

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ

Марина Николаевна Иващенко^{1,2}, кандидат биологических наук
 Анна Вячеславовна Дерюгина¹, доктор биологических наук
 Михаил Иванович Латушко³, кандидат технических наук
 Андрей Александрович Белов^{1,2}, кандидат биологических наук
 Павел Сергеевич Игнатьев³, кандидат физико-математических наук
 Роман Сергеевич Ковылин⁴, кандидат химических наук
 Алексей Иванович Ерзутов², аспирант

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

²ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный агротехнологический университет», г. Нижний Новгород, Россия

³Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод имени Э.С. Яламова», г. Екатеринбург, Россия

⁴ФГБУН «Институт металлоорганической химии имени Г.А. Разуваева РАН», г. Нижний Новгород, Россия

E-mail: kafedra2577@mail.ru

Аннотация. В статье представлены результаты исследований влияния молекулярного водорода на ультраструктуры сперматозоидов крупного рогатого скота при криоконсервации. Объект изучения – спермопродукция черно-пестрых голштинизированных быков. Сперму разбавляли стерильной средой BioXcell (Франция). Для изучения действия молекулярного водорода на сперматозоиды использовали BioXcell, разведенную водородной водой. Исследовали нативную сперму, разбавленную BioXcell, сперму после глубокой заморозки, а также сперму после глубокой заморозки, предварительно обработанную молекулярным водородом. После криоконсервации количество клеток с аномалией структуры головки увеличено, хроматин недостаточно конденсированный, повышено содержание сперматозоидов с измененным положением акросомы, изменена ультраструктура аксонемы, отмечена нерегулярная укладка митохондрий. Использование молекулярного водорода в качестве криопротектора способствовало росту числа сперматозоидов с интактными головками, имеющими нормальные акросомы, форму и хроматин ядра. Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии молекулярного водорода на морфологические показатели сперматозоидов крупного рогатого скота.

Ключевые слова: быки, молекулярный водород, сперматозоиды, криоконсервация, ультраструктура

THE EFFECTS OF CRYOPRESERVATION AND MOLECULAR HYDROGEN ON THE ULTRASTRUCTURE OF BULL SPERMATOZOA

M.N. Ivashchenko^{1,2}, PhD in Biological Sciences
 A.V. Deryugina¹, Grand PhD in Biological Sciences
 M.I. Latushko³, PhD in Engineering Sciences
 A.A. Belov^{1,2}, PhD in Biological Sciences
 P.S. Ignatiev³, PhD in Physical and Mathematical Sciences
 R.S. Kovylin⁴, PhD in Chemical Sciences
 A.I. Erzutov², PhD Student

¹National Research Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod, Russia

²Nizhny Novgorod State Agrotechnological University, Nizhny Novgorod, Russia

³Production Association «Ural Optical and Mechanical Plant named after E.S. Yalamov», Yekaterinburg, Russia

⁴Razuvaev G.A. Institute of Organometallic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, Russia

E-mail: kafedra2577@mail.ru

Abstract. The effect of molecular hydrogen during cryopreservation on the ultrastructures of bovine sperm cells has been studied. The study was performed on the sperm production of black-and-white Holstein bulls. The sperm was diluted with a sterile BioXcell medium (France). To study the effect of molecular hydrogen on the sperm cells of bulls, «BioXcell» diluted with hydrogen water was used. Native sperm diluted with the «BioXcell» diluent, sperm after deep freezing and sperm after deep freezing, pretreated with molecular hydrogen, were studied. The study of morphological parameters of spermatozoa after cryopreservation showed an increase in cells with an anomaly in the structure of the head, chromatin is insufficiently condensed, the content of spermatozoa with an altered position of the acrosome is increased, the ultrastructure of the axoneme is changed, irregular laying of mitochondria is noted. The use of molecular hydrogen as a cryoprotector contributed to an increase in the number of spermatozoa with intact heads having normal acrosomes, shape and chromatin of the nucleus. The results obtained indicate a positive effect of molecular hydrogen on morphological parameters of bovine sperm cells.

Keywords: bulls, molecular hydrogen, spermatozoa, cryopreservation, ultrastructure

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00205 / The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-26-00205.

Интенсивное использование высокоценных быков-производителей в молочном скотоводстве – важное условие улучшения продуктивности. [4]

Основной метод для сохранения генетического разнообразия и технологии повышения репродуктивного статуса – метод криоконсервации спермы, позволяющий создавать банки спермы, в течение долгого времени сохранять генетический материал для селекции и транспортировать его на большие расстояния. [1]

Главная проблема при криоконсервации спермы – ее качество после оттаивания. В процессе замораживания-оттаивания примерно 50% сперматозоидов погибает. [11]

Глубокое замораживание отрицательно влияет на структуру мембран сперматозоидов, нарушается метаболизм, осмотический баланс клеток, активируются свободнорадикальные процессы. Избыточная выработка активных форм кислорода изменяет физико-химические свойства сперматозоидов, повреждает их ДНК, что приводит к снижению фертильности. Эндогенных антиоксидантов, присутствующих в сперматозоидах крупного рогатого скота, недостаточно для обеспечения целостности клеток после окислительного стресса при криоконсервации. Для повышения жизнеспособности сперматозоидов после размораживания необходимы добавки антиоксидантов. [14]

Молекулярный водород – антиоксидант с широким спектром действия. Он избирательно нейтрализует агрессивные высокотоксичные OH и ONOO– и не нарушает функционирование сигнальных активных форм кислорода. Это выделяет молекулярный водород из общего количества антиоксидантов, которые не обладают таким действием в отношении свободных радикалов. Таким образом, молекулярный водород может уменьшать окислительный стресс и корректировать окислительно-восстановительный статус клеток. [5, 6, 12]

Обычно сперму изучают с помощью световой микроскопии, что не позволяет выявить значительную часть ультраструктурных повреждений в сперматозоидах. Наиболее точный метод ультраструктурного анализа для оценки функционального состояния сперматозоидов – метод электронной микроскопии. [10, 13]

Совершенствование протоколов криоконсервации спермы помогло бы преодолеть множество проблем, связанных со снижением качества размороженной спермы. [2]

Цель работы – оценка влияния молекулярного водорода на функциональный статус сперматозоидов быков после криоконсервации с помощью электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили *in vitro* в лаборатории ООО «Нижегородское» по племенной работе, Кстовского муниципального района Нижегородской области.

Объект изучения – спермопродукция *черно-пестрых голштинизированных* быков. Были взяты эякуляты трехлетних быков. Использовали свежеполученное семя с подвижностью сперматозоидов более 7 баллов и минимальным количеством аномальных форм клеток. [3]

Сперму разбавляли стерильной средой BioXcell (Франция). Влияние молекулярного водорода на сперматозоиды изучали путем разведения стерильной среды BioXcell водородной водой. Затем проводили итоговое

разбавление, фасовку и эквilibрацию (экспозиция при 4°C в течение 3...4 ч). Замораживали в открытых гранулах. Доза одной открытой гранулы соответствует ГОСТ 26030-2015 и равна 0,2 мл. Сперматозоиды замораживали в течение 7,5 мин. до минус 145°C, затем контейнер с образцами помещали в жидкий азот (минус 196°C).

Эякулят фиксировали раствором глутарового альдегида (2,5%) и осмиевой кислотой (1%), заливали в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Reichert III и просматривали в микроскопе Hitachi SU8220 (Япония).

При электронно-микроскопическом исследовании сперматозоидов анализировали процентное содержание интактных головок, форму ядра, состояние хроматина, положение акросомы, морфологию аксонемы жгутика, ультраструктуру митохондрий.

Для насыщения воды молекулярным водородом использовали герметический бокс, в котором давление водорода повышали до 4 атм. в течение нескольких часов. Затем пакет выдерживали при атмосферном давлении в замкнутом объеме для того, чтобы избежать выделения водорода в виде микропузырьков и его обратной диффузии через стенки пакета. Концентрация молекулярного водорода в растворе находилась в пределах 1,2...1,5 мг/л.

Исследовали нативную сперму, разбавленную BioXcell (группа I), сперму после глубокой заморозки (II), а также сперму после глубокой заморозки, предварительно обработанную молекулярным водородом (III).

Полученные данные анализировали с помощью программы Microsoft Excel. Обработку результатов проводили по параметрическому t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электронно-микроскопическое исследование нативных сперматозоидов показало, что клетки имели гладкую овальную конфигурацию с выраженной акросомой, занимающей 2/3 передней поверхности головки (см. таблицу). Содержимое акросомы – компактное. Отмечено отсутствие цитоплазматических капелек, дефектов шейки, хвоста. Митохондрии сферической или нитевидной формы. Хроматин представлял собой гомогенную гиалиноподобную массу.

После криоконсервации наблюдали рост числа клеток с аномалией структуры головки, увеличение количества сперматозоидов с цитоплазматическими капельками. Хроматин был недостаточно конденсированный, содержал фибриллы. Известно, что незрелый хроматин менее устойчив к денатурации. [9] Было повышено содержание сперматозоидов с измененным положением акросомы, у 8,43% клеток отмечена деградация акросомы, в результате преждевременно произошедшей акросомной реакции, у 18,64% сперматозоидов изменена ее форма. Эти изменения ассоциированы с нарушением подвижности. Для осуществления пенетрации сперматозоидом оболочек ооцита необходима интактная акросома, поэтому сведения об ультраструктуре головки и акросомы, а также способы коррекции возникших нарушений, играют важную роль в прогнозировании успешного оплодотворения. [8] Показано, что преждевременная акросомная реакция

Влияние криоконсервации и молекулярного водорода на ультраструктуру сперматозоидов быков

Морфологический признак	Нативные сперматозоиды (группа I)	Сперматозоиды после криоконсервации (группа II)	Сперматозоиды после воздействия молекулярным водородом и криоконсервации (группа III)
Интактная головка	78,85 ± 4,67	58,57 ± 6,18 *	69,85 ± 5,61 ^Δ
Нормальная форма ядра	95,57 ± 2,29	94,85 ± 2,67	94,57 ± 2,63
Нормальное состояние хроматина	94,74 ± 4,06	85,21 ± 4,39 *	90,53 ± 4,27
Нормальная форма митохондрий	95,63 ± 3,17	76,43 ± 4,23 *	84,53 ± 3,43* ^Δ
Нормальное строение аксонемы	85,36 ± 5,24	73,42 ± 4,31 *	80,22 ± 5,65
Присутствие акросомы	99,57 ± 4,53	89,57 ± 5,13 *	94,23 ± 4,48
Нормальное положение акросомы	97,32 ± 3,41	91,24 ± 2,39 *	94,54 ± 3,25
Нормальная форма акросомы	90,24 ± 2,24	81,36 ± 2,19 *	86,44 ± 3,12
Компактное содержимое акросомы	85,33 ± 3,37	74,32 ± 3,37	75,44 ± 3,23

Примечание. среднее ± SEM, * – статистически значимые различия по отношению к группе I, p ≤ 0,05; ^Δ – статистически значимые различия между группами после криоконсервации (группа II и III), p ≤ 0,05.

сперматозоида происходит при повышенном содержании в клетках активных форм кислорода. [7]

Жгутик обеспечивает подвижность сперматозоидов, морфологическая основа активности жгутиков – аксонема. Митохондрии расположены по спирали вокруг аксонемы и передают сперматозоидам энергию. При анализе структуры жгутиков после криоконсервации отмечено, что морфологические изменения затрагивают ультраструктуру аксонемы (нерегулярная укладка митохондрий). Воздействие криоконсервации на ядро сперматозоидов было минимальным.

Добавление молекулярного водорода в среду для разбавления спермы и последующая заморозка не оказали значительного влияния на морфологию клеток после оттаивания. Использование молекулярного водорода в качестве криопротектора способствовало увеличению количества сперматозоидов с интактными головками, имеющими нормальные акросомы, форму и хроматин ядра.

Положительное влияние молекулярного водорода на морфологические признаки сперматозоидов возможно обусловлено его антиоксидантным действием. [8, 10, 11] Известно, что в процессе криоконсервации в сперматозоидах происходит накопление активных форм кислорода, что приводит к повреждению ДНК, белков, липидов, изменению морфологии клетки. [4, 5] Сперматозоиды особенно восприимчивы к повреждению, вызванному окислительным стрессом, поскольку их плазматические мембраны содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот, а цитоплазма – низкие концентрации антиоксидантов. [15]

Таким образом, молекулярный водород можно использовать при криоконсервации спермы, чтобы избежать или минимизировать повреждение сперматозоидов и сохранить целостность спермы. Необходимы дальнейшие исследования в этой области.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Атрошенко М.М., Калашников В.В., Брагина Е.Е., Зайцев А.М. Сравнительное изучение ультраструктуры сперматозоидов в эпидидимальной, эякулированной и криоконсервированной сперме жеребцов // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52, № 2. С. 274–281. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.2.274rus
- Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Лодяной М.С. Оценка резистентности мембран сперматозоидов быков в про-

цессе долгосрочного хранения // Естественные и технические науки. 2022. Т. 1 (164). С. 107–109.

- Национальная технология замораживания и использования спермы племенных быков-производителей / под ред. А.И. Абилова, Н.М. Решетниковой. М.: 2008. 160 с.
- Никиткина Е.В., Шапиев И.Ш. Использование спермы быков с низкой концентрацией и активностью сперматозоидов для криоконсервации // Достижения науки и техники АПК 2010. № 7. С. 49–51.
- Рахманин Ю.А., Егорова Н.А., Михайлова Р.И. Молекулярный водород: биологическое действие, возможности применения в здравоохранении (обзор) // Гигиена и санитария. 2019. Т. 98. № 4. С. 359–365.
- Artamonov M.Y., Martusevich A.K., Pyatakovich F.A. et al. Molecular Hydrogen: From Molecular Effects to Stem Cells Management and Tissue Regeneration // Antioxidants. 2023. Vol. 12. № 3. P. 636. <https://doi.org/10.3390/antiox12030636>.
- Coetzee K., Ozgur K., Berkkanoglu M. et al. Reliable single sperm cryopreservation in Cell Sleepers for azoospermia management // Andrologia. 2016. № 48. P. 203–210. DOI: 10.1111/and.12434.
- Endo Y., Fujii Y., Shintani K. et al. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa // Reprod Biomed Online. 2012. № 24. P. 301–307. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.11.016.
- Evenson D., Darzynkiewicz Z., Melamed M. Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility // Science. 1980. № 210. P. 1131–1133.
- Moretti E., Suter G., Collodel G. The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research // Syst Biol Reprod Med. 2016. № 62. P. 171–83. DOI: 10.3109/19396368.2016.1155242.
- Nijs M., Creemers E., Cox A. et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa // Reprod Biomed Online. 2009. № 19. P. 202–206. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)60073-9.
- Ohta S. Molecular hydrogen as a novel antioxidant: Overview of the advantages of hydrogen for medical applications // Methods in Enzymology. 2015. Vol. 555. P. 289–317.
- Ozkavukcu S., Erdemli E., Isik A. et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa // J Assist Reprod Genet. 2008. Vol. 25. P. 403–411. DOI: 10.1007/s10815-008-9232-3.
- Said T.M., Gaglani A., Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury // Reprod Biomed Online. 2010. Vol. 21. P. 456–462. DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.05.011.

15. Saleh R., Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice // J Androl. 2002. Vol. 23. P. 737–752.

REFERENCES

1. Atroshchenko M.M., Kalashnikov V.V., Bragina E.E., Zajcev A.M. Sravnitel'noe izuchenie ul'trastruktury spermatozoidov v epididimal'noj, eyakulirovannoj i kriokonservirovannoj sperme zhrebцов // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2017. T. 52, № 2. S. 274–281. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.2.274rus
2. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Lodyanov M.S. Ocenka rezistentnosti membran spermatozoidov bykov v processe dolgo-rochnogo hraneniya // Estestvennye i tekhnicheskie nauki. 2022. T. 1 (164). S. 107–109.
3. Nacional'naya tekhnologiya zamorazhivaniya i ispol'zovaniya spermy plemennyh bykov-proizvoditelej / pod red. A.I. Abilova, N.M. Reshetnikovoj. M.: 2008. 160 s.
4. Nikitkina E.V., Shapiev I.Sh. Ispol'zovanie spermy bykov s nizkoj koncentraciej i aktivnost'yu spermatozoidov dlya kriokonservacii // Dostizheniya nauki i tekhniki APK 2010. № 7. S. 49–51.
5. Rahmanin Yu.A., Egorova N.A., Mihajlova R.I. Molekulyarnyj vodorod: biologicheskoe dejstvie, vozmozhnosti primeneniya v zdavoohranenii (obzor) // Gigiena i sanitariya. 2019. T. 98. № 4. S. 359–365.
6. Artamonov M.Y., Martusevich A.K., Pyatakovich F.A. et al. Molecular Hydrogen: From Molecular Effects to Stem Cells Management and Tissue Regeneration // Antioxidants. 2023. Vol. 12. № 3. P. 636. <https://doi.org/10.3390/antiox12030636>.
7. Coetzee K., Ozgur K., Berkkanoglu M. et al. Reliable single sperm cryopreservation in Cell Sleepers for azoospermia man-

- agement // Andrologia. 2016. № 48. P. 203–210. DOI: 10.1111/and.12434.
8. Endo Y., Fujii Y., Shintani K. et al. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa // Reprod Biomed Online. 2012. № 24. P. 301–307. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.11.016.
9. Evenson D., Darzynkiewicz Z., Melamed M. Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility // Science. 1980. № 210. P. 1131–1133.
10. Moretti E., Suter G., Collodel G. The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research // Syst Biol Reprod Med. 2016. № 62. P. 171–83. DOI: 10.3109/19396368.2016.1155242.
11. Nijs M., Creemers E., Cox A. et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa // Reprod Biomed Online. 2009. № 19. P. 202–206. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60073-9.
12. Ohta S. Molecular hydrogen as a novel antioxidant: Overview of the advantages of hydrogen for medical applications // Methods in Enzymology. 2015. Vol. 555. P. 289–317.
13. Ozkavukcu S., Erdemli E., Isik A. et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa // J Assist Reprod Genet. 2008. Vol. 25. P. 403–411. doi: 10.1007/s10815-008-9232-3.
14. Said T.M., Gaglani A., Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury // Reprod Biomed Online. 2010. Vol. 21. P. 456–462. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.05.011.
15. Saleh R., Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice // J Androl. 2002. Vol. 23. P. 737–752.

*Поступила в редакцию 07.12.2023
Принята к публикации 21.12.2023*