of Species Reintroduction Activities. *Diversity*. 2023.15.446.
117. Thun R., Hurtado M., Janett F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 2002. 57(3):1087-94.
  118. Tomlinson M.J., Naeem A. CASA in the medical laboratory: CASA in diagnostic andrology and assisted conception. *Reprod Fertil Dev*. 2018. 30(6):850-859.
  119. Vilela C.G., Marquez J.M., Graham J.K., Barfield J.P. Cryopreservation of bison epididymal sperm: A strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. *Theriogenology*. 2017. 89:155-161.
  120. Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000.2;60-61:481-92.
  121. Watson, P. F. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *The Veterinary Record*. 1975. 97(1), 12-15.
  122. Wheeler M.B., Seidel G.E. Jr. Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm. *Gamete Res*. 1987. 18: 237-250.
  123. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *Physiology of Reproduction*. 1994. 189-315.
  124. Yang S. X., Adams G. P., Palomino J. M., Huanca W. F., Lessard C., Rajapaksha K., Anzar M. Cryopreservation of bison semen without exogenous protein in extender and its fertility potential in vitro and in vivo following fixedtime artificial insemination. *Theriogenology*. 2020. 152. 156-164.
  125. Yániz J.L., Soler C., Santolaria P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Anim Reprod Sci*. 2015.156:1-12.
  126. Zaniewski L. Observations on the Cross-Breeding the European Bison With Domestic Cattle of the Polish Red Breed, *Acta Theriologica*.1967. XII. 33: 481 - 486.
  127. Zhang B.R., Larsson B., Rodriguez-Martinez H. Influence of batches of bovine oocytes on the outcome of an intact zona pellucida binding assay and in vitro fertilization. *Int J Androl*. 1995.18(4):213-20.

## 10. STRESZCZENIE

### **Badania nad właściwościami *in vitro* oraz zdolnością zapładniającą plemników żubra (*Bison bonasus*) w aspekcie doskonalenia metod kriokonserwacji gamet męskich tego gatunku**

Żubr (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) to najstarszy żyjący przedstawiciel rodziny krętorogich oraz największy lądowy ssak Europy, zamieszkujący niegdyś niemal każdą europejską puszcze. Wieki intensywnych polowań, kłusownictwo, rozwój cywilizacyjny oraz konflikty zbrojne sprawiły, że w 1919 roku jego populacja wymarła w naturalnym środowisku. Na całym świecie w ogrodach zoologicznych i zagrodach pokazowych przetrwały zaledwie 54 żubry. Gatunek ten, poprzez osiągnięcie liczebności bliskiej wyginięciu, uległ efektowi genetycznego wąskiego gardła (z ang. genetic bottleneck), czyli zmniejszenia populacyjnej różnorodności genetycznej. Niewielka liczebność populacji żubra, w powiązaniu z wysokim stopniem homogenetyczności, stanowi jedno z istotnych zagrożeń dla przyszłości całej populacji. Stąd, nie liczebność osobników, a zachowanie dobrostanu oraz różnorodności genetycznej stanowi obecnie wyzwanie w programie ochrony tego gatunku. Doskonałym uzupełnieniem programów hodowlanych jest wprowadzenie technik wspomaganego rozrodu (Assisted Reproductive Techniques, ART), u podstaw których znajdują się pozyskiwanie i kriokonserwacja gamet.

Wiele aspektów dotyczących charakterystyki gamet żubra, ich oceny oraz możliwości kriokonserwacji nie zostało poznanych. Co więcej, dotychczas uzyskane wyniki zapłodnienia *in vitro* oraz transferu zarodków są niesatysfakcjonujące. Potrzeba uzupełnienia wiedzy o charakterystykę plemników najądrzowych żubra pod kątem wykorzystania ich w ART stała się przyczyną realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Nadrzędnym celem przedstawionych badań było ustalenie efektywnego protokołu postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra w ramach doskonalenia procedur stosowanych w banku plemników tego gatunku.

Cel pracy zrealizowano w oparciu o cztery zadania badawcze. W toku badań szczegółowo scharakteryzowano plemniki najądrzowe żubra (zadanie I) oraz oceniono efekty ich kriokonserwacji w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu (zadanie II). Oceniono również wpływ selekcji plemników za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® na ich porozmrożeniową jakość (zadanie III)

oraz sprawdzono możliwość wykorzystania testu wiązania z osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego (ZBA) do oceny jakości pozyskanych plemników najądrzowych żubra (zadanie IV).

Przedstawiono morfologię, morfometrię, a także cechy morfo-funkcjonalne plemników pozyskanych z najądrzy żubrów. Otrzymane wyniki kriokonsrwacji gamet w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris z dodatkiem żółtka jaja kurzego i glicerolu przemawiają za możliwością wykorzystania pozyskanych i mrożonych w ten sposób plemników do tworzenia rezerwy genetycznej dla tego gatunku. Udowodniono również, że wirowanie w gradiencie gęstości Percoll<sup>®</sup>, przed procesem kriokonserwacji, poprawia porozmrożeniową jakość plemników. Wykazano także, że test wiązania z heterologiczną osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego jest odpowiedni do oceny plemników najądrzowych żubra i powinien być włączony do protokołu rutynowej oceny kriokonserwowanych gamet tego gatunku.

## 11. SUMMARY

### **Research on the *in vitro* properties and fertilizing capacity of wisent (*Bison bonasus*) spermatozoa in terms of improving methods of cryopreservation of male gametes of this species**

The wisent (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) is the oldest living representative of the Bovidae family and the largest land mammal in Europe, once inhabiting almost every European forest. Centuries of intense hunting, poaching, civilization development, and armed conflicts caused its population to become extinct in its natural environment in 1919. Only 54 wisents survived in zoos and enclosures around the world. This species, by reaching a population close to extinction, has suffered from the genetic bottleneck effect, i.e. a reduction in population genetic diversity. The small size of the wisent population, combined with the high degree of homogeneity, constitutes one of the significant threats to the future of the entire population. Hence, it is not the number of individuals, but maintaining the well-being and genetic diversity that is currently the challenge in the conservation program of this species. A perfect complement to breeding programs is the introduction of Assisted Reproductive Techniques (ART), based on the acquisition and cryopreservation of gametes.

Many aspects regarding the characteristics of wisent gametes, their evaluation, and the possibility of cryopreservation have not been known. Moreover, the results of *in vitro* fertilization and embryo transfer obtained so far are unsatisfactory. The need to supplement knowledge with the characteristics of wisent epididymal sperm in terms of their use in ART was the reason for the implementation of this doctoral thesis. The primary goal of the presented research was to establish an effective protocol for dealing with wisent epididymal sperm as part of improving the procedures used in the sperm bank of this species.

The aim of this study was achieved based on four research tasks. During the research, wisent epididymal sperm were characterized in detail (task 1) and the effects of their cryopreservation in an extender based on Tris buffer, egg yolk, and glycerol were assessed (task 2). The impact of sperm selection using Percoll® density gradient centrifugation on their post-thaw quality (task 3) was also assessed, and the possibility of using the bovine oocyte zona pellucida (ZBA) binding test to assess the quality of the obtained wisent epididymal sperm was evaluated (task 4).

The morphology, morphometry, and morpho-functional features of sperm obtained from the epididymis of wisents were presented. The obtained results of cryopreservation of gametes in an extender based on Tris buffer with the addition of egg yolk and glycerol support the possibility of using sperm obtained and frozen in this way to create a genetic reserve for this species. It has also been proven that Percoll® density gradient centrifugation, before the cryopreservation process, improves the post-thaw quality of sperm. The bovine oocyte heterologous zona pellucida binding test has also been shown to be appropriate for the evaluation of wisent epididymal spermatozoa and should be included in the protocol for routine evaluation of cryopreserved gametes of this species.

## **12. ZAŁĄCZNIK 1**

Realizacja zadań badawczych I i II oraz otrzymane wyniki zostały przedstawione w publikacji:

Eberhardt M., Prochowska S., Partyka A., Bielas W., Van Soom A., Olech W., Nizański W. The morphology, morphometry and functionality of fresh and cryopreserved wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa. *Sci Rep.* 2023. 24;13(1):13866. doi: 10.1038/s41598-023-40798-y.





OPEN

# The morphology, morphometry and functionality of fresh and cryopreserved wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa

Maria Eberhardt<sup>1</sup>✉, Sylwia Prochowska<sup>1</sup>, Agnieszka Partyka<sup>1</sup>, Wiesław Bielas<sup>1</sup>, Ann Van Soom<sup>2</sup>, Wanda Olech<sup>3</sup> & Wojciech Niżański<sup>1,2</sup>

Epididymal spermatozoa obtained *post mortem* are considered a valuable source of genetic material which is often irrevocably lost. This makes these gametes constitute a key element in protection and restitution programs. The wisent (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) is a species that survived in zoos after extinction from its natural habitat. This resulted in a narrowing of the genetic pool of the whole population, which is at present derived from only 12 ancestors. Currently, wisent protection programs are aimed at preserving the genetic diversity by establishing a germplasm bank. The objective of this study was to comprehensively characterize the morphology, morphometry and functionality of wisent epididymal spermatozoa and evaluate the effectiveness of their cryopreservation in extender based on Tris buffer and chicken egg yolk. The median total number of spermatozoa obtained from one individual was  $1985.0 \times 10^6$  ( $62.5 \times 10^6$ – $7452.0 \times 10^6$ ). These gametes were characterized by median: 40.0% (0.5–70.0%) subjective motility, 69.8% (32.5–90.0%) viability and 54.3% (10.5–83.3%) normal morphology. The sperm head had a median size of 5.0  $\mu\text{m}$  (3.5–6.7  $\mu\text{m}$ ) width, 8.5  $\mu\text{m}$  (6.4–11.3  $\mu\text{m}$ ) length and 36.9  $\mu\text{m}^2$  (23.7–48.6  $\mu\text{m}^2$ ) surface area. The viable population of the obtained gametes was characterized by median values 53.2% (4.5–80.3%) of intact sperm membrane, 50.8 (26.0–76.6%) of intact acrosome, 0.4% (0–98.7%) of fragmented chromatin, 5.9% (0.0–88.8%) of cells with high mitochondrial potential and 42.1% (8.3–63.7%) without lipid peroxidation. The viable population of the frozen/thawed gametes was characterized by median values: 18.4% (2.4–57.9%) of intact sperm membrane, 35.1 (11.9–56.7%) of intact acrosome, 0.07% (0–89.2%) of fragmented chromatin, 12.8% (0.0–49.7%) of cells with high mitochondrial potential and 16.3% (2.2–53.6%) without lipid peroxidation. Due to the material originating from a relatively large number of wild individuals, the research presented here contributed to the description of certain species standards for the assessment of wisent epididymal spermatozoa. The presented effect of cryopreservation on these gametes justifies the use of an extender based on Tris buffer with the addition of chicken egg yolk. The obtained effects are satisfactory from the point of view of preserving valuable genetic material and their use in ART.

## Abbreviations

AO	Acridine orange dye
ART	Assisted reproductive techniques
FT	Freezing/thawing; frozen/thawed
IUCN	The International Union for Conservation of Nature
PI	Propidium iodide
PVA	Polyvinylpyrrolidone
ROS	Reactive oxygen species

<sup>1</sup>Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Plac Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław, Poland. <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium. <sup>3</sup>Department of Animal Genetics and Conservation, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8 St., 02-786 Warsaw, Poland. ✉email: maria.eberhardt@upwr.edu.pl; wojciech.nizanski@upwr.edu.pl

Gametes that have reached their final place of deposition—cauda epididymis, are equipped in a properly shaped acrosome and motility potential<sup>1,2</sup>. Retrieval and preservation of those spermatozoa gives opportunities to obtain offspring when ejaculation is no longer possible—in cases when orchiectomy is essential for an individual's health or sudden death<sup>2,3</sup>. The possibility of using epididymal spermatozoa has been proven in many domestic and wild species, resulting in these gametes being increasingly considered as a valuable source of genes which, in many cases, would otherwise be lost irrevocably<sup>2,3</sup>. In the case of endangered species, epididymal spermatozoa are often the only legal and ethical means of preserving genetic material from an individual. Therefore, the gametes obtained in this way constitute an invaluable treasure for protection and restitution programs<sup>2,4</sup>.

The wisent (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758), otherwise known as the European bison, is a species that survived after extinction from the natural habitat<sup>4</sup>. Thanks to extensive international efforts, the wild population has been reestablished and the number of individuals has been growing constantly. In 2020 its status in the IUCN Red List was changed to “Near Threatened”<sup>5</sup>. However, this species has passed through the bottleneck. The entire population has only 12 ancestors, which resulted in a narrow genetic pool. Moreover, it is still a species with multiple small, fragmented populations<sup>6</sup>. This makes the wisent subject to inbreeding depression which can negatively affect birth weight and survival, reproduction, immunity to diseases, environmental stress and predation<sup>7</sup>. All of these factors carry risks not only for individuals, but for the entire herds. Currently, European bison protection programs are aimed at preserving valuable genes and slowing down the loss of biodiversity by establishing a wisent germplasm bank and working on implementation of Assisted Reproductive Techniques (ART) to avoid possible future inbreeding<sup>4,5</sup>.

Assisted reproductive techniques are a great achievement not only in the reproduction of livestock or companion animals, but also in the dynamically developing methods of wild species protection programmes<sup>4</sup>. However, to be successful in their implementation, it is necessary to thoroughly understand the reproductive physiology of a given species and the characteristics of its gametes. The possibility of using wisent epididymal spermatozoa collected post mortem and stored in liquid nitrogen for ART was published in several papers<sup>8–11</sup>. However, the comprehensive characterisation of the spermatozoa obtained from the wisent's epididymal tails with the basic methods, morphometry and flow cytometry has not been described thus far.

Fluorescence staining and flow cytometry assessment allow one to look at the structure of the sperm and thus make a functional assessment<sup>12</sup>. So far, the use of flow cytometry to characterise wisent spermatozoa has been described in one paper and involved only four individuals<sup>10</sup>.

The morphometric measurements of sperm heads have been demonstrated in males of many animal species not only mammals<sup>13–16</sup> but also insects, fish<sup>17</sup> and birds<sup>18</sup>. In stallions, boars and humans, the correlation between morphometric measurements and fertility has been described<sup>17</sup>. However, so far, the morphometry of sperm heads has been presented in only four wisent individuals<sup>11</sup>.

The objective of this study was to provide a comprehensive description of the morphology, morphometry and functionality of wisent epididymal spermatozoa. The material came from a relatively large group of wild individuals, which makes the obtained results a starting point for further research in the field of wisent reproduction. The second aim was to evaluate the effectiveness of cryopreservation of these gametes in the extender based on Tris buffer and egg yolk.

## Results

**Characteristics of wisent epididymal spermatozoa obtained post mortem.** The total sperm count, subjective motility, percentage of live and morphologically normal wisent spermatozoa obtained post mortem are presented in Table 1. There was huge inter-individual variability, which was related to the month of collection—significant moderate negative correlation was found for total sperm count and subjective motility, but not for the rest of assessed semen parameters. Similar correlations were not observed between semen parameters and animal age. Significant correlations are shown in Fig. 1. The total number of isolated spermatozoa and their subjective motility decreased with distance from the breeding season. Other Spearman correlation results can be found in the supplementary file.

Morphometric measurements of wisent epididymal spermatozoa heads are presented in Table 2.

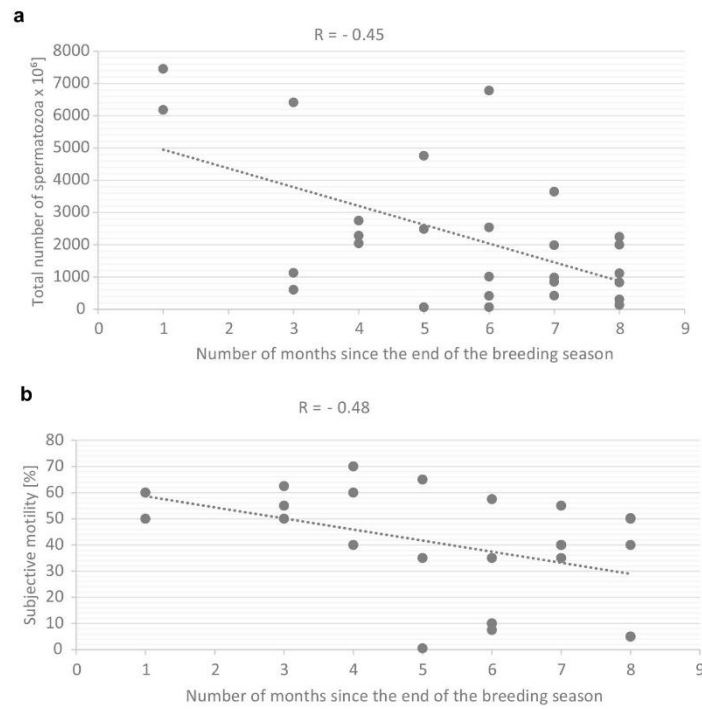
The results of functional characteristics of wisent epididymal spermatozoa assessment by flow cytometry are presented in Table 3.

### Evaluation of the effectiveness of cryopreservation of wisent epididymal spermatozoa in the extender based on Tris buffer and egg yolk.

Cryopreservation significantly lowered the percentage of live and motile spermatozoa. However, this process had no significant effect on the morphology of the gametes. The comparison of results of the basic evaluation of wisent epididymal spermatozoa before and after cryopreservation are presented in Fig. 2.

	The total number of spermatozoa [ $\times 10^6$ ]	Subjective motility [%]	Live [%]	Normal morphology [%]
N	27	27	27	27
Min	62.5	0.5	32.5	10.5
Max	7452	70.0	90.0	83.3
Median	1985	40.0	69.8	54.3

**Table 1.** Characteristics of wisent epididymal spermatozoa collected post mortem, n = 27.



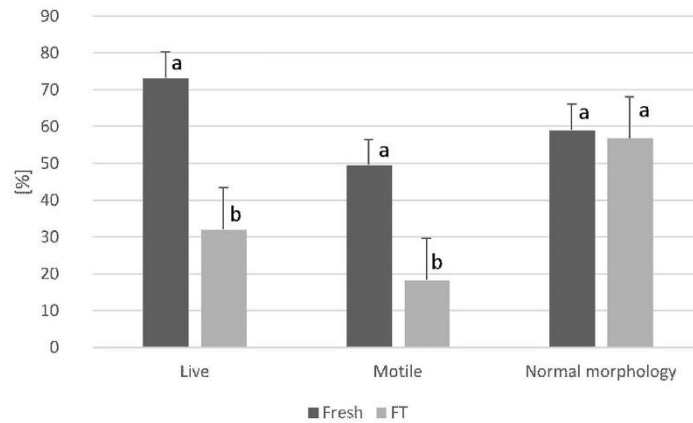
**Figure 1.** Results of Spearman's rank correlation coefficient between breeding season and sperm parameters: (a) total number of spermatozoa; (b) subjective motility,  $n=27$ ,  $p < 0.05$ .

	Length [ $\mu\text{m}$ ]	Width [ $\mu\text{m}$ ]	Surface area [ $\mu\text{m}^2$ ]
N	1200	1200	1200
Min	6.4	3.5	23.7
Max	11.3	6.7	48.6
Median	8.5	5.0	36.9

**Table 2.** Morphometric measurements of wisent epididymal sperm heads—length, width, surface area.  $n=1200$  spermatozoa.

	Live cells with intact sperm membrane [%]	Live cells with intact acrosome [%]	Cells with fragmented chromatin [%]	Live cells without lipid peroxidation [%]	Life cells with high mitochondrial activity [%]
N	27	27	27	27	27
Min	4.5	26.0	0	8.3	0
Max	80.3	76.6	98.7	63.7	88.8
Median	53.2	50.8	0.4	42.1	5.9

**Table 3.** The functional characteristics of wisent epididymal spermatozoa assessed by flow cytometry ( $n=27$ ).

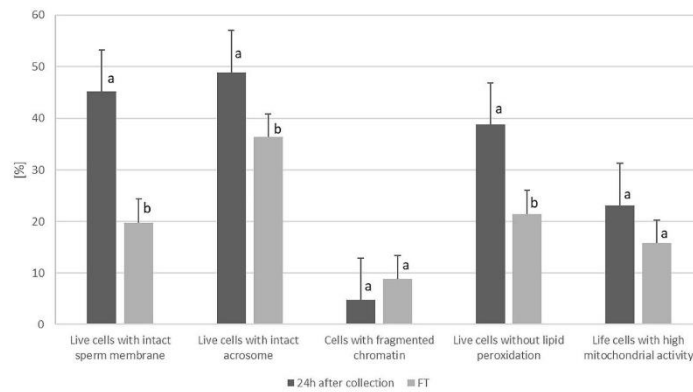


**Figure 2.** The comparison of viability, motility and morphology of spermatozoa before (fresh) and after cryopreservation (FT), data presented as mean mean  $\pm$  SE; (a, b) within each parameter are significantly different ( $p < 0.05$ ) (n = 20).

The comparison of obtained results of functional spermatozoa assessment after freezing and thawing process by flow cytometry with initial values (24 h after collection) are presented in Fig. 3. Among the parameters assessed by flow cytometry, significant differences before and after thawing were found for the percentage of live spermatozoa characterised by: intact sperm membrane, intact acrosome, and presence of lipid peroxidation ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences in the percentage of spermatozoa characterised with high mitochondrial potential and fragmented chromatin before and after the cryopreservation process.

### Discussion

Epididymal sperm is a treasure for the protection of biodiversity in the wildlife world. In the case of wisent, it is the only way to preserve genes that would be otherwise lost with the death of an individual. However, in order to fully use this hidden potential, it is necessary to expand knowledge in this area. Although the European bison is one of the well-known protected animals, many aspects of its reproduction have still not been described. In the available literature, the process of spermatogenesis in this species is described in detail, however the male gametes of wisent have still not been fully characterised. Therefore, this article presents the properties of wisent epididymal spermatozoa such as morphology, morphometry and functionality—for the first time characterised



**Figure 3.** The comparison of functional characteristics of wisent spermatozoa 24 h from collection and after cryopreservation (FT) assessed by flow cytometry. Data presented as mean  $\pm$  SE; (a, b) within each parameter are significantly different ( $p < 0.05$ ) (n = 20).

on the basis of material obtained from such a vast number of wild individuals. Due to the mentioned lack of information regarding European bison, the authors of this article compared obtained results with other representatives of the bovidae family: Cattle (*Bos taurus*) and two subspecies of the American bison—Plains bison (*Bison bison bison*) and Wood bison (*Bison bison athabasca*).

The median amount of gametes obtained from the wisent individual was  $1985 \times 10^6$  ranged from  $62.5 \times 10^6$  to  $7452 \times 10^6$  which is higher than results observed in the Plains bison which range from  $146$  to  $830 \times 10^{619}$  and cattle bulls results, which ranged from  $440 \times 10^6$  to  $1100 \times 10^{620,21}$ . The median percentage of live spermatozoa assessed by the eosin dye was on 69.8%, which is lower than results observed in domestic cattle bull epididymal spermatozoa—86.2%<sup>22</sup>. The obtained wisent spermatozoa were characterised by 40% (0.5–70.0%) median motility which is lower in comparison to the motility of Plains bison which was evaluated as 71.7%<sup>23</sup>–78.0%<sup>24</sup> and Wood bison—62.0%<sup>24</sup>. The subjective motility was also lower than this evaluated for cattle epididymal sperm which ranges from 64.4<sup>20</sup> to 80.0%<sup>21</sup>.

The median percentage of morphologically normal spermatozoa obtained from wisents epididymides was 54.3% ranging from 10.5 to 83.3%. Similar results were obtained in American bison when the average percentage of normal sperm was ranging from  $56.8 \pm 16.0$  to  $70.7 \pm 19.4$ %<sup>25</sup>.

Morphometric measurements showed that the head of wisent spermatozoa is characterised by median: width  $5.0 \mu\text{m}$  (3.5–6.7  $\mu\text{m}$ ), length  $8.5 \mu\text{m}$  (6.4–11.3  $\mu\text{m}$ ) and an area  $36.9 \mu\text{m}^2$  (23.7–48.6  $\mu\text{m}^2$ ). The obtained results are adequate to the previously described measurements on a smaller number of wisent specimens ( $n = 4$ )<sup>11</sup>. Measured dimensions are similar in both subspecies of the American bison<sup>26</sup>. Spermatozoa head parameters measured in wisents like: width and area are greater than in cattle bull gametes<sup>27</sup> and smaller in case of head length. Morphometric measurements using the computer-assisted sperm morphometry analysis (CASMA) system have been performed in many animal species<sup>11,13,14,17–19,26,28</sup>. The main goal of the cited research is to find a correlation between the sperm heads morphometry and male fertility. The relationship between fertility and morphometry has been proven in red deer<sup>29</sup> and ram<sup>30,31</sup>. Similar relationships could not be proven in studies on tomcat urethral semen<sup>14</sup>.

The obtained results of manual measurements may be the starting point for similar research on European bison. However, in order to fully use the potential of morphometric measurements and relate them to other sperm assessment parameters, it is necessary to continue research using CASMA systems and to separate sperm subpopulations using it.

Flow cytometry assessment revealed that samples obtained from wisent epididymides are characterised by median 53.2% of spermatozoa with intact sperm membrane which is lower than in bull epididymal sperm<sup>32</sup>.

The percentage of spermatozoa with an intact acrosome was also lower than that of domestic cattle bull<sup>32</sup>. However, in the cited article, the authors describe that the material was being prepared for analysis within 2 h after collection<sup>32</sup>, the longer period between collection and evaluation may be one of the reasons for the described differences in spermatozoa parameters.

The results of the assessment by flow cytometry were worse compared to those previously described by the authors<sup>10</sup>. However, in the cited study, the spermatozoa were qualified for cryopreservation on the basis of subjective motility, eliminating the samples with inferior quality, which possibly explains the differences in the mean percentages of some parameters.

When considering the presented results, it should be taken into account that all gametes used in this study were collected immediately after the death of the individuals, but each eliminated animal was qualified for it due to serious injury, illness or great age. This may be the reason for differences in the quality between the epididymal spermatozoa of the wisent and other species, the epididymides of which were obtained in abattoirs during technological slaughter. What is more, the material used in the present study was obtained outside the breeding season, which may also affect the parameters of the isolated gametes.

The second aim of the presented research was to evaluate the results and experience gained during freezing wisent spermatozoa from 20 living in the wild individuals.

The greatest drawback in research on the wild animals reproductive physiology is a low availability of biological material. This creates limitations in adaption ART in those species. Hence appears the need to use material coming from closely related non endangered species as a model for selecting the best protocol for evaluation and dealing with gametes collected from wild individuals<sup>33</sup>. The limited number and great value of the collected material did not allow for studying different extenders. For this reason, it was decided to use an extender with proven usefulness described in publications on the freezing of semen of other members of the Bovidae family<sup>28,32–34</sup> and had been previously checked in a smaller number of wisent individuals<sup>9</sup>. According to the authors' knowledge, the results presented in this study are the first such comprehensively describing the effects of cryopreservation of wisent epididymal spermatozoa. The authors made an attempt to adapt well-known methods that are part of the gold standard in animal semen evaluation to this wisent population. This makes the presented research somewhat pioneering, but also poses many difficulties in assessing these gametes due to the small amount of information described so far in this species.

Particularly noteworthy are the significant differences between fresh and thawed samples in the percentage of spermatozoa with an intact sperm membrane, due to its importance for the proper functioning of the entire cell related to the viability, motility and capacity to interact with the extracellular environment<sup>12</sup>. These differences ranged from 4.50 to 63.76%. That could have also influenced the loss of the percentage of motile spermatozoa observed in examined samples which ranges from 0.00 to 59.00%. However, the average total motility after thawing was similar to the result from the pilot study on the use of wisent epididymal sperm to obtain hybrids with domestic cattle by artificial insemination<sup>9</sup>. The obtained subjective motility was lower than the percentage observed in Plains bison and Wood bison epididymal spermatozoa frozen in Tris and egg yolk containing extender<sup>18</sup>.

To fulfill its role, spermatozoa have to be equipped with a properly built acrosome allowing its cargo to penetrate the zona pellucida<sup>12</sup>. For this reason, acrosome integrity is the important feature assessed during spermatozoa evaluation<sup>12</sup>. In the present study, the deterioration of the percentage of sperm with an intact acrosome was observed. Losses during the freezing/thawing process ranged from 0.36 to 40.34% and were lower in comparison to the level of those related to sperm membrane integrity. Nevertheless, those changes were not surprising and were also observed in thawed epididymal sperm of domestic cattle<sup>32</sup>.

The cryopreservation process had no significant impact on the chromatin status. What's worth noticing, even after freezing–thawing DFI % remained on relatively low level, which is promising in the context of the use of these spermatozoa for ART.

When assessing the effectiveness of the cryopreservation of wisent epididymal spermatozoa, certain limitations should be taken into account, which are related both to the origin of the sperm, the method of its collection and the process of freezing / thawing itself. Significant limitation to the final effects of cryopreservation of the described sperm is their origin. Although the possibility of the effective use in ART of epididymal sperm has been described in many species of farmed and wild animals, it has also been shown that in comparison with ejaculated semen there seems to be a difference in sperm movement characteristics lower velocity, less straightness and linearity<sup>3,32</sup>. In addition, the incision method used to collect epididymal sperm favours the contamination of the samples with tissue detritus, which may additionally reduce the post-freezing quality of the spermatozoa<sup>10</sup>.

All these factors can exacerbate the damage that results from the stress generated during the freezing process itself, i.e. cold shock, osmotic and toxic stresses connected to the exposure to cryoprotectants and ice formation<sup>12</sup> and results in impaired fertility by comparison with fresh semen. The reduction arises from both a lower viability post-thaw and sublethal dysfunction in a proportion of the surviving subpopulation<sup>35</sup>. This was clearly visible in obtained results where in all evaluated parameters similar deterioration was observed except percentage of morphologically normal, damaged chromatin and with high mitochondrial potential spermatozoa.

Another adversity faced by male gametes and basically every living cell is oxidative stress, which can be described as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the possibility of their neutralisation by antioxidants. However, it is noteworthy that the right amount of them is crucial in the process of capacitation, acrosomal reaction and fusion with the oocyte<sup>12</sup>. Nevertheless, the disturbance of the aforementioned balance and thus the excess of ROS leads to the destruction of nucleic acids, proteins, lipids and carbohydrates, ultimately leading to the cell's death<sup>36</sup> and might lead to lowered male fertility<sup>12</sup>. Spermatozoa are particularly exposed to oxidative stress during the cryopreservation process which certainly contributed to the worse results of the parameters tested compared to the initial values<sup>36–38</sup>. Immature and morphologically abnormal spermatozoa and seminal leukocytes are the main sources of ROS in ejaculates<sup>12</sup>. For this reason, even if it was not evaluated in this study, it should be taken into consideration that cryopreserved wisent spermatozoa were already initially characterised by an increased percentage of immature and morphologically abnormal spermatozoa and the presence of leukocytes due to the above-mentioned origin of gametes. All this together could be the reason for the increased percentage of lipid peroxidation in the assessed spermatozoa.

Cryopreservation, despite its many undeniable advantages, is an invasive process for gametes<sup>35</sup>. The described changes in European bison spermatozoa were not surprising because they result from the specificity of the process itself and have been extensively described in many species of animals, including other representatives of the Bovidae family<sup>28,32–35</sup>. In addition, obtaining sperm from the epididymis of sick and eliminated animals could have further limited its quality. To the knowledge of the authors, there are no minimum requirements for epididymal sperm as there are for ejaculated semen. However, when assessing frozen spermatozoa as a source of genes that would be irretrievably lost, the number of gametes obtained from each of the preserved epididymides is sufficient to be used in ART.

## Conclusions

The research carried out, due to the material from a relatively large number of individuals of protected species, contributed to the description of certain set points for the assessment of the quality of samples available for banking. To our knowledge, this is the first study that characterises wisent epididymal spermatozoa in such a broad way, consequently increasing the general knowledge about this protected species.

In research on maintenance of biodiversity, all preserved genetic material is invaluable. The obtained results of cryopreservation of wisent epididymal spermatozoa with the use of an extender based on Tris buffer with the addition of chicken egg yolk allowed to preserve the genetic material of all individuals in a quality sufficient for use in the Assisted Reproductive Technology. Nevertheless, research on their preservation should be continued to fully exploit their great, yet still hidden potential.

## Materials and methods

**Chemicals and media.** All reagents and extender components were purchased from Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The fluorescence probes were purchased from Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA.

### Animals.

The material for the research was collected post-mortem from 27 individuals at age from 3 to 20 years. The wisents came from captive breeding herds or show enclosures from 13 locations in Poland. Collections were performed outside of the breeding season (September–April) between the years 2015–2023.

No animal was killed for the purposes of this study—all animals were eliminated due to poor health status, diagnosed infectious disease or aggressive behaviour under the permits issued by the General Director for Environmental Protection. Local Ethics Committee approval was not required.

**Spermatozoa collection.** Epididymides were collected immediately after the animal's death. Epididymal tails were dissected, cleaned from connective tissues and blood vessels, then placed on glass Petri dishes containing 4 ml of a Tris-based extender (Tris (hydroxymethyl)- aminomethane (0.2 M), citric acid monohydrate (0.06 M), glucose (0.05 M), distilled water up to 100 ml) (30 °C) and sliced with scalpel blade. Subsequently, dishes were left on the warming platform for 10 min of incubation before initial analysis.

**Sperm analysis.** *Basic assessment.* Concentration of spermatozoa was assessed in Thoma chamber ( $\times 400$ ) using the phase contrast microscope (Nicon Eclipse E200). Volume of sperm suspension was measured by an automatic pipette. Total sperm count was calculated by multiplying sperm volume and concentration.

Motility of spermatozoa was assessed subjectively using the phase contrast microscope (Nicon Eclipse E200) with a warming stage by placing 10  $\mu\text{L}$  of sample on the glass slide and covered with a cover slip ( $\times 400$ ).

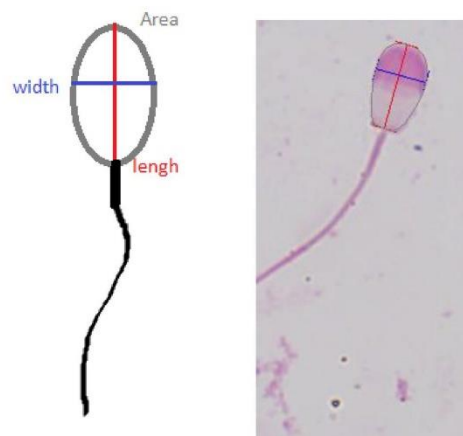
The percentage of live and dead spermatozoa was evaluated on eosin-nigrosine stained smears. Ten microliters of sperm sample were mixed with 10 mL of eosin-nigrosin solution, spread onto a microscope slide and dried on air. The slides were examined under the light microscope (magnification  $\times 1000$ ). Two hundred spermatozoa were evaluated per each slide. Pink-stained spermatozoa were considered dead. Gametes that remained unstained were classified as live (Fig. 4).

Morphology of spermatozoa was evaluated on smears stained with Bydgoska method<sup>32</sup>. The percentage of presence of proximal droplet, distal droplet, head shape abnormalities, damaged acrosome, midpiece defects, dag-like defect, bent tail, detached head and coiled tail was evaluated in 200 of spermatozoa per each slide. Spermatozoa which did not show these defects were described as morphologically normal.

*Sperm head morphometry.* Sperm head morphometry was evaluated with the use of cellSens Dimension Software (Olympus Europa SE & Co. KG). The length, width and area of head were measured manually on smears stained with Bydgoska method<sup>39</sup>. For morphometric measurements, slides from best quality samples were



**Figure 4.** Evaluation of the percentage of live and dead spermatozoa using the eosin-nigrosin dye. (A) unstained viable spermatozoa; (B) stained dead spermatozoa.



**Figure 5.** Sperm head morphometry measurements.

selected. In total, 1200 spermatozoa were measured. The method of making measurements was presented in Fig. 5.

**Flow cytometry assessment.** All tests were performed using Guava EasyCyte 5 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) cytometer. Gametes acquisitions were analysed with the GuavaSoft™ 3.1.1 software (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The fluorescent probes were excited by an argon ion 488 nm laser. The non-sperm events were gated out based on scatter properties and not analysed. A total of 10,000 events were analysed for each sample. All stainings and analysis were performed following the protocol used in our laboratory, which was described before for other animal species<sup>36,40,41</sup> and which was proven suitable for wisent<sup>10</sup>.

The spermatozoa membrane integrity was assessed by using SYBR-14 stain combined with propidium iodide (PI). 300 µL of sample was incubated in the dark for 10 min with 5 µL of SYBR-14 working solution (0.1 µL SYBR14 + 4.9 µL TRIS based extender). The analysis was performed after 3 min of incubation with 3 µL of PI. Spermatozoa showing green fluorescence were classified as those with intact membranes and those with red fluorescence were classified as dead<sup>10,40,41</sup>.

Acrosome integrity was assessed by lectin PNA stain from *Arachis hypogaea* Alexa Fluor® 488 conjugate combined with propidium iodide (PI). Diluted samples were mixed with 10 µL of PNA working solution (1 µg/mL) and incubated for 5 min at room temperature in the dark. Subsequently, the samples were washed and 3 µL of PI was added. Spermatozoa showing green fluorescence were classified as those with damaged acrosome<sup>10,40,41</sup>.

Mitochondrial activity was assessed using the JC-1 dye combined with propidium iodide (PI). 500 µL of samples were stained with 0.67 µL JC-1 stock solution (3 mM stock solution of JC-1 in DMSO). Subsequently, the samples were incubated for 20 min at 37 °C in the dark. After incubation 3 µL of PI was added. Sperm emitting orange fluorescence were classified as high mitochondrial membrane potential. Spermatozoa emitting green fluorescence were classified as having low mitochondrial potential<sup>10,40,41</sup>.

Lipid peroxidation was assessed with C11-BODIPY581/591 probe combined with propidium iodide (PI). 1 µL of 2 mM C11-BODIPY581/591 in ethanol was added to the diluted samples and incubated for 30 min at 37 °C in the dark. Subsequently, samples were centrifuged at 500×g for 3 min. The sperm pellets were resuspended in 500 µL of TRIS based extender. To determine viability, the spermatozoa were stained with PI and incubated for 3 min at room temperature. Sperm emitting only orange fluorescence were considered live without lipid peroxidation-LPO (L/LPO-)<sup>10,40,41</sup>.

To determine chromatin status the acridine orange (AO) dye was used. 100 µL samples were subjected to brief acid denaturation by adding 200 µL of the lysis solution (Triton X-100 0.1% (v/v), NaCl 0.15 M, HCl 0.08 M, pH 1.4). After 30 s, 600 µL of AO solution (6 µg AO/mL in a buffer: citric acid 0.1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, pH 6) was added. The analysis was performed after 3 min of incubation. Spermatozoa with normal DNA configuration were emitting green fluorescence. Cells showing red fluorescence were considered as those with denatured DNA<sup>10,40,41</sup>. Spermatozoa cryopreservation.

After basic quality assessment, samples from 20 individuals, characterised by a minimum of 35% percent subjective motility and a minimum of  $120 \times 10^6$  total sperm count, were qualified for freezing.

Subsequently, concentration of spermatozoa and subjective motility were evaluated as it was described above.

Suspension of spermatozoa was diluted with the extender based on Tris buffer and egg yolk (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (0.2 M), citric acid monohydrate (0.06 M), glucose (0.05 M), egg yolk (20% v/v), penicillin (5000 IU) streptomycin (100 mg) and distilled water up to 100 ml) at 22 °C to obtain the concentration  $200 \times 10^6$ /ml.

After first dilution, samples were placed in a water bath and cooled down to 5 °C in the refrigerator. When the required temperature was reached, the second dilution was performed by adding extender as above with an addition of glycerol to obtain final sperm concentration  $160 \times 10^6$ /ml and final glycerol concentration 6%.

Diluted samples were left for 90 min equilibration at 5 °C. Subsequently, the suspensions of spermatozoa were loaded into 0.25 ml straws ( $40 \times 10^6$  spermatozoa per straw). The free end of the straw was closed with polyvinyl alcohol (PVA). Straws were placed in the liquid nitrogen vapours for 15 min and then immersed in the liquid nitrogen and stored<sup>10</sup>.

To assess the effectiveness of the cryopreservation process, one straw from each sample was thawed (water bath, 37 °C, 30 s) from 1 week to 1 month from the day of collection. Post-thaw quality was evaluated by the same methods as were described above.

**Statistical analysis.** Shapiro–Wilk’s test was used to assess data normality and because majority of data were not normally distributed, the results of the assessment of sperm characteristics were presented in the form of mean, mean with standard error, median, as well as minimum and maximum values calculated by using PAST 4.03 program<sup>42</sup>.

Nonparametric test (Wilcoxon signed ranks test) were used to evaluate differences between fresh and frozen thawed samples. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ . Spearman correlation was calculated between the month of collection and semen parameters. September, considered the end of the breeding season in wisents, was adopted as month No. 1. Spearman correlation was also calculated between the animal age and semen parameters.

Statistical analyses were performed by using R Programming Language<sup>43</sup>.

**Ethical approval and consent to participate.** The authors declare that during the work, no animal studies were conducted and no animals were shot on purpose of those studies. Samples were collected post-mortem from individuals shot under the permits issued by the General Director for Environmental Protection. Local Ethics Committee approval was not required.



A permit issued by the Regional Director for Environmental Protection in Wrocław (WPN.6401.170.2019.MH) for the possession and keeping of *Bison bonasus* cells, sperm, oocytes, and fibroblasts at the Bison Sperm Bank located in the building of the Department of Reproduction with the Clinic of Farm Animals at 49 Grunwaldzki Square, Wrocław, Poland.

### Data availability

The datasets used during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 15 May 2023; Accepted: 16 August 2023

Published online: 24 August 2023

### References

- Varesi, S., Vernocchi, V., Faustini, M. & Luvoni, G. C. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. *Acta Vet. Scand.* **55**(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-17>. PMID:23442223;PMCID:PMC3669098 (2013).
- Luvoni, G. C. & Morselli, M. G. Canine epididymal spermatozoa: A hidden treasure with great potential. *Reprod. Domest. Anim.* **52**(Suppl 2), 197–201. <https://doi.org/10.1111/rda.12820> (2017).
- Goovaerts, I. G. *et al.* Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudal epididymides of the same bull. *Theriogenology* **66**(2), 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.018> (2006).
- Eberhardt, M., Nizański, W., Olech, W. & Prochowska, S. Assisted reproductive techniques in wisents: Achievements and further challenges. *Med. Weter.* <https://doi.org/10.21521/mw.6539> (2021).
- Duszczyńska, A. M. *et al.* Establishment of a Wisent (*Bison bonasus*) Germplasm Bank. *Animals (Basel)* **12**(10), 1239. <https://doi.org/10.3390/ani12101239>. PMID:35625085;PMCID:PMC9137628 (2022).
- Pucek, Z., Belousova, I., Krasińska, M., Krasiński, Z., Olech, W. European bison. *Status Survey and Conservation Action Plan*. Gland, Switzerland and Cambridge, UK IUCN/SSB Bison Specialist Group IUCN, 1–54 (2004).
- Keller, L. F. & Waller, D. M. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evolut.* **17**(5), 230–241. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02489-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02489-8) (2002).
- Duszczyńska, A. M. *et al.* Obtaining Wisent early blastocyst in vitro is a basic for protection and creation of biodiversity for this threatened species. *Reprod. Domest. Anim.* **53**(3), 818–821. <https://doi.org/10.1111/rda.13168> (2018).
- Kozdrowski, R., Nizański, W., Dubiel, A. & Olech, W. Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: A pilot study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**(9), 31. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-31>. PMID:21385402;PMCID:PMC3059293 (2011).
- Eberhardt, M. *et al.* The influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa. *BMC Vet. Res.* **18**(1), 305. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03408-z> (2022).
- Iolchiev, B. S. *et al.* Biological integrity of bison epididymal sperm under cryoconservation and long storage. *Agric. Biol.* **52**(2), 282–290. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.2.282eng> (2017).
- Hossain, M. S. *et al.* Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art. *Asian J. Androl.* **13**(3), 406–419. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.15> (2011).
- Yániz, J. L., Soler, C. & Santolaria, P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Anim. Reprod. Sci.* **156**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.002> (2015).
- Prochowska, S., Napierkowska, S., Czech, B. & Nizański, W. Feline sperm head morphometry in relation to male pedigree and fertility. *Theriogenology* **7**(208), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.06.006> (2023).
- García-Herreros, M. & Leal, C. L. Sperm morphometry: a tool for detecting biophysical changes associated with viability in cryo-preserved bovine spermatozoa. *Andrologia*. **46**(7), 820–822. <https://doi.org/10.1111/and.12141> (2014).
- García-Herreros, M. & Leal, C. L. Sperm volumetric dynamics during in vitro capacitation process in bovine spermatozoa. *Animal*. **9**(6), 1016–1024. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000129> (2015).
- Morrow, E. H. & Gage, M. J. G. Consistent significant variation between individual males in spermatozoal morphometry. *J. Zool.* **254**(2), 147e53 (2001).
- Santiago-Moreno, J. *et al.* Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian J. Androl.* **18**(6), 882e8. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188660> (2016).
- Aurini, L. C., Whiteside, D. P., Elkin, B. T. & Thundathil, J. C. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm of plains bison (*Bison bison bison*) as a model for salvaging the genetics of wood bison (*Bison bison athabasca*). *Reprod. Domest. Anim.* **44**(5), 815–822. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01087.x> (2009).
- Martins, C. F., Rumpf, R., Pereira, D. C. & Dode, M. N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* **101**(3–4), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.018> (2007).
- Lopes, G., Soares, L., Ferreira, P. & Rocha, A. Tris-egg yolk-glycerol (TEY) extender developed for freezing dog semen is a good option to cryopreserve bovine epididymal sperm cells. *Reprod. Domest. Anim.* **50**(1), 97–103. <https://doi.org/10.1111/rda.12454> (2015).
- Tajik, P., Arman, A. & Taktaz, T. Bovine epididymal sperm morphology obtained from caput, corpus and cauda epididymides. *Pak. J. Biol. Sci.* **10**(21), 3936–3939. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.3936.3939> (2007).
- Vilela, C. G., Marquez, J. M., Graham, J. K. & Barfield, J. P. Cryopreservation of bison epididymal sperm: A strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. *Theriogenology* **89**, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.044> (2017).
- Krishnakumar, S., Whiteside, D. P., Elkin, B. & Thundathil, J. C. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*). *Theriogenology* **76**(2), 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.001> (2011).
- Helbig, L., Woodbury, M. R., Haigh, J. C., Collins, J. & Barth, A. D. The seasonal fertility of North American bison (*Bison bison*) bulls. *Anim. Reprod. Sci.* **97**(3–4), 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.02.001> (2007).
- Pegge, R. B. *et al.* Sperm characteristics in plains (*Bison bison bison*) versus wood (*Bison bison athabasca*) bison. *Theriogenology* **75**(7), 1360–1370. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.046> (2011).
- Gravance, C. G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D. L. & Casey, P. J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Androl.* **19**(6), 704–709 (1998).
- Lessard, C., Danielson, J., Rajapaksha, K., Adams, G. P. & McCorkell, R. Banking North American buffalo semen. *Theriogenology* **71**(7), 1112–1119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.004> (2009).

29. Ramón, M. *et al.* Sperm population structure and male fertility: An intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. *Biol. Reprod.* **89**(5), 110. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112110> (2013).
30. Maroto-Morales, A. *et al.* Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. *Theriogenology* **84**(9), 1536–1541. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.038> (2015).
31. Martínez-Rodríguez, C. *et al.* Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate in vitro and correlates with fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD15022> (2015).
32. Chaveiro, A., Cerqueira, C., Silva, J., Franco, J. & Moreira da Silva, F. Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal. *Iran J. Vet. Res.* **16**(2), 188–93 (2015).
33. Comizzoli, P., Mermillod, P. & Mauget, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod. Nutr. Dev.* **40**(5), 493–504. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000113> (2000).
34. Thun, R., Hurtado, M. & Janett, F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* **57**(3), 1087–1094. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00704-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00704-x) (2002).
35. Watson, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* **2**(60–61), 481–492. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3) (2000).
36. Partyka, A., Łukaszewicz, E. & Nizański, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* **77**(8), 1497–1504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006> (2012).
37. Chatterjee, S. & Gagnon, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* **59**(4), 451–458. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052> (2001).
38. Park, N. C., Park, H. J., Lee, K. M. & Shin, D. G. Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation. *Asian J. Androl.* **5**(3), 195–201 (2003).
39. Szostak, B. & Buryś, L. Effect of breed and age on the morphology of a.I. boars spermatozoa. *Ann. UMCS Zootech.* **29**, 44–51. <https://doi.org/10.2478/v10083-011-0010-9> (2011).
40. Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J. & Nizański, W. The effect of L-carnitine, hypotaurine, and taurine supplementation on the quality of cryopreserved chicken semen. *Biomed. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2017/7279341> (2017).
41. Nizański, W., Partyka, A. & Rijsselaere, T. Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reprod. Domest. Anim.* <https://doi.org/10.1111/rda.12048> (2012).
42. Hammer, Ø., Harper, D. A. & Ryan, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* **4**(1), 9 (2001).
43. RStudio Team. RStudio: Integrated development for R. *RStudio*. <http://www.rstudio.com/> (PBC, Boston, MA, 2020).

### Acknowledgements

The authors would like to thank Barbara Smalec from Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences for supervising laboratory procedures. The authors would like to thank Bartosz Czech from Biostatistics Group, Department of Genetics of Wrocław University of Environmental and Life Sciences for support in the statistical analysis. The authors would like to thank Monika Szpringiel and John Perrin for the linguistic revision of the manuscript.

### Author contributions

M.E.: conceptualization, investigation, methodology, formal analysis, writing—original draft, writing—review and editing; S.P.: investigation, methodology writing—original draft; A.P.: methodology, investigation; W.B.: material collecting; A.V.S.: supervision; W.O.: funding acquisition, supervision; W.N.: investigation, conceptualization, funding acquisition, methodology, supervision, writing—review and editing. The author(s) read and approved the final manuscript.

### Funding

This research was funded by the Forest Fund (Poland), Grant Number OR.271.3.10.2017 and supported by the Polish National Agency for Academic Exchange under Grant No. PPI/APM/2019/1/00044/U/00001.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.


### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40798-y>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.E. or W.N.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

Maria Eberhardt

imię i nazwisko

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

afiliacja

Wrocław, 10.09.2023

miejsowość i data

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Eberhardt M, Prochowska S, Partyka A, Bielas W, Van Soom A, Olech W, Niżański W. *The morphology, morphometry and functionality of fresh and cryopreserved wisent (Bison bonasus) epididymal spermatozoa*. Sci Rep. 2023 Aug 24;13(1):13866. doi: 10.1038/s41598-023-40798-y. mój udział polegał na : udziale w projektowaniu oraz przeprowadzeniu opisanych badań, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, a także korekcji na etapie recenzji.

Potwierdzam treść oświadczenia.

10.09.2023 Eberhardt

data i podpis

13.09.2023

data i podpis promotora

### **13. ZAŁĄCZNIK 2**

Realizacja zadania III oraz otrzymane wyniki zostały przedstawione w publikacji:

Eberhardt M., Prochowska S., Duszewska A.M., Van Soom A., Olech W., Nizański W.  
The influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on  
the quality of frozen wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa. *BMC Vet Res.*  
2022. 18(1):305. doi: 10.1186/s12917-022-03408-z.

RESEARCH

Open Access



# The influence of Percoll<sup>®</sup> density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa

Maria Eberhardt<sup>1</sup>, Sylwia Prochowska<sup>1</sup>, Anna M. Duszewska<sup>2</sup>, Ann Van Soom<sup>3</sup>, Wanda Olech<sup>4</sup> and Wojciech Niżański<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** The wisent (*Bison bonasus*) is a species that has undergone a population bottleneck. Homozygosity is prevalent within the population and may have a negative impact on semen quality in wisent bulls. Semen samples containing a large amount of functionally and morphologically impaired or dead spermatozoa have lower tolerance for cryopreservation process. Such samples are prone to involve damage acrosomes, to produce and release reactive oxygen which negatively affects proper function of spermatozoas. It is a good practice to select intact and viable gametes before subjecting the sample to cryopreservation to improve the efficiency of this process. The aim of this study was to assess the ability of Percoll<sup>®</sup> density gradient centrifugation in order to improve the quality of wisent spermatozoa after cryopreservation. Spermatozoa samples were analysed with computer-assisted semen analysis system and flow cytometry.

**Results:** Percoll<sup>®</sup> density gradient centrifugation resulted in increased percentage of motile spermatozoa, higher proportion of spermatozoa with normal morphology and proper functionality but also in a significant reduction of the total number of gametes. Nevertheless, the concentration of frozen spermatozoa was still sufficient for obtaining a few complete insemination doses suggested for cattle from each epididymis.

**Conclusions:** While creating a high-quality genetic reserve, for in vitro fertilisation purposes, eliminating detritus and improving the overall quality of samples is more important than total number of spermatozoa. For these reasons, the achievement of higher post thaw quality of spermatozoa justifies the purification of samples by centrifugation in a Percoll<sup>®</sup> density gradient prior to the cryopreservation process.

**Keywords:** Wisent, Spermatozoa, Percoll<sup>®</sup>, Freezability, Cryopreservation

## Background

The wisent (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) is the largest land mammal currently living in Europe [1]. Centuries of hunting, poaching, and armed conflicts led to the last free-ranging individual being found dead in 1919 in the Białowieża Primeval Forest [1]. At the beginning of the twentieth century, conservationists initiated activities aimed to recover this species. The transfer of

\*Correspondence: wojciech.nizanski@upwr.edu.pl

<sup>1</sup> Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Plac Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław, Poland  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

one male and two females from the zoological gardens to the enclosure in Białowieża is considered to be the beginning of the restitution programme in Poland [1]. Due to the effectiveness of breeding efforts, the current population is consistently increasing in size and the total worldwide number of individuals reached 9111 at the end of 2020 (data from The European Bison Pedigree Book as of December 31st) However, the wisent is a species that has undergone a population bottleneck which led to homozygosity [1–3]. An impoverished gene pool is an inevitable problem for all endangered populations [4]. For this reason, recovery programmes could be supported by Assisted Reproductive Techniques (ART), which enable saving genetic resources through mating least related individuals [4]. Important in those programmes is the cryopreservation of reproductive cells [5] and their preparation for this process which is crucial for obtaining a good quality genetic reserve [6].

It is well known that the freezing process cause modifications in structure of male gametes [6] and those changes are not fully reversible after thawing [7]. Ice formation, chemical toxicity, and overproduction of reactive oxygen species (ROS) is causing damage to sperm membranes. In comparison to fresh semen, frozen/thawed spermatozoa are predisposed to undergo morphological changes like acrosome abnormalities and are characterised by lower motility, reduced mitochondrial potential, increased plasma membrane permeability and lipid peroxidation [7]. These damages can reduce fertility of post-thawed spermatozoa [8]. However, the basic factor limiting the effectiveness of cryopreservation process is the initial quality of the obtained spermatozoa [9]. Samples containing large number of functionally and morphologically impaired and dead spermatozoa display a lower tolerance of the cryopreservation process than those characterized by good initial quality [10]. Impaired cells release acrosome contents and ROS that negatively affect properly functioning gametes [11]. Additional components which have a negative impact on properly functioning spermatozoa are blood formed elements, epithelial cells, or fragments of epididymal tissue. Removal of this debris may have a beneficial effect on the cryopreserved gametes [11, 12]. Therefore, it is good practice to select normal spermatozoa before subjecting the sample to cryopreservation in order to improve the efficiency of this process [10].

In present wisent population, homozygous effects occur which results in numerous abnormalities in sperm morphology and low sperm quality. In the current wisent population, homozygous effects occur, resulting in numerous abnormalities in sperm morphology and low overall sperm quality [13]. Therefore, the initial

pre-freezing sperm selection to improve the efficiency of cryopreservation process was taken into consideration.

There are multiple semen purification techniques available [6, 14–16]. Percoll® density gradient centrifugation is a method based on sperm cell density that can be correlated to spermatozoal stage of maturation and integrity. Male gametes with a normal nucleus are denser and are deposited in the area of greater density. Furthermore, motile spermatozoa deposit faster than cells with impaired motility due to the alignment of movements with the centrifugal force used [6]. This colloidal solution of silica coated with polyvinylpyrrolidone (PVP) has been successfully used in bull, ram, boar, and human semen samples for removing undesirable spermatozoa from ejaculates [6, 16].

Wisent reproduction has been discussed in several articles [17–25]. However, there is a paucity of information focused on detailed characteristic of the male gamete in context of cryopreservation process in this species [26]. According to our best knowledge, no studies have been conducted using Percoll® density gradient centrifugation to select motile wisent spermatozoa and, thus, improve the quality of frozen samples.

The aim of our study was to compare the efficiency of the cryopreservation process of wisent epididymal spermatozoa in TRIS buffer-based egg yolk extender with and without previous Percoll® density gradient centrifugation by using computer-assisted semen analysis (CASA) and flow cytometry.

## Results

Percoll® density gradient centrifugation resulted in a significant reduction in total number of spermatozoa, with losses ranging from 43.87 to 86.67% (Tables 1 and 2).

The percentage of motile and live spermatozoa was significantly higher in Percoll® group in comparison to

**Table 1** Total number of spermatozoa from separate epididymis (L and R represent a pair of epididymides from each individual from 1 to 4)

Epididymis	Initial number of spermatozoa [ $\times 10^6$ ]	Post centrifugation number of spermatozoa [ $\times 10^6$ ]	Losses (%)
1L	410.00	129.50	68.41
1R	499.90	320.00	43.87
2L	900.00	120.00	86.67
2R	860.00	232.50	72.97
3L	960.00	520.00	45.83
3R	1960.00	720.00	63.27
4L	1173.00	294.00	74.94
4R	85.00	441.00	48.42

**Table 2** Number of spermatozoa obtained prior and after freezing- thawing ( $10^6$ ) from separate epididymis (L and R represent a pair of epididymides from each individual from 1 to 4)

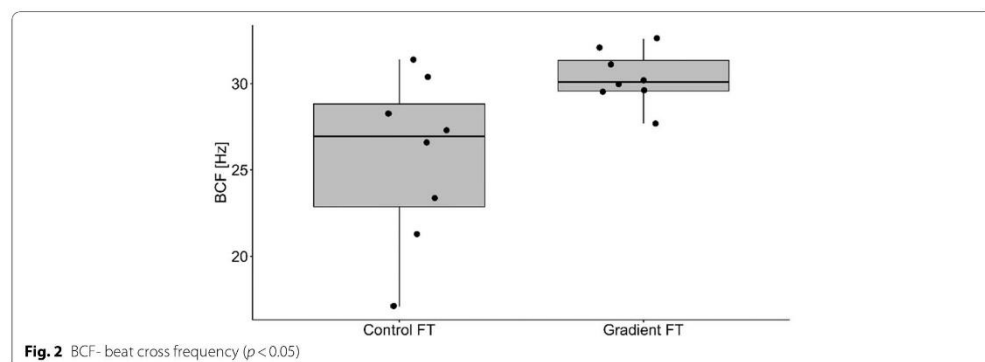
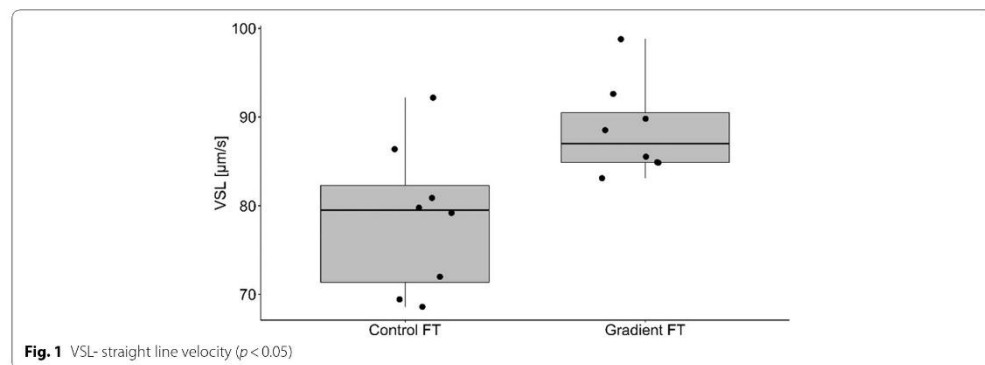
	Fresh parameters				Post thaw parameters			
	TOTAL [ $\times 10^6$ ]	PERCELL	LIVE [ $\times 10^6$ ]	MOTILE [ $\times 10^6$ ]	TOTAL [ $\times 10^6$ ]	PERCELL	LIVE [ $\times 10^6$ ]	MOTILE [ $\times 10^6$ ]
Epididymis 1 L	728.00	410.00	607.88	342.35	728.00	225.50	83.72	14.56
Epididymis 1 R	499.60	499.90	482.11	482.40	499.60	299.94	124.90	49.96
Epididymis 2 L	900.00	900.00	760.50	760.50	900.00	270.00	180.00	360.00
Epididymis 2 R	900.00	860.00	722.70	690.58	900.00	344.00	342.50	360.00
Epididymis 3 L	600.00	960.00	474.00	758.40	600.00	576.00	306.00	240.00
Epididymis 3 R	800.00	1960.00	632.00	1548.40	800.00	1274.00	288.00	160.00
Epididymis 4 L	160.00	1173.00	138.40	1014.65	160.00	703.80	60.80	56.00
Epididymis 4 R	160.00	855.00	143.20	765.23	160.00	513.00	37.60	40.00

**Table 3** The results of microscopic assessment of quality /basic characteristics of wisent epididymal spermatozoa cryopreserved with (Gradient FT) and without (Control FT) pre-freezing Percoll® gradient centrifugation. All data are presented as mean ± s.e. a,b,c, within each column, values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ) with (Gradient FT) and without (Control FT) pre-freezing Percoll® gradient centrifugation

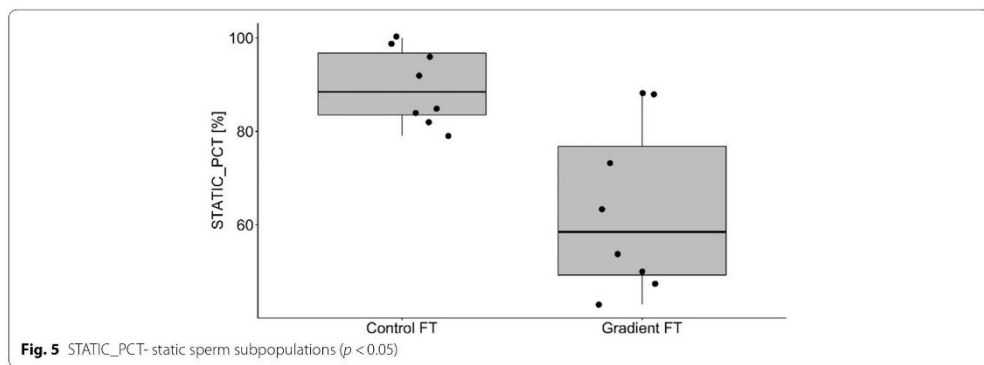
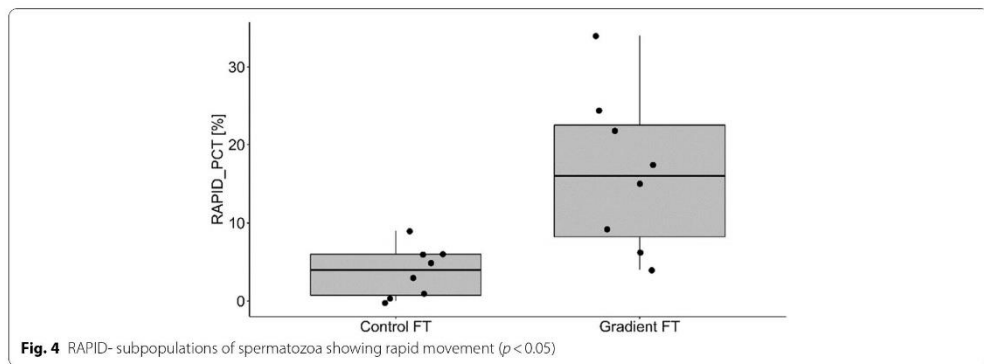
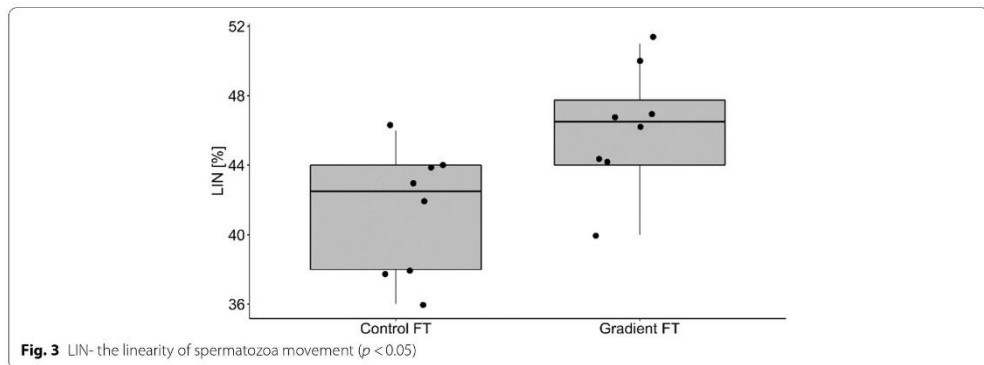
	Motile (%)	Live (%)	Morphologically normal (%)
Fresh	53.75 ± 4.30 <sup>a</sup>	84.85 ± 2.12 <sup>a</sup>	74.88 ± 3.14 <sup>a</sup>
Control FT	26.50 ± 5.24 <sup>b</sup>	30.38 ± 4.46 <sup>b</sup>	73.63 ± 2.82 <sup>a</sup>
Gradient FT	50.00 ± 6.05 <sup>a</sup>	53.25 ± 5.39 <sup>c</sup>	75.50 ± 3.60 <sup>a</sup>

the control group (Table 3). There were no differences in proportion of spermatozoa with normal morphology among the groups (Table 3). Samples from the Percoll® group were statistically higher than the control group for straight line velocity (VSL;  $p = 0.015$ ; Fig. 1), Beat

Cross Frequency (BCF;  $p = 0.025$ ; Fig. 2), linearity (LIN;  $p = 0.007$ ; Fig. 3) and the percentage of rapid spermatozoa (RAPID\_PCT) ( $p = 0.006$ ; Fig. 4). The percentage of static spermatozoa (STATIC\_PCT) was significantly higher in the control group ( $p = 0.007$ ; Fig. 5). Data on functional spermatozoa parameters assessed by fluorescent staining and flow cytometry are presented in Table 4. The populations of cells characterised by an intact acrosome and cell membrane were significantly greater in samples centrifuged in density gradient in comparison with control samples. Percentage of spermatozoa with high mitochondrial potential was higher in the Percoll® group than in the control samples. However, there were no statistically significant differences in proportions of apoptotic cells and spermatozoa with damaged chromatin between both groups (Table 4). The percentage of motile spermatozoa was significantly lower in control group, as compared to the fresh samples. In both control and gradient groups, the percentage of live spermatozoa differed significantly from initial values (Table 3). Compared with the fresh







samples, the percentage of motile spermatozoa from cryopreserved samples was significantly lower in both groups.

All functional parameters in cryopreserved samples, assessed by flow cytometry, were similar except chromatin integrity which was significantly lower in control

**Table 4** The functional characteristics of wisent epididymal spermatozoa cryopreserved with (Gradient FT) and without (Control FT) pre-freezing Percoll® gradient centrifugation assessed by flow cytometry. All data are presented as mean ± SEM. a,b,c, within each column, values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ )

	Cells with intact sperm membrane (%)	Cells with intact acrosome (%)	Live non apoptotic cells (%)	Cells with high mitochondrial activity (%)	Cells with damaged chromatin (%)	Cells without lipid peroxidation (%)
24h from collection	51.46 ± 3.80 <sup>a</sup>	53.23 ± 5.55 <sup>a</sup>	54.26 ± 9.20 <sup>a</sup>	66.37 ± 5.89 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.05 <sup>a</sup>	97.43 ± 0.89 <sup>a</sup>
Control FT	11.86 ± 3.60 <sup>b</sup>	32.23 ± 4.60 <sup>b</sup>	46.26 ± 6.17 <sup>a</sup>	20.93 ± 5.78 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>a</sup>	98.15 ± 0.82 <sup>a</sup>
Gradient FT	29.93 ± 4.30 <sup>c</sup>	40.79 ± 3.80 <sup>c</sup>	46.40 ± 2.32 <sup>a</sup>	56.94 ± 4.67 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.04 <sup>a</sup>	99.03 ± 0.34 <sup>a</sup>

group and the viability clearly reduced in both study groups compared to the values in pre-freezing samples (Table 4).

Figures 1, 2, 3, 4 and 5 Characteristic of post-thaw sperm motility assessed by CASA.

### Discussion

Samples containing spermatozoa obtained from wisent epididymis by incision method may be characterised by high content of detritus despite using cell filters [27]. As shown by Martínez-Alborcia et al. (2012) [10], standard spermatozoa have negative impact on freezability of proper functioning gametes in boars, as well as, human sperm. Álvarez-Rodríguez (2015) [16] mentioned similar detrimental effects of the presence of blood cells in semen samples. For these reasons, we conducted a study to assess the effectiveness of introduction samples purification stage in the pre-freezing processing of wisent epididymal sperm. Among available selection methods, based on the creation of a physical barrier for reproductive cells [6], we decided to use density gradient centrifugation with a colloidal substance – Percoll®. This substance, formerly popular in human in vitro fertilisation, was excluded from assisted reproductive techniques because of toxic impact on sperm of some batches [15]. Nevertheless we chose this technique due to its widely proven usefulness in artificial breeding in bovine [28–31].

To our knowledge, studies on the use of the Percoll® density gradient centrifugation to select epididymal sperm prior to cryopreservation in animals have not been published. For this reason, it is difficult to compare the results obtained in such procedure. In available literature, there are only a few articles on the use of Percoll® density gradient centrifugation for epididymal sperm [32–35]. Most of the published studies on sperm separation by this method concerning thawed semen [14, 31, 33, 36]. In this research, the use of wisent epididymal sperm selection prior to cryopreservation was described for the first time. A similar procedure was used by Álvarez-Rodríguez M. et al. (2016) in case of the brown bear (*Ursus arctos*). However, in this case, the material was semen obtained by electroejaculation [16].

Such as in cattle, pigs, and brown bear [16] also in this study Percoll® gradient centrifugation allowed to select sperm with high functional properties, which were less sensitive to cryo-damage and thus resulted in higher spermatozoa post thaw quality. In available literature, cited in our bibliography, the use of Percoll® density gradient centrifugation in all cases allowed the selection of samples characterised by higher than initial percentage of motile sperm [28–31, 33, 36]. Such effect was also observed in the case of the wisent epididymal spermatozoa. This process resulted in a statistically significant increase in the post-thawed percentage of motile sperm, in comparison to control group [6]. Percentage of live after thawing spermatozoa was higher in Percoll® separated samples, than in control samples (Table 2). This result was also obtained in case of other ruminants ejaculated semen such as cattle, zebu and red deer epididymal semen [30, 33]. Density gradient centrifugation showed the same capacity while processing the brown bear semen before freezing process as in the case of this study [16]. We observed that higher proportion of spermatozoa with normal morphology was characteristic for samples subjected to density gradient centrifugation (Table 2) which was not found in similar studies of boars [6]. VSL was faster in the Percoll® group than in the control group which was also observed in boars [36]. M. Noguchi et al. (2015) [36] observed similar changes for average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), straightness (STR) in boars but these results have not been documented for wisent. M. Noguchi et al. (2015) [36] also noticed that BCF was lower in the boar Percoll® group than in the control group, but comparable results were not detected for wisent in our study. However, in the bull semen samples, as in the case of the wisent, in the group selected with Percoll®, the higher percentage of BCF, LIN and RAPID spermatozoa populations were observed [30].

Populations of cells characterized by an intact acrosome and cell membrane were significantly greater in wisent spermatozoa samples centrifuged in density gradient in comparison to control samples. Comparable results were obtained in boars [36] and bull [15] [31]. L.Z. Oliveira et al. (2012) obtained the same results in

the bull intact cell membrane assessment [30]. However, they observed an increase in the percentage of spermatozoa with a damaged acrosome [30]. We observed that the percentage of sperm with high mitochondrial membrane potential was higher in the Percoll® group than in the control samples which was also observed by Arias et al. (2017) [29], Oliveira et al. (2012) in bulls [30]. However, there were no statistically significant differences in the proportions of apoptotic spermatozoa which was also reported for brown bear [16]. There were no differences in proportions of spermatozoa with damaged chromatin between both groups which suggests that centrifugation in Percoll® density gradient has no ability to exclude cells with this defect which was also observed in bull [29].

### Conclusions

In the case of endangered species, each obtained sample is of great importance for the maintenance of the biodiversity of the population. Therefore the main goal of this work was to improve the protocol for handling and cryopreserving wisent epididymal sperm.

This paper describes, for the first time, the use of Percoll® density gradient centrifugation to improve the efficiency of the freezing- thawing process of wisent epididymal sperm. In this study we observed the significant losses from 43.87 to 86.67% in total number of spermatozoa in samples after centrifugation. Despite significant losses, creating a high-quality reserve for in vitro fertilisation purposes, eliminating detritus and improving the overall quality of samples is more important than total number of spermatozoa which justifies the purification of samples by centrifugation in a Percoll® density gradient prior to the cryopreservation process. However, these losses also indicate the need to continue research on methods for the separation of wisent epididymal spermatozoa and further verification in in vitro fertilisation.

### Methods

#### Chemicals and media

All reagents and extender components were purchased from Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).

#### Spermatozoa collection and processing

The material used in this study was obtained and stored pursuant to the permit no. WPN.6401.170.2019.MH issued by the Regional Director for Environmental Protection in Wrocław.

In this study spermatozoa from 4 wisents (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) aged 4–8 years was collected from February to December 2019. Bulls were culled during planned eliminations due to injuries and reproductive disorders under the conditions regulated by Polish law (The Nature Conservation Act 2004). Immediately after

animal death, testicles were removed from the scrotum and spermatozoa were obtained by performing multiple incisions in the epididymal tail and immersing the tissue in 4 ml of a sperm-optimized Tris-based extender (Tris (2.4 g), citric acid (1.4 g), glucose (0.8 g), penicillin (5000 IU) streptomycin (100 mg) and distilled water up to 100 ml) (33°C) placed on glass Petri dishes. Petri dishes were placed on the warming platform for 10 minutes. After incubation, the samples were analysed.

#### Initial spermatozoa assessment

The male gametes obtained from each of eight epididymis were processed separately and treated as independent samples in the analyses.

Concentration per unit volume ( $10^6$  cells/ ml) and motility was assessed using the phase contrast microscope (Nicon Eclipse E200) with warming stage.

To assess the percentage of motile spermatozoa ten microlitres of sample were placed on the slide and covered with a cover slip ( $\times 400$ ).

Concentration in sperm per million ( $\times 10^6$ ) was counted using Thoma chamber ( $\times 400$ ).

For further morphological assessment, smears from 10  $\mu$ L of sperm-rich fluid were made and stained with Bydgoska method [37]. To assess the percentage of live and dead spermatozoa, smears from 10  $\mu$ L of sample and 10  $\mu$ L of eosin-nigrosin dye were prepared. The following morphological defects were evaluated: proximal droplet, head abnormalities, acrosome abnormalities, midpiece defects, dag-like defect, distal droplet, bent tail, detached head, coiled tail. As a morphological normal sperm were described spermatozoa which did not show these particular defects.

#### Preparation of semen

After the initial assessment (concentration and subjective motility) each sample was divided into two parts. One part was diluted with freezing extender I (Tris (2.4 g), citric acid (1.4 g), glucose (0.8 g), egg yolk (20% v/v), penicillin (5000 IU) streptomycin (100 mg) and distilled water up to 100 ml) [38] to obtain the concentration  $200 \times 10^6$ /ml.

The second aliquot was subjected to Percoll® density gradient centrifugation.

#### Percoll® density gradient centrifugation

Percoll® solutions (45 and 90%) were prepared as described by Lee et al. (2009) [6] with some modification. Percoll® solution (90%) was prepared by mixing Stock Isotonic Percoll® Solution (SIP) with Human Tubal Fluid (HTF) in a 9:1 proportion. Percoll® solution (45%) was prepared by mixing 90% solution with HTF in equal volume. Subsequently, a 2 ml sample was gently laid on

2 ml 45% Percoll® layer and 2 ml 90% Percoll® layer as presented in Fig. 6. Samples were centrifuged at  $800\times g$  for 35 min in a horizontal centrifuge. After removing the supernatant, the pellets were resuspended in 1 ml of HTF and then centrifuged for 5 min at  $800\times g$ . After centrifugation, the samples concentrations were diluted with freezing extender I to obtain the concentration  $200\times 10^6$  cells/ml.

#### Cryopreservation and thawing

The same cryopreservation procedure was used for both group of samples.

After dilution in freezing extender I at 22°C the samples were kept in a water bath and then placed into a refrigerator and cooled down to 5°C. Chilled freezing extender II (freezing extender I plus 6% glycerol) was added to obtain final concentration  $160\times 10^6$  cells/ml. Diluted spermatozoa were left for further equilibration for 90 min. Subsequently, samples were loaded into 0.25 ml straws ( $4.0\times 10^6$  spermatozoa per straw). Each free end of the straw was closed with polyvinyl alcohol. Filled straws were frozen in liquid nitrogen vapours (15 min) and then immersed in liquid nitrogen and stored in tanks [38]. From a few weeks to 1 year from the collection day, two straws (one from Percoll® and one from control group) from each epididymis were thawed. The straws were placed in a water bath (37°C) for 30 sec [38] and subjected to further analysis. To assess the percentage of spermatozoa with morphological defects and the percentage of live and dead gametes, smears were prepared using the same method as described above.

#### Assessment of thawed sperm movement parameters with CASA

Motility (MOT, %) and progressive motility (PMOT, %), parameters characterizing sperm movement: VCL ( $\mu\text{m/s}$ ), VAP ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL ( $\mu\text{m/s}$ ), LIN (%), STR (%), amplitude of lateral head displacement (ALH) ( $\mu\text{m}$ ), BCF (Hz), Rapid, Medium, Slow and static sperm

subpopulations were assessed by using HTM IVOS version 12.2 (Hamilton-Thorne Biosciences Beverly, MA, USA).

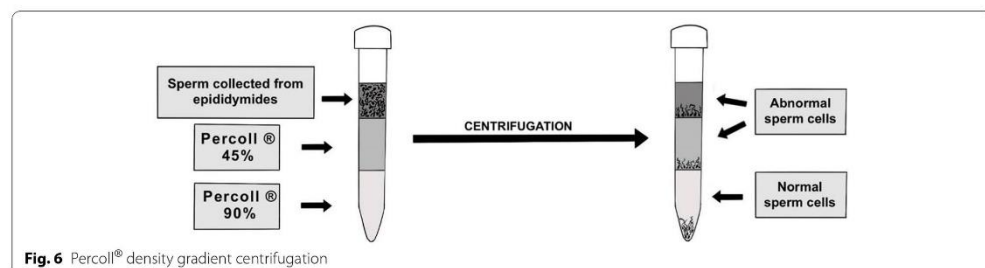
The used CASA setups were as for bull spermatozoa: frame rate (60 Hz), frames acquired (30), minimum contrast (80), minimum cell size (5 pixels), low VAP cut-off ( $30\mu\text{m/sec}$ ) and low VSL cut-off ( $15\mu\text{m/sec}$ ) [38].

#### Assessment of the function and structure of spermatozoa by flow cytometry

Spermatozoa were assessed by flow cytometry before and after freezing-thawing process. Due to the long travel distance from the place where the material was obtained to the laboratory where the analyses were performed, the initial pre-freezing assessment was conducted 24 hr. after collection.

Wiset spermatozoa functionality was evaluated using Guava EasyCyte 5 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) cytometer. The fluorescent probes used in the experiment were excited by an argon ion 488 nm laser. Gametes acquisitions were analysed with the GuavaSoft™ 3.1.1 software (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The non-sperm events were gated out based on scatter properties and not analysed. A total of 10,000 events were analysed for each sample. Membrane integrity, acrosome integrity, mitochondrial activity, lipid peroxidation, apoptosis and membrane lipid disorders and chromatin status were assessed [39, 40].

Membrane integrity of wiset spermatozoa was assessed using SYBR-14 stain combined with propidium iodide (PI) (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA). 300  $\mu\text{L}$  of sperm- rich fluid was incubated in the dark for 10 min with 5  $\mu\text{L}$  of SYBR-14 working solution (0.1  $\mu\text{L}$  SYBR14 + 4.9  $\mu\text{L}$  TRIS III extender). The analysis was performed after 3 min of incubation with 3  $\mu\text{L}$  of PI. Spermatozoa with intact membranes emit green fluorescence. Cells showing red fluorescence were classified as dead [41].



**Fig. 6** Percoll® density gradient centrifugation

Acrosome integrity was assessed by lectin PNA stain from *Arachis hypogaea* Alexa Fluor® 488 conjugate (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA). Diluted samples were mixed with 10 µL of PNA working solution (1 µg/mL) and incubated for 5 min at room temperature in the dark. Before analysis, the samples were washed and 3 µL of PI was added [42].

Mitochondrial activity was determined using the JC-1 dye (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA). 500 µL aliquot of spermatozoa-rich fluid was stained with 0.67 µL JC-1 stock solution (3 mM stock solution of JC-1 in DMSO). The samples were incubated for 20 min at 37 °C in the dark. Spermatozoa emitting orange fluorescence were classified as having high mitochondrial membrane potential (HMMP). Spermatozoa emitting green fluorescence were defined as those with low mitochondrial activity [43].

Lipid peroxidation was evaluated with fluorescent lipid probe C11-BODIPY581/591 (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA). One µL of 2 mM C11-BODIPY581/591 in ethanol was added to the diluted sperm-rich fluid and incubated for 30 min at 37 °C in the dark. Subsequently, centrifugation at 500 × g for 3 min was performed and the sperm pellets were resuspended in 500 µL of HTF extender. To determine viability, the spermatozoa were stained with PI and incubated for 5 min at room temperature. Spermatozoa which remain unstained were categorised as living population without LPO (L/LPO-) [44].

Apoptosis and membrane lipid disorder were evaluated with YO-PRO-1 dye (25 µM solution in DMSO) (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA) (4). 1 µL of YO-PRO-1 stain (final concentration: 25 nM) was added to 1 mL of diluted spermatozoa-rich fluid (500 µL HTF and 500 µL of spermatozoa solution). After incubation for 10 minutes, 3 µL of PI was added before cytometric analysis. Cells showing green fluorescence were classified as YO-PRO-1 positive. Spermatozoa which remain unstained were categorised as living population [44].

Chromatin status was established using the acridine orange dye (AO, Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA). A spermatozoa-rich solution (100 µL) was subjected to brief acid denaturation by adding 200 µL of the lysis solution (Triton X-100 0.1% (v/v), NaCl 0.15 M, HCl 0.08 M, pH 1.4). After 30 seconds, 600 µL of AO solution (6 µg AO/mL in a buffer: citric acid 0.1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, pH 6) was added. The analysis was performed after 3 minutes of incubation. Spermatozoa with normal DNA configuration were characterised by green fluorescence. Gametes emitting red fluorescence were considered as a population of cells with denatured DNA (DFI) [45].

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using STATISTICA 13.3 StaSoft (USA). The results of quantitative data are presented as the mean and standard error. Shapiro-Wilk's test was used to assess data normality. Where appropriate parametric tests (Student's *t*-test and ANOVA) or nonparametric tests (Mann-Whitney *U* and Kruskal–Wallis) were used to evaluate differences between the groups. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

### Abbreviations

ALH: Amplitude of lateral head displacement; AO: Acridine orange dye; ART: Assisted reproductive techniques; BCF: Beat cross frequency; CASA: Computer-assisted semen analysis; HMMP: High mitochondrial membrane potential; HTF: Human tubal fluid; LIN: Linearity; MOT: Motility; PI: Propidium iodide; PMOT: Progressive motility; PVP: Polyvinylpyrrolidone; RAPID, RAPID\_PCT: The percentage of rapid spermatozoa; ROS: Reactive oxygen species; SIP: Stock Isotonic Percoll® Solution; STATIC\_PCT: Percentage of static spermatozoa; STR: Straightness; VAP: Average path velocity; VCL: Curvilinear velocity; VSL: Straight line velocity.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Barbara Smalec and Monika Szpringiel from Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences for supervising laboratory procedures (Barbara Smalec) and linguistic revision of the manuscript (Monika Szpringiel).

### Authors' contributions

Maria Eberhardt: conceptualization, investigation, methodology, formal analysis, writing – original draft, writing – Review & Editing Sylwia Prochowska: writing-original draft. Anna M. Duszewska: methodology. Ann Van Soom: supervision, writing – original draft. Wanda Olech: funding acquisition, supervision. Wojciech Nizański: conceptualization, funding acquisition, methodology, supervision, Writing - Review & Editing. The author(s) read and approved the final manuscript.

### Funding

This research was funded by the Forest Fund (Poland), grant number OR.271.3.10.2017 and supported by the Polish National Agency for Academic Exchange under Grant No. PPI/APM/2019/1/00044/U/00001.

### Availability of data and materials

The datasets used during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

The authors declare that during the work, no animal studies were conducted and no animals were shot on purpose of those studies. Samples were collected post-mortem from individuals shot under the permits issued by the General Director for Environmental Protection. Local Ethics Committee approval was not required.

A permit issued by the Regional Director for Environmental Protection in Wrocław (WPN.6401.170.2019.MH) for the possession and keeping of *Bison bonasus* cells, sperm, oocytes, and fibroblasts at the Bison Sperm Bank located in the building of the Department of Reproduction with the Clinic of Farm Animals at 49 Grunwaldzki Square, Wrocław, Poland.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Plac Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław, Poland. <sup>2</sup>Department of Morphological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159 St, 02-787 Warsaw, Poland. <sup>3</sup>Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium. <sup>4</sup>Department of Animal Genetics and Conservation, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8 St, 02-786 Warsaw, Poland.

Received: 8 May 2022 Accepted: 31 July 2022  
Published online: 10 August 2022

**References**

- Pucek Z, Belousova I, Krasieńska M, Krasieński Z, Olech W. European bison. Status Survey and Conservation Action Plan. Gland, Switzerland and Cambridge, UK IUCN/SSB Bison Specialist Group IUCN; 2004. p. 1–54.
- Slatis M. An analysis of inbreeding in the European bison. *Genetics*. 1960;45:275–87.
- Olech W. Analysis of inbreeding in European bison. *Acta Theriol*. 1987;32:373–87.
- Comizoli P, Mermillod P, Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev*. 2000. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000113>.
- Prieto Pablos M, Sánchez-Calabuig M, Hildebrandt T, Santiago-Moreno J. Sperm cryopreservation in wild animals. *Eur J Wildl Res*. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0858-4>.
- Lee H, Kim S, Ji D, Kim Y. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *J Vet Sci*. 2009. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.3.249>.
- Bailey J, Bilodeau J, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*. 2000;21(1):1–7.
- Khan IM, Cao Z, Liu H, Khan A, Rahman S, Khan MZ, et al. Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm Cryo-tolerance in farm animals. *Front Vet Sci*. 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>.
- Rozati H, Handley I, Jayasena C. Process and pitfalls of sperm cryopreservation. *J Clin Med*. 2017. <https://doi.org/10.3390/jcm6090089>.
- Martinez-Alborcia M, Valverde A, Parrilla I, Vazquez J, Martinez E, Roca J. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS One*. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036550>.
- Morrell J, Moffatt O, Sakkas D, Manicardi G, Bizzaro D, Tomlinson M, et al. Reduced senescence and retained nuclear DNA integrity in human spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *J Assist Reprod Genet*. 2004. <https://doi.org/10.1023/b:bjarg.000040237.47026.0f>.
- Sieme H, Oldenhof H. Sperm cleanup and centrifugation processing for cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2015. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-1_16).
- Kopera I, Szczepanowicz M, Gizejewski Z, Sadowska J, Bilińska B. Immunoeexpression of aromatase in immature and adult males of the European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Reprod Domest Anim*. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01280.x>.
- Correa J, Zavos P. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology*. 1996. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(96\)00293-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(96)00293-2).
- Samardžija M, Karadžole M, Matković M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, et al. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci*. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.005>.
- Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel-López L, López-Urueña E, Manrique P, Borragán S, et al. Effect of colloid (Androcoll-bear, Percoll, and PureSperm) selection on the freezability of brown bear (*Ursus arctos*) sperm. *Theriogenology*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.021>.
- Duszczyńska AM, Baraniewicz-Kolek M, Bielecki W, Nizański W, Partyka A, Bernat A, et al. Cellular technologies (in vitro production of embryos, germplasm preservation and somatic reprogramming) for wisent (European bison) gene pool conservation. *Concepts Dairy Vet Cci*. 2020. <https://doi.org/10.32474/cdvs.2020.03.000172>.
- Duszczyńska AM, Gręda P, Baraniewicz M, Bielecki W, Nizański W, Partyka A, et al. Obtaining wisent early blastocyst in vitro is a basic for protection and creation of biodiversity for this threatened species. *Reprod Domest Anim*. 2018. <https://doi.org/10.1111/rda.13168>.
- Duszczyńska A, Olech W, Trzeciak P, Krzysiak M, Rapala L, Nowak Z, Dabrowski S. The preliminary results of in vitro production of the wisent hybrid embryos. *Reprod Fertil Dev* 2014; <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/RDv27n1Ab258>.
- Tabecka-Lonczynska A, Mytych J, Solek P, Kowalewski M, Koziorowski M. Seasonal expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1), its receptor IGF-1R and klotho in testis and epididymis of the European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Theriogenology*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.016>.
- Tabecka-Lonczynska A, Mytych J, Solek P, Kulpa M, Koziorowski M. New insight on the role of melatonin receptors in reproductive processes of seasonal breeders on the example of mature male European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *J Photochem Photobiol B*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.026>.
- Tabecka-Lonczynska A, Mytych J, Solek P, Kulpa M, Greszta M, Sowa-Kucma M, Koziorowski M. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and fibroblast growth factor (FGF-2) as potential regulators of seasonal reproductive processes in male European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Gen Comp Endocrinol*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.007>.
- Koziorowska-Gilun M, Gilun P, Fraser L, Koziorowski M, Kordan W, Stefanczyk-Krzyszowska S. Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in reproductive tract of adult male European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Reprod Domest Anim*. 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02015.x>.
- Daleszczyk K. Mother-calf relationships and maternal investment in European bison *Bison bonasus*. *Acta Theriol*. 2004;49(4):555–66.
- Krasieński Z, Bisoniana XXV RJ. The reproduction biology of European bison living in reserves and in freedom. *Acta Theriol*. 1967;12(29):407–44.
- Eberhardt M, Nizański W, Olech W, Prochowska S. Assisted reproductive techniques in wisents: achievements and further challenges. *Med Weter*. 2021. <https://doi.org/10.21521/mw.6539>.
- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herrera P, de Paz P, et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.045>.
- Mendes JO Jr, Burns PD, De La Torre-Sanchez JF, Seidel GE Jr. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*. 2003. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00029-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00029-3).
- Arias M, Andara K, Briones E, Felmer R. Bovine sperm separation by swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.03.002>.
- Oliveira LZ, Arruda RP, Celeghini EC, de Andrade AF, Perini AP, Resende MV, et al. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia*. 2012;44(1):9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01096.x>.
- Somfai T, Bodó S, Nagy S, Papp AB, Iváncsics J, Baranyai B, et al. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 2002;37(5):285–90. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00350.x>.
- Hishinuma M, Sekine J. Separation of canine epididymal spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. *Theriogenology*. 2004;61(2–3):365–72. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00219-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00219-x).
- García-Álvarez O, Soler AJ, Maulen Z, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Martín-Maestro A, et al. Selection of red deer spermatozoa with different cryoresistance using density gradients. *Reprod Domest Anim*. 2016;51(6):895–900. <https://doi.org/10.1111/rda.12755>.
- Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, De Causmaecker V, Devulf J, Pope CE, et al. Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 degrees C) on sperm quality.

- Theriogenology. 2008;70(9):1550–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.004>.
35. Lessley BA, Garner DL. Distribution of Pz-peptidase in bovine epididymal and ejaculated semen. *Biol Reprod*. 1983;28(2):447–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.2.447>.
  36. Noguchi M, Yoshioka K, Hikono H, Iwagami G, Suzuki C, Kikuchi K. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. *Zygote*. 2015. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000208>.
  37. Szostak B, Buryś, Ł. Effect of breed and age on the morphology of a.i. boars spermatozoa. *Ann UMCS Zootech*. 2011;29:44–51. <https://doi.org/10.2478/v10083-011-0010-9>.
  38. Niżański W, Dubiel A, Bielas W, Dejneka G. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*. 2001;57:365–9.
  39. Niżański W, Partyka A, Rijsselaere T. Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reprod Domest Anim*. 2012. <https://doi.org/10.1111/rda.12048>.
  40. Partyka A, Rodak O, Bajzert J, Kochan J, Niżański W. The effect of L-carnitine, Hypotaurine, and taurine supplementation on the quality of cryopreserved chicken semen. *Biomed Res Int*. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7279341>.
  41. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*. 2002. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00663-5).
  42. Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*. 2001. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00160-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00160-9).
  43. Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00308-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00308-3).
  44. Neagu VR, García BM, Sandoval CS, Rodríguez AM, Ferrusola CO, Fernández LG, et al. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.021>.
  45. Evenson DP. The sperm chromatin structure assay SCSA<sup>®</sup> and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



Maria Eberhardt

imię i nazwisko

Wrocław, 10.09.2023

miejsowość i data

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

afiliacja

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Eberhardt M, Prochowska S, Duszevska AM, Van Soom A, Olech W, Nizański W. *The influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen wisent (Bison bonasus) epididymal spermatozoa.* BMC Vet Res. 2022 Aug 10;18(1):305. doi: 10.1186/s12917-022-03408-z. mój udział polegał na udziale w projektowaniu oraz przeprowadzeniu opisanych badań, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, a także korekcji na etapie recenzji.

Potwierdzam treść oświadczenia.

10.09.2023 *Stult Mous*

data i podpis

13.09.2023

data i podpis promotora



#### 14. ZAŁĄCZNIK 3

Realizacja zadania 4 oraz otrzymane wyniki zostały przedstawione w postaci preprintu:

Eberhardt M., Colombo M., Prochowska S., Luvoni G.C., Olech W., Nizański W. The first report on the use of a zona pellucida binding assay to compare the effects of European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa cryopreservation in two different extenders. bioRxiv 2023.09.11.557052; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.09.11.557052>

1 The first report on the use of a zona pellucida binding assay to compare the effects of European  
2 bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa cryopreservation in two different extenders

3 Maria Eberhardt<sup>1\*</sup>, Martina Colombo<sup>2</sup>, Sylwia Prochowska<sup>1</sup>, Gaia C. Luvoni<sup>2</sup>, Wanda Olech<sup>3</sup> and Wojciech Nizański<sup>1\*</sup>

4 <sup>1</sup> Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life  
5 Sciences, Plac Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław, Poland; maria.eberhardt@upwr.edu.pl; sylwia.prochowska@upwr.edu.pl;  
6 wojciech.nizanski@upwr.edu.pl

7 <sup>2</sup> Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences (DIVAS), University of Milan, 26900 Lodi, Italy; martina.colombo@unimi.it;  
8 cecilia.luvoni@unimi.it

9 <sup>3</sup> Department of Animal Genetics and Conservation, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-  
10 786 Warsaw, Poland; wanda\_olech@sggw.edu.pl

11 \*Correspondence: maria.eberhardt@upwr.edu.pl & wojciech.nizanski@upwr.edu.pl

12

13 **Abstract:** The wisent (or European bison) *Bison bonasus* is a species that has gone through a  
14 bottleneck, resulting in a narrow gene pool of the current population. Presently, the protection  
15 program for this species, in addition to protecting the habitat, is aimed at preserving gene pool. One  
16 of its elements is creating a bank of gametes with the intention of using them in constantly  
17 developed Assisted Reproductive Techniques in this species. In order to use the potential of the  
18 gametes stored in the bank as effectively as possible, it is extremely important to assess their post-  
19 freezing quality. Wisent epididymal spermatozoa stored in the bank are evaluated using basic semen  
20 analysis methods, the CASA system and flow cytometry. So far, functional tests of spermatozoa have  
21 not been introduced to the evaluation protocol of spermatozoa obtained post mortem from  
22 European bison. This article, for the first time describes the use of the zona pellucida binding test to  
23 assess the quality of cryopreserved wisent epididymal spermatozoa. Due to the close relationship  
24 between the species, the Zona binding Assay protocol developed for cattle was used. To exclude the  
25 influence of the composition of the extender used for cryopreservation, the spermatozoa were  
26 cryopreserved in the Extender based on Tris buffer, egg yolk and glycerol and in the commercial  
27 extender Andromed<sup>®</sup>. Regardless of the diluent used, 100% of the oocytes had sperm attached. The  
28 average number of spermatozoa attached to the oocyte was 66.26 for the Tris-based diluent group  
29 and 27.37 for the Andromed<sup>®</sup> - frozen group. The advantage of the Tris based extender resulted from  
30 ZBA seems to coincide with the results of the basic and advanced semen evaluation. The conducted  
31 experiment showed that the ZBA protocol developed for cattle is suitable for the evaluation of  
32 wisent epididymal spermatozoa.

33 Keywords: ZBA; Zona Binding Assay; ART; wisent; European bison; epididymal; spermatozoa

34

## 35 1. Introduction

36 Assisted reproductive techniques (ART) are a great achievement not only in the reproduction of  
37 livestock or companion animals, but also in the dynamically developing methods of wild species  
38 protection programmes [1-2]. However, to be successful in their implementation, it is necessary to  
39 thoroughly understand the reproductive physiology of a given species and the characteristics of its  
40 gametes. The weakest point, limiting the understanding of reproductive physiology and the  
41 development of ART in endangered species, is constricted availability of biological material. As a  
42 starting point for research on protected animals, techniques already developed in farm or companion  
43 animals are adopted [1]. However, materials, methods, and whole experiments designed for one  
44 species require significant revision to become suitable to another, taking into account the availability  
45 of the material and the physiology of the animals [1]. The basis for the introduction of assisted

46 reproduction in each species is the collection and cryopreservation of gametes [1-2]. The epididymal  
47 spermatozoa are considered as a valuable source of genetic material which usefulness in ART has  
48 been proven in numerous species [3-4]. In many cases, obtaining spermatozoa post-mortem from  
49 the epididymides due to animal welfare and law regulations is the only way to collect material from  
50 wild species, including European bison [3].

51 The European bison (*Bison bonasus* Linnaeus, 1758), also known as the wisent, is considered an  
52 integral part of native fauna of the European continent [5]. Intensive hunting and poaching, together  
53 with environmental degradation resulting from the development of civilization and armed conflicts  
54 were the main reasons for the extinction of the natural wisent population. In 1919 in the Białowieża  
55 Forest (Poland), the carcass of the last free-living wisent individual was found. The future of the  
56 whole species was resting on the shoulders of captive individuals (25 females and the 29 males), and  
57 gene pool of the current population carries the genes of merely 12 founders [5]. The decades-long  
58 activity aimed at restoring the European bison to its natural habitat has been an undeniable success.  
59 However, despite the fact that the number of European bison individuals is already more than 9,000  
60 [6], their narrow initial genetic pool carries a certain risk for its future. For this reason, currently,  
61 wisent conservation programs are enriched by preserving of genetic diversity by gametes banking  
62 and implementation of ART [2,5,7-8]. There are several reports in the literature on the collection and  
63 cryopreservation of wisent epididymal sperm [8-10]. In the cited studies, the effects of spermatozoa  
64 cryopreservation were assessed using phase contrast microscope, the CASA system and flow  
65 cytometry.

66 Data from human medicine revealed that basic semen analysis could not be considered as a strictly  
67 related predictive factor for pregnancy [11]. Detailed movement parameters evaluated by the CASA  
68 system may provide more accurate information about sire fertility potential [4]. Fluorescent staining  
69 with flow cytometry is an advanced method that allows to look into the structure of the sperm and  
70 thus its functioning [12]. However, the results of the flow cytometry could not decide alone about  
71 semen fertility potential.

72 The stage of spermatozoa - zona pellucida interactions is one of the milestones leading to fertilization  
73 which reflects sperm competence [11]. Consequently sperm- zona pellucida binding assay (ZBA) was  
74 included in evaluation of the semen prior to conventional in vitro fertilisation (IVF) in human  
75 laboratories [11]. The ZBA has also been used in animal reproduction studies. In bovine a positive  
76 correlation between the ZBA results and IVF was observed [13]. The use of this test to evaluate the  
77 results of sperm cryopreservation has been described, among others, in species such as: dog *Canis*  
78 *lupus familiaris* [14], cattle *Bos taurus* [15], buffalo *Bubalus bubalis* [16] and pig *Sus domesticus* [17].  
79 To the authors' best knowledge, there are no reports in the literature about the use of Zona Binding  
80 Assay to evaluate wisent epididymal spermatozoa.

81 The aim of this study was to adapt the ZBA protocol to test the competence of cryo-preserved wisent  
82 epididymal spermatozoa. Due to the great value of the oocytes obtained from European bison  
83 females, it was decided to develop the protocol with the use of heterologous bovine oocytes. The  
84 close relationship of these species and the success in obtaining wisent and cattle hybrids[9]  
85 determined this choice. This interspecies approach with the use of bovine oocytes was successfully  
86 used in research on other wild animal sperm, such as scimitar - horned oryx *Oryx dammah*,  
87 bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*, or sika deer *Cervus nippon* and red deer *Cervus elaphus* [18-  
88 20]. To detect possible differences in ZBA resulting from extender composition, spermatozoa samples  
89 were split and frozen using a) Tris buffer, hen egg yolk and glycerol-based extender (TEG) or b)  
90 Andromed®, a commercial medium dedicated to bovine semen. In addition, to validate the ZBA

91 protocol, the obtained results were related to the effects of basic and advanced sperm analysis using  
92 the CASA system and flow cytometry.

## 93 2. Materials and Methods

94 The spermatozoa were obtained post-mortem from 1 wisent individual from free roaming herd and  
95 subjected to planned elimination under conditions regulated by Polish law (The Nature Conservation  
96 Act 2004). The bovine oocytes used in zona pellucida binding assay were obtained from ovaries  
97 collected in a slaughterhouse. No animal was killed to obtain material for these studies. The Approval  
98 of the local ethics committee was not required.

### 99 Reagents

100 The fluorescent probes: Live/Dead Sperm Viability Kit: SYBR-14, propidium iodide (PI); PNA from  
101 *Arachis hypogaea* Alexa Fluor® 488 conjugate; JC-1; YO-PRO-1; C11-BODIPY581/591; acridine orange  
102 (AO) were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA. Rest of chemicals were  
103 bought from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA.

### 104 Collection of spermatozoa

105 Immediately after the death of the wisent, the epididymides were separated from the testes. The  
106 epididymal tails were cut off and then placed on a Petri dish with 5 ml of TRIS based extender (Tris  
107 (2.4g), citric acid (1.4g), glucose (0.8g), penicillin (5000IU) streptomycin (100mg) and distilled  
108 water up to 100ml). Subsequently, a series of incisions were made with a scalpel blade aimed to  
109 release the sperm into the extender. After collection, samples were placed on the heating table for 5  
110 minutes before further analysis.

### 111 Initial sperm analysis

112 Spermatozoa obtained from each epididymal tail were treated as separate samples and subjected to  
113 initial semen assessment (concentration, motility, viability and morphology) with the use of phase  
114 contrast microscope (Nikon Eclipse E200).

115 For subjective motility assessment, warm stage was connected to the microscope. Ten microliters of  
116 samples were placed on the microscope slide and covered with a cover slip. Both microscope slide  
117 and cover slip were warmed before the assessment ( $\times 400$ ). Subjective motility was assessed by two  
118 independent researchers and the mean value was calculated.

119 Concentration per unit volume [106 cells/ ml] was assessed using the Thoma chamber ( $\times 400$ ).

120 To assess the percentage of live and dead spermatozoa, smears of 10  $\mu$ L of the samples and 10  $\mu$ L of  
121 the eosin-nigrosin dye were made. Pink-stained spermatozoa were classified as dead. Unstained  
122 (white) spermatozoa were classified as live.

123 For morphology assessment, smears from 10  $\mu$ L of samples were made and left for drying for 24  
124 hours. The next day smears were placed in 96% ethanol solution for 5 minutes fixation. After fixation  
125 slides were placed in a 1% water solution of eosin for 3 min. After rinsing in distilled water, the smear  
126 was stained for 3 min with gentian pigment (methylene blue 2% w/v, gentian violet 0.75% w/v,  
127 glycerol 5% v/v in distilled water). After staining, the smears were rinsed, dried and then evaluated.  
128 Two hundred spermatozoa were classified. Proximal droplet, head abnormalities, acrosome  
129 abnormalities, midpiece defects, dag-like defect, distal droplet, bent tail, detached head, coiled tail  
130 were evaluated. Spermatozoa which were not showing particular defects were classified as normal.

131

132 Semen freezing

133 After the initial assessment obtained spermatozoa of each epididymis were divided into two equal  
134 parts and cryopreserved with two different methods.

135 One part of spermatozoa was subjected to cryopreservation in Tris buffer, egg yolk and glycerol  
136 based semen extender (TEG) according to the protocol used before in wisent [8-9].

137 Initially, at room temperature, samples were diluted with Tris based extender (Tris (2.4g), citric acid  
138 (1.4g), glucose (0.8g), egg yolk (20% v/v), penicillin (5000IU) streptomycin (100mg) and distilled  
139 water up to 100ml) to obtain the final concentration  $200 \times 10^6$ /ml. Subsequently, samples were  
140 placed in a water bath and put into a refrigerator for cooling down to 5°C. When the samples  
141 reached a temperature of 5°C, they were diluted with a chilled extender to the final concentration  
142  $160 \times 10^6$  cells/mL. The chilled extender was reached with the glycerol in the amount 6% of the final  
143 volume. Samples were left for 90 minutes equilibration. After equilibration, samples were loaded  
144 into 0.25ml french straws ( $40 \times 10^6$  spermatozoa per straw). The free straw ends were closed with  
145 polyvinyl alcohol (PVA). Filled straws were placed in liquid nitrogen vapours for 15 minutes and then  
146 immersed in liquid nitrogen and placed in storage tanks.

147 The second part of spermatozoa was subjected to cryopreservation in Andromed®, a commercially  
148 available bovine semen extender, according to a previously described protocol [24]. Spermatozoa  
149 were diluted at room temperature with Andromed® up to the final concentration  $160 \times 10^6$   
150 sperm/ml. Subsequently, 0.25 ml straws were filled with extended spermatozoa ( $40 \times 10^6$   
151 spermatozoa per straw). Each free straw end was closed with PVA. Straws were placed in the fridge  
152 for slow cooling down to 4°C for 4 hours. After equilibration, straws were placed in liquid nitrogen  
153 vapors for 15 minutes. After equilibration time, straws were immersed in the liquid nitrogen and  
154 placed in the storage tanks.

155 Thawing

156 The straws were removed from liquid nitrogen tank and placed for 30 seconds in a water bath  
157 (37°C). After thawing, spermatozoa were subjected to evaluation.

158 Post- thawing initial semen assessment

159 After thawing samples were subjected to the same as described above, initial analyses - subjective  
160 motility, morphology and viability.

161 Assessment of thawed sperm movement parameters with CASA

162 The HTM IVOS version 12.2 (Hamilton-Thorne Biosciences Beverly, MA, USA) semen analyzer was  
163 used for detailed movement characterization of thawed spermatozoa. The CASA setups devoted for  
164 bull spermatozoa were used (frame rate (60Hz), frames acquired (30), minimum contrast (80),  
165 minimum cell size (5 pixels), low VAP cut-off ( $30 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) and low VSL cut-off ( $15 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) [25].

166 The percentage of motility (MOT, %) and progressive motility (PMOT, %), were assessed. Following  
167 sperm movement characteristic were evaluated: curvilinear velocity VCL ( $\mu\text{m}/\text{s}$ ), average path  
168 velocity VAP ( $\mu\text{m}/\text{s}$ ), straight line velocity VSL ( $\mu\text{m}/\text{s}$ ), linearity LIN (%), straightness STR (%),  
169 amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ), beat cross frequency BCF (Hz). Rapid, medium,  
170 slow and static sperm subpopulations were also distinguished.

171 Evaluation of thawed spermatozoa by the fluorescent staining and flow cytometry.

172 Membrane and acrosome integrity, lipid peroxidation, apoptosis like changes, mitochondrial activity,  
173 membrane lipid disorders and chromatin status were assessed.

174 All parameters were evaluated using Guava EasyCyte 5 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)  
175 cytometer. The fluorescent probes used in the experiment were excited by an argon ion 488nm  
176 laser. Gametes acquisitions were analysed with the GuavaSoft™ 3.1.1 software (Merck KGaA,  
177 Darmstadt, Germany). The non-sperm events were gated out based on scatter properties and not  
178 analysed. A total of 10,000 events were analysed for each sample [8].

179 The staining used were performed according to protocols routinely used in our laboratory, which  
180 have been previously described in wisent [8].

181 SYBR-14 stain combined with propidium iodide (PI) was used for assessing of sperm membrane  
182 integrity. Spermatozoa with intact membranes emit green fluorescence. Cells showing red  
183 fluorescence were classified as dead.

184 Lectin (PNA, Peanut Agglutinin) stain from Arachis hypogaea Alexa Fluor® 488 conjugate combined  
185 with propidium iodide (PI) was used for acrosome integrity evaluation. Spermatozoa emitting green  
186 fluorescence 427 were classified as those with damaged acrosome.

187 The cyanine dye JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimi- dazolylicar-bocyanine  
188 iodide) with PI was used to determine mitochondrial activity. Spermatozoa emitting orange  
189 fluorescence were classified as live having high mitochondrial membrane potential and emitting  
190 green fluorescence as those live with low mitochondrial potential.

191 C11-BODIPY581/591(BODIPY, Boron dipyrromethene difluoride) probe combined with PI was used  
192 for lipid peroxidation assessment. Spermatozoa which remain un-stained spermatozoa were  
193 classified as living population without lipid peroxidation.

194 YO-PRO-1 (Oxazole yellow, 4-[(3-methyl-1,3-benzoxazol-2(3H)-ylidene)methyl]-1-[3-  
195 trimethylammonio)propyl] quinolinium diiodide) dye combined with PI was used to detect  
196 spermatozoa with apoptosis like changes. Green fluorescence is characteristic for cells showing  
197 apoptotic like changes. Unstained spermatozoa were categorized as living population without  
198 apoptotic like changes.

199 Acridine orange (AO) dye was used to determine the chromatin status of thawed spermatozoa.  
200 Spermatozoa with normal DNA configuration were emitting green fluorescence. These gametes  
201 emitting red fluorescence classified as cells with denatured DNA.

202 The adaptation of zona pellucida binding assay for wisent frozen/thawed epididymal spermatozoa  
203 evaluation

204 The zona binding capacity of frozen/thawed wisent spermatozoa has been evaluated by using intact  
205 heterologous oocytes obtained from frozen/thawed bovine ovaries according to the protocol  
206 described before [26] with small modifications.

207 Control for the ZBA consisted in commercial frozen bull semen of proven fertility.

208 Collection and preparation of the oocytes.

209 Bovine ovaries after obtaining from slaughterhouse were stored at -20°C and re-moved from the  
210 freezer 12 hours before planned oocytes collection.

211

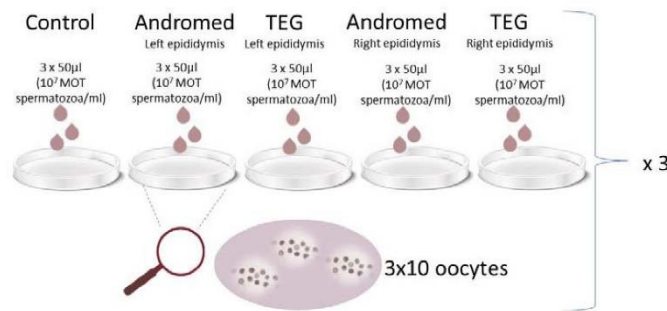
212 Thawed ovaries were placed on a Petri dishes containing phosphate buffered saline (PBS) and  
213 antibiotics (100 IU/mL of penicillin G sodium, 0.1 mg/mL of streptomycin sulfate) with 0.1% w/ PVA  
214 (PBS/PVA medium) and minced with scalpel blade to release oocytes. Only oocytes with intact zona  
215 pellucida were selected by using small bore glass pipette. Selected oocytes were placed in a 4-well  
216 dish with PBS/PVA to remove cumulus cells using a 200  $\mu$ L automatic pipette. Subsequently oocytes  
217 were washed twice in modified Tyrode's-albumin-lactate-pyruvate medium (TALP) [27]. Washed  
218 oocytes were placed in 50  $\mu$ L drops of TALP + penicillamine-hypotaurine-epinephrine (PHE) [28] under  
219 paraffin oil (10 oocytes/drop) and put in the incubator (38.5°C in a 5% CO<sub>2</sub>-air atmosphere (100%  
220 relative humidity).

#### 221 Semen preparation:

222 Thawed semen was centrifuged at 500g for 3 minutes and resuspended in TALP+PHE. The subjective  
223 motility and concentration was assessed to establish the dilution needed to obtain final  
224 concentration of 10<sup>7</sup> motile sperm/ml. Each drop containing oocytes was inseminated with 50  $\mu$ L of  
225 prepared semen. The oocytes were incubated with semen for 3 hours at 38.5°C in a 5% CO<sub>2</sub>-air  
226 atmosphere (100% relative humidity).

227 The zona binding assay was performed in three replicates (n=3). One straw from each epididymis and  
228 extender was thawed for each replication. One straw of commercially frozen bull semen was thawed  
229 aimed to constitute the control group. The scheme of the experiment is presented in the figure 1.

230



231

232 **Figure 1. Scheme of the zona pellucida binding assay**

233

#### 234 Oocyte fixation and staining

235 After incubation oocyte-sperm complexes were pipetted to remove loosely bound spermatozoa.  
236 Subsequently, complexes were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS for 10 min [29]. After fixation,  
237 sperm-oocyte complexes were placed in PBS/PVA in the fridge until the next day.

238 All sperm-oocyte complexes were evaluated to count the number of adherent spermatozoa by a bis-  
239 benzimide (Hoechst 33342) staining. Two small drops of medium with 5 sperm-oocyte complexes  
240 each, were placed on the microscope slide and 10  $\mu$ L of Hoechst Working solution (0.01 mg/mL) was  
241 added to each drop and left in the dark for 5 minutes.

242 After incubation, medium was removed from the slides. 5 µl of antifading solution was added. After 2  
243 minutes, oocytes were covered with cover slip and sealed with silicone.

244 The number of spermatozoa bound to each oocyte was counted under a fluorescence microscope  
245 (x400; Zeiss Axiovert 100).

#### 246 Statistical analysis

247 The material used in the experiment came from two epididymides of one individual, therefore the  
248 results of the spermatozoa analysis were presented as averages and only descriptive statistics were  
249 used.

250 For ZBA results Shapiro-Wilk's test was used to assess data normality. Nonparametric test (Wilcoxon  
251 signed ranks test) were used to evaluate differences between samples. Differences were considered  
252 significant at  $p \leq 0.05$ .

253 An asymptotic test for the equality of coefficients of variation from k populations was used to  
254 evaluate the statistical significance of the differences in the results between ZBA replicates [30].

### 255 3. Results

#### 256 3.1. Characteristics of wisent epididymal spermatozoa obtained post mortem.

257 Subjective motility assessed immediately after collection was assessed as 60% for spermatozoa  
258 obtained from both epididymides.

259 The mean concentration of spermatozoa isolated from the epididymis was 317.5 million/mL.

260 The mean percentage of viable sperm assessed with the eosin-nigrosin dye was 78.8%.

261 The mean percentage of sperm with normal morphology was 88.0%.

#### 262 3.2. Basic frozen/thawed semen assessment

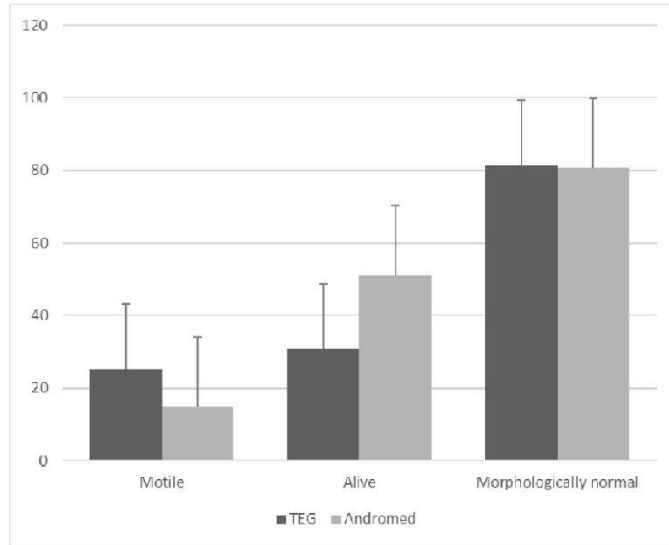
263 Samples frozen/thawed in TEG extender were characterized by higher percentage of motile  
264 spermatozoa than those frozen/thawed in Andromed®. Which were 25% and 15% respectively.  
265 (Fig.2).

266 The mean percentage of viable spermatozoa, assessed by eosin dye was 30.75 % for TEG and 51.25 %  
267 for Andromed® (Fig.2).

268 The percentage of spermatozoa with normal morphology was comparable for both diluents and  
269 amounted to 81.5 % and 80.75 % for TEG and Andromed®, respectively (Fig.2).

270 A comparison of the above-mentioned parameters is shown in Figure 2 (Fig 2).



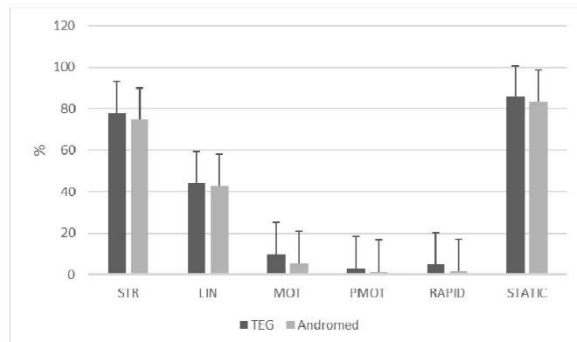


271

272 **Figure 2. Basic characteristic of frozen/thawed wisent spermatozoa cryopreserved in Tris buffer, hen egg yolk and**  
 273 **glycerol based extender (TEG) or Andromed®**

274 **3.3 Characteristic of post- thaw wisent spermatozoa motility assessed by CASA.**

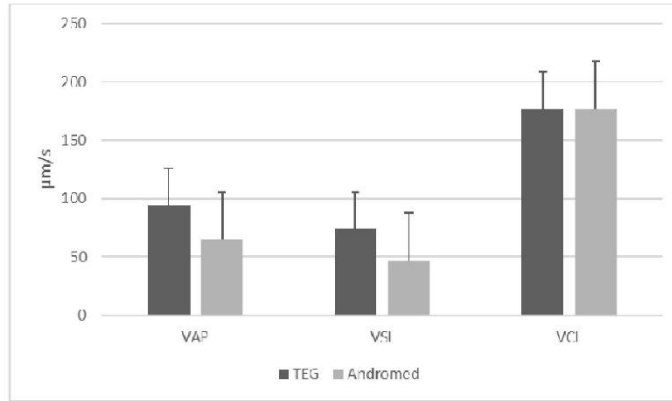
275 The motility of the obtained spermatozoa assessed using the CASA system was low for both  
 276 extenders. The mean percentage of motility (MOT, %) and progressive motility (PMOT, %), were  
 277 higher in Tris based extender than in Andromed® and were respectively 10% and 3% for TEG and  
 278 5.5% and 1% for Andromed®. The percentage of the static sperm population was similar in TEG (85.5  
 279 %) and Andromed® (83.5 %). In the rapid population, a higher percentage of fast sperm was shown in  
 280 TEG (5.0 %) than in Andromed® (1.5 %), linearity (LIN) and straightness (STR) were higher in TEG than  
 281 Andromed® (Figure 3)



282

283 **Figure 3. Characteristic of post- thaw wisent spermatozoa cryopreserved with Tris buffer, hen egg yolk and glycerol based extender**  
 284 **(TEG) or Andromed® motility assessed by CASA- straightness STR (%); linearity LIN (%); motility MOT (%); progressive motility PMOT**  
 285 **(%); percentage of rapid sperm RAPID (%); percentage of static sperm STATIC (%).**

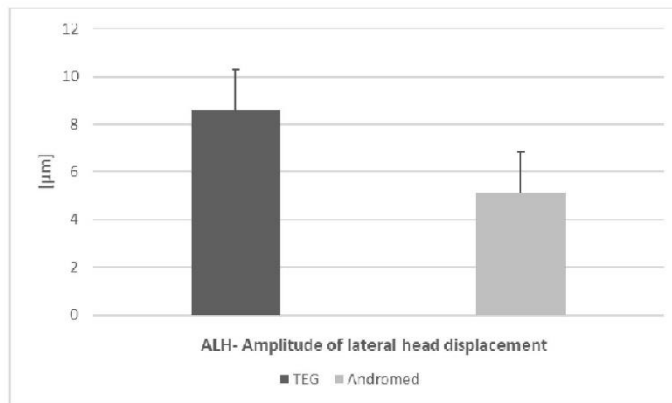
286 The average path velocity (VAP) and straight line velocity (VSL) were higher in TEG. The curvilinear  
287 velocity (VCL) was similar in both groups (Figure 4).



288

289 Figure 4. Characteristic of post- thaw wisent spermatozoa cryopreserved with Tris buffer, hen egg yolk and glycerol based extender  
290 (TEG) or Andromed® motility assessed by CASA - average path velocity VAP ( $\mu\text{m/s}$ ); straight line velocity VSL ( $\mu\text{m/s}$ ); curvilinear velocity  
291 VCL ( $\mu\text{m/s}$ ).

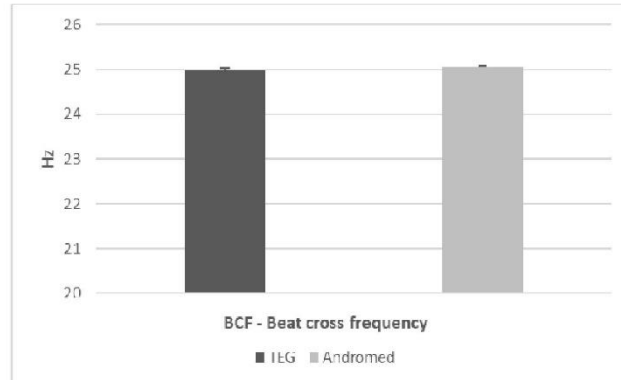
292 The average Amplitude of lateral head displacement (ALH) was higher in TEG than in Andromed® and  
293 amounted to 8.55  $\mu\text{m}$  and 5.1  $\mu\text{m}$  respectively (Figure 5).



294

295 Figure 5. Characteristic of post- thaw wisent spermatozoa cryopreserved with Tris buffer, hen egg yolk and glycerol based extender  
296 (TEG) or Andromed® motility assessed by CASA - Amplitude of lateral head displacement ALH ( $\mu\text{m}$ )

297 The beat cross frequency (BCF) was 25.05 Hz for Andromed® and was comparable with 25.00 HZ  
298 assessed in TEG (Figure 6).



299

300 Figure 6. Characteristic of post- thaw wisent spermatozoa cryopreserved with Tris buffer, hen egg yolk and glycerol based extender  
301 (TEG) or Andromed® motility assessed by CASA - Beat cross frequency BCF (Hz)

302 **3.4 The morpho-functional characteristics of frozen/thawed wisent spermatozoa**

303 The percentage of spermatozoa characterized by an intact sperm membrane and acrosome after  
304 thawing was higher in Andromed® than in TEG. Other parameters of morpho-functional  
305 characteristics like percentages of viable: nonapoptotic cells, cells with high mitochondrial potential,  
306 intact chromatin and without lipid peroxidation were better in samples frozen in TEG. The results of  
307 the assessment of functional and structural parameters assessed by flow cytometry are presented in  
308 Table 1.

	Live cells with intact sperm membrane [%]	Live cells with intact acrosome [%]	Live non apoptotic cells [%]	Live cells with high mitochondrial activity [%]	Live cells with fragmented chromatin [%]	Live cells without lipid peroxidation [%]
TEG	14.54	29.24	46.49	34.73	0.1	17.46
Andromed®	26.12	55.16	36.5	1.39	0.30	8.45

309

310 Table 1. The functional characteristics of wisent epididymal spermatozoa cryo-preserved in Tris buffer, hen egg yolk and glycerol based  
311 extender (TEG) and Andromed®. The data are presented as mean. (n=2).

312 **3.5. Zona pellucida binding assay**

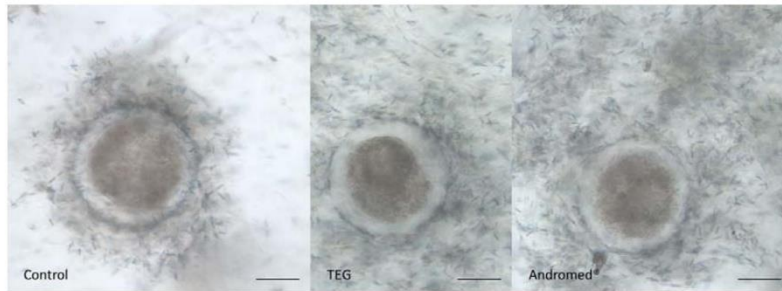
313 Regardless of the extender used, all oocytes were with bound spermatozoa. The minimum number of  
314 bound spermatozoa was 29 for control, 3 for TEG and 2 for Andromed® groups. The highest number  
315 of attached sperm was observed in control group for all replicates. The mean number of bound  
316 spermatozoa was higher in extender based on Tris and chicken egg yolk than in Andromed®, but in  
317 both extenders it was markedly lower than in control (Table 2). Representative images are reported  
318 in Figure 7 and 8.

319 The value of the test statistic in the asymptotic test of homogeneity of coefficients of variation was  
320 58.74 (p=0.85). The differences in the variability of the results for 6 repetitions are not statistically  
321 significant.

	The mean number of spermatozoa bound to oocyte	Oocytes with bound spermatozoa (%)
Control	166.11 ± 50.60	100.00
TEG	66.26 ± 7.93	100.00
Andromed®	27.37 ± 2.37	100.00

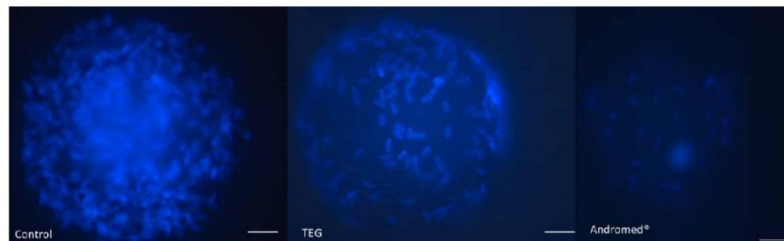
322  
323  
324  
325

Table 2. Post-thaw ability of wisent epididymal spermatozoa cryopreserved in Tris buffer, hen egg yolk and glycerol based extender (TEG) and Andromed® to bind heterologous zona pellucidae. Data are presented as mean ± SE of 6 replicates (3 for samples from left epididymis and 3 from right), 30 oocytes per replicate in each group. a, b, care significantly different ( $p < 0.05$ )



326  
327  
328

Figure 7. Representative pictures of Zona Binding Assay of wisent spermatozoa cryopreserved with two different extenders (TEG (Tris buffer, egg yolk and glycerol based extender), or Andromed®) and control bull cryopreserved semen. Objective 40X, scale bar = 50µm.



329  
330  
331  
332

Figure 8. Representative pictures of Zona Binding Assay of wisent spermatozoa cryopreserved with two different extenders (TEG (Tris buffer, egg yolk and glycerol based extender), or Andromed®) and control bull cryopreserved semen. Hoechst 33342 staining. Objective 40X, scale bar = 20 µm.

#### 333 4. Discussion

334 Epididymal spermatozoa collected post mortem are considered as a valuable source of gametes for  
 335 protected animals genome banks [4]. For some species, such as European bison, they are the only  
 336 source of male gametes that can be cryopreserved and used later in ART [2,8]. The possibility of  
 337 effective cryopreservation of wisent epididymal spermatozoa has been presented in a few  
 338 publications [8,9]. However, to be able to fully utilize their potential, deep knowledge of them is  
 339 needed [1,4]. Spermatozoa collected post mortem from a protected species are extremely valuable,  
 340 but also problematic research material, due to limitation in their availability. Therefore, there is a  
 341 need do make the choice for which research to devote them. It is desirable, to keep the sufficient  
 342 amount of spermatozoa for ART and at the same time obtain as much information as possible about

343 them. For this reason, research on methods for their full post thawed characterization are being still  
344 developed. Cases of cryopreservation of wisent epididymal spermatozoa and the assessment of its  
345 effects described so far in the literature, were grounded on basic methods (viability, subjective  
346 motility and morphology), computer-assisted sperm analysis and flow cytometry [8,9].

347 It was observed that defective acrosome reaction and/or zona pellucida interaction were frequently  
348 noticed in the semen of infertile man, regardless of the presence of normal or abnormal results of  
349 basic sperm assessment [11]. Semen assessment with the use of the CASA system makes it possible  
350 to assess the quality of the spermatozoa obtained on the basis of the detailed characteristics of their  
351 movement. As it was described in cattle, semen samples with large population of progressive and  
352 rapid spermatozoa are prone to have better sperm longevity after thawing [4]. It was described that  
353 velocity parameters such as average path velocity (VAP) and straight line velocity (VSL) are positively  
354 correlated with post-thaw motility, thus could constitute potential bull fertility markers [4]. However,  
355 there are too many factors, such as variation in semen parameters between individuals and  
356 ejaculates from the same individual, and the conditions of transport, storage and dilution of semen,  
357 that can negatively affect the results of evaluation by the CASA system.

358 Flow cytometry is a method that allows the evaluation of morpho-functional features of the  
359 spermatozoa. The standard flow cytometry protocol for semen evaluation used by the authors  
360 includes the evaluation of such features determining proper functioning of spermatozoa as: cell  
361 membrane and acrosome integrity, lipid peroxidation, apoptosis like changes, mitochondrial activity,  
362 membrane lipid disorders and chromatin status. The results of each of these parameters allow some  
363 conclusions to be drawn regarding the fertility of the collected and stored samples. The findings of  
364 each of these methods provide information about the quality of the semen obtained, but none of  
365 them alone can determine its fertilizing potential.

366 The fertilization potential of frozen wisent epididymal spermatozoa was evaluated in vivo tests by  
367 insemination of Holstein Friesian heifers. As a result of the cited study, domestic cattle and wisent  
368 hybrids were born [9]. With the use of gametes frozen in the Tris, egg yolk and glycerol based  
369 extender (TEG), an European bison early blastocyst was obtained in vitro [21]. The mentioned studies  
370 prove the fertilization capacity of European bison spermatozoa collected and cryopreserved in this  
371 way. However, there are no procedures described so far that would allow for the classification and  
372 evaluation of the fertilization potential of the stored material. For the protection of species diversity,  
373 the significant value of each collected genetic material is undeniable [2]. However, being able to  
374 approximately assess its fertilization potential, we can decide on its intended use - whether sperm  
375 frozen in a given collection can be used in the future for artificial insemination or whether their  
376 potential is sufficient to carry out classic in vitro ART (e.g., IVF).

377 The zona pellucida binding assay makes it possible to assess the sperm's ability to attach to the zona  
378 pellucida [14]. Binding of the sperm with the oocyte is the basic and one of a series of stages leading  
379 to fertilization. It takes place through the connection of a receptors on the spermatozoa membrane  
380 and glycoproteins of zona pellucida [22]. Therefore, this method allows to evaluate sperm for  
381 disturbances in the structure of the membrane that are not detectable by routine semen analysis  
382 procedures [14]. The correlation between ZBA results and in vivo fertility was observed in cattle [15].  
383 The ability to bind to the oocyte is a characteristic features of living cells [13-15]. The obtained  
384 results of viability and sperm membrane integrity seem to confirm this also in European bison.

385 The ZBA protocol used, based on research conducted on a related species, turned out to be suitable  
386 for the assessment of wisent epididymal spermatozoa. Both in the control group and in the groups of  
387 studied extenders, spermatozoa attached to all oocytes. The quality of cryopreserved spermatozoa

388 obtained after thawing was low regardless of the extender used. It is reflected in the results of their  
389 assessment using basic methods, CASA and flow cytometry, which support the results of ZBA.

390 Taking into account basic parameter of semen assessment- motility after thawing, samples from the  
391 control group were characterized by a higher percentage of subjective motility than in the both study  
392 groups. The results of detailed movement characterization using the CASA system showed better  
393 results of sperm frozen in TEG than in Andromed®. In addition, the mitochondrial potential assessed  
394 by the flow cytometer supports the CASA results. Therefore, the motility seems to match the results  
395 obtained in ZBA, although it should be remembered that the ZBA protocol was performed based on  
396 the same concentration of motile gametes in all the groups. The percentage of spermatozoa  
397 characterized by an intact sperm membrane and acrosome after thawing was higher in Andromed®  
398 than in TEG. Other parameters of structural and functional features and CASA were better in samples  
399 frozen in TEG. Ultimately, the results of the ZBA test seem to speak in favor of the TEG extender. This  
400 suggests that the analyzes performed so far are not able to detect particular membrane defects that  
401 affected the results of ZBA. However, following the sperm binding to the zona pellucida, acrosomal  
402 reaction requires a properly constructed acrosome [23]. For this reason, it could turn out that  
403 Andromed® could show better results in the zona pellucida penetration test or IVF. However, this  
404 requires repeating the comparison of diluents on a larger number of trials. Continuing this extenders  
405 comparison in the future, the variability between individuals should also be taken into account and  
406 the study group should be enlarged.

407 In cattle, a large variability in sperm-binding capacity has been observed within replicates and  
408 between ZBA replicates, which could also be due to oocyte variability [13]. In the presented  
409 experiment, although oocytes from multiple ovaries were used in order to reduce variability, we also  
410 noticed this variation between repetitions. However, regardless of the repetition, each time the  
411 sperm frozen in TEG showed a better ZBA result compared to those frozen in Andromed®. However,  
412 the use of two extenders was aimed to authenticate the assessment of the usefulness of the applied  
413 ZBA protocol for testing wisent epididymal spermatozoa. Therefore, the results described in the  
414 presented article cannot unambiguously assess the advantage of one of the extenders.

#### 415 5. Conclusions

416 It is not possible to evaluate the actual fertilization capacity of spermatozoa on the basis of the tests  
417 carried out so far in European bison. However, the zona pellucida binding assay is a step further in  
418 evaluating the reproductive potential of the collected material. The ZBA protocol using frozen bovine  
419 oocytes, developed for bull semen, is relatively simple to perform. Carried out experiment showed  
420 that it is suitable for European bison and therefore, should be included in the routinely used protocol  
421 for the evaluation of cryopreserved epididymal sperm from wisent.

#### 422 Author Contributions:

423 M.E.—conceptualization, performing the study, writing the manuscript; M.C. —performing and  
424 supervising the study, editing the manuscript; S.P.— correcting and editing the manuscript; G.C.L.—  
425 reviewing and correcting manuscript; W.O.—reviewing and correcting, funding acquisition; W.N.—  
426 conceptualization, reviewing and correcting, funding acquisition

427 Funding: This research was funded by the Forest Fund (Poland), grant number OR.271.3.10.2017 and  
428 supported by the Polish National Agency for Academic Exchange under Grant No.  
429 PPI/APM/2019/1/00044/U/00001.

430 Institutional Review Board Statement: No animal was killed to obtain material for these studies. The  
431 Approval of the local ethics committee was not required.

432 Data Availability Statement:

433 The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors [ME  
434 &WN], upon reasonable request.

435 Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

436

437 References

438 1. Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered  
439 mammalian species. *Reprod Nutr Dev*. 2000 Sep-Oct;40(5):493-504. doi:10.1051/rnd:2000113. PMID:  
440 11140819.

441 2. Eberhardt M, Nizański W, Olech W, Prochowska S. Assisted reproductive techniques in  
442 wisents: achievements and further challenges. *Med Weter*. 2021.  
443 <https://doi.org/10.21521/mw.6539>.

444 3. Luvoni GC, Morselli MG. Canine epididymal spermatozoa: A hidden treasure with great  
445 potential. *Reprod Domest Anim*. 2017 Apr;52 Suppl 2:197-201. doi: 10.1111/rda.12820. Epub 2016  
446 Oct 18. PMID: 27757988.

447 4. Goovaerts IG, Hoflack GG, Van Soom A, Dewulf J, Nichi M, de Kruif A, Bols PE. Evaluation of  
448 epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two  
449 caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*. 2006 Jul 15;66(2):323-30. doi:  
450 10.1016/j.theriogenology.2005.11.018. Epub 2006 Jan 4. PMID: 508 16387353.

451 5. Pucek Z, Belousova I, Krasieńska M, Krasieński Z, Olech W. European bison. Status Survey and  
452 Conservation Action Plan. Gland, Switzerland and Cambridge, UK IUCN/SSB Bison Specialist Group  
453 IUCN; 2004. p. 1–54.

454 6. Olech, W. and K. Perzanowski (eds.). 2022. European Bison ( ) Strategic Species Status Bison  
455 bonasus Review 2020. IUCN SSC Bison Specialist Group and European Bison Conservation Center . Pp:  
456 1-1 , Warsaw 38 Available at: <http://ebcc.wisent.org/science-papers/> Available at  
457 <https://www.iucn.org/commissions/ssc-groups/mammals/mammals-a-e/biso>

458 7. Duszewska AM, Baraniewicz-Kolek M, Wojdan J, Barłowska K, Bielecki W, Gręda P, Nizański  
459 W, Olech W. Establishment of a Wisent (Bison bonasus) Germplasm Bank. *Animals (Basel)*. 2022 May  
460 11;12(10):1239. doi: 10.3390/ani12101239. PMID: 35625085; PMCID:PMC9137628.

461 8. Eberhardt M, Prochowska S, Duszewska AM, Van Soom A, Olech W, Nizański W. The  
462 influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen  
463 wisent (Bison bonasus) epididymal spermatozoa. *BMC Vet Res*. 2022 Aug 10;18(1):305. doi:  
464 10.1186/s12917-022-03408-z. PMID: 35945588; PMCID: PMC9364487.

465 9. Kozdrowski R, Nizański W, Dubiel A, Olech W. Possibilities of using the European bison (Bison  
466 bonasus) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial  
467 insemination: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011 Mar 8;9:31. doi: 10.1186/1477-7827-9-31.  
468 PMID: 21385402; PMCID: PMC3059293.

- 469 10. Iolchiev B. S., Abilov A. I., Tadzhiyeva A. V., Bagirov V. A., Nasibov Sh. N., Shaidullin, I. N.,  
470 Klenovitskiy P. M., Kombarova N. A., Zhilinskii M. A., Biological integrity of bison epididymal sperm  
471 under cryoconservation and long storage. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*,  
472 2017, 52(2), 282-290. DOI:10.15389/agrobiol.2017.2.282eng
- 473 11. Oehninger S, Franken DR, Ombelet W. Sperm functional tests. *Fertil Steril*. 2014  
474 Dec;102(6):1528-33. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.044. Epub 2014 Oct 24. PMID: 25450304.
- 475 12. Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. Flow  
476 cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J*  
477 *Androl*. 2011 May;13(3):406-19. doi: 10.1038/aja.2011.15. Epub 2011 Apr 11. PMID: 21478895;  
478 PMCID: PMC3739346.
- 479 13. Zhang BR, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Influence of batches of bovine oocytes on the  
480 outcome of an intact zona pel-lucida binding assay and in vitro fertilization. *Int J Androl*. 1995  
481 Aug;18(4):213-20. doi: 10.1111/j.1365-2605.1995.tb00413.x. PMID: 7591195.
- 482 14. Ström Holst B, Larsson B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Evaluation of chilled and  
483 frozen-thawed canine sper-matozoa using a zona pellucida binding assay. *J Reprod Fertil*. 2000  
484 Jul;119(2):201-6. doi: 10.1530/jrf.0.1190201. PMID: 10864831.
- 485 15. Fazeli AR, Steenweg W, Bevers MM, de Loos FA, van den Broek J, Colenbrander B.  
486 Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet Rec*. 1993 Jan 2;132(1):14-  
487 6. doi: 10.1136/vr.132.1.14. PMID: 8438541.
- 488 16. Kadirvel G, Kathiravan P, Kumar S. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability  
489 of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa. *Theriogenology*. 2011  
490 Jun;75(9):1630-9. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.003. Epub 2011 Mar 31. PMID: 21458055.
- 491 17. Collins ED, Flowers WL, Shanks RD, Miller DJ. Porcine sperm zona binding ability as an  
492 indicator of fertility. *Anim Reprod Sci*. 2008 Feb 1;104(1):69-82. doi:  
493 10.1016/j.anireprosci.2007.01.012. Epub 2007 Jan 17. PMID: 17303353; PMCID: PMC2243185.
- 494 18. Roth TL, Weiss RB, Buff JL, Bush LM, Wildt DE, Bush M. Heterologous in vitro fertilization and  
495 sperm capacitation in an endangered African antelope, the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Biol*  
496 *Reprod*. 1998 Feb;58(2):475-82. doi: 10.1095/biolreprod58.2.475. PMID: 9475404.
- 497 19. Sánchez-Calabuig MJ, de la Fuente J, Laguna-Barraza R, Beltrán-Breña P, Martínez-Navado E,  
498 Johnston SD, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Gutiérrez JF. Heterologous murine and bovine IVF  
499 using bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa. *Theriogenology*. 2015 Oct 1;84(6):983-  
500 94. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.001. Epub 2015 Jun 12. PMID: 26149074.
- 501 20. Comizzoli P, Mauget R, Mermillod P. Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa by  
502 heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology*. 2001 Jul 15;56(2):261-74. doi:  
503 10.1016/s0093-691x(01)00561-1. PMID: 11480618.
- 504 21. Duszewska AM, Gręda P, Baraniewicz M, Bielecki W, Niżański W, Partyka A, Tracz M, Nowak  
505 Z, Chelmońska-Soyta A, Olech W. Obtaining Wisent early blastocyst in vitro is a basic for protection  
506 and creation of biodiversity for this threatened species. *Reprod Domest Anim*. 2018 Jun;53(3):818-  
507 821. doi: 10.1111/rda.13168. Epub 2018 Mar 14. PMID: 29542185.
- 508 22. Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction* pp 189–  
509 315 Eds E Knobil and J Neill. Raven Press, New York



- 510 23. Costa, M. Z., Oliveira, L. Z., Resende, M. V., Lucio, A. C., Perini, A. P., Miguel, M. C. V., & Lima,  
511 V. F. M. H. (2010). Induction of the acrosome reaction test to in vitro estimate embryo production in  
512 Nelore cattle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Vet-erinária e Zootecnia*, 62, 771-777.  
513 <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400001>.
- 514 24. Krishnakumar S, Whiteside DP, Elkin B, Thundathil JC. Evaluation of an animal protein-free  
515 semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*).  
516 *Theriogenology*. 2011 Jul 15;76(2):252-60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.001. Epub 2011  
517 May 7. PMID: 21550101.
- 518 25. Niżański W, Dubiel A, Bielas W, Dejneka G. Effects of three cryopreservation methods and  
519 two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*. 2001;57:365-  
520 9.
- 521 26. Wheeler, M.B. and Seidel, G.E., Jr. (1987), Zona pellucida penetration assay for capacitation  
522 of bovine sperm. *Gamete Res.*, 18: 237-250. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120180305>
- 523 27. Bavister, B. D., & Yanagimachi, R. (1977). The effects of sperm extracts and energy sources on  
524 the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 16(2),  
525 228-237.
- 526 28. Leibfried, M. L., & Bavister, B. D. (1981). The effects of taurine and hypotaurine on in vitro  
527 fertilization in the golden hamster. *Gamete research*, 4(1), 57-63.
- 528 29. Fazeli AR, Zhang BR, Steenweg W, Larsson B, Bevers MM, van den Broek J, Rodriguez-  
529 Martinez H, Colenbrander B. Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-  
530 day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 1997 Oct  
531 1;48(5):853-63. doi: 10.1016/s0093-691x(97)00310-5.
- 532 30. Feltz CJ, Miller GE. An asymptotic test for the equality of coefficients of variation from k  
533 populations. *Stat Med*. 1996 Mar 30;15(6):646-58. doi: 10.1002/(sici)1097-  
534 0258(19960330)15:6<647::aid-sim184>3.0.co;2-p. PMID: 8731006.
- 535

Maria Eberhardt  
imię i nazwisko  
Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
afiliacja

Wrocław, 10.09.2023  
miejsowość i data

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Eberhardt M., Colombo M., Prochowska S., Luvoni G.C., Olech W., Nizański W. The first report on the use of a zona pellucida binding assay to compare the effects of European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa cryopreservation in two different extenders. preprint na portalu bioRxiv mój udział polegał na : zebraniu materiału, udziale w projektowaniu oraz przeprowadzeniu opisanych badań, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu.

Potwierdzam treść oświadczenia.

10.09.23 Eberhardt Maria  
data i podpis

13.09.2023  
data i podpis promotora