

КОРРЕКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВОДОРОДОМ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ И СТРУКТУРНЫХ НАРУШЕНИЙ В СПЕРМАТОЗОИДАХ БЫКОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ*

Марина Николаевна Иващенко^{1,2}, кандидат биологических наук

Анна Вячеславовна Дерюгина¹, доктор биологических наук

Андрей Александрович Белов^{1,2}, кандидат биологических наук

Михаил Иванович Латушко³, кандидат технических наук

Павел Сергеевич Игнатъев³, кандидат физико-математических наук

Алексей Иванович Ерзутов², аспирант

Михаил Сергеевич Лодяной², кандидат биологических наук

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

E-mail: kafedra2577@mail.ru

Аннотация. Исследовано влияние молекулярного водорода на фертильные показатели и энергетический метаболизм сперматозоидов черно-пестрых голштинизированных быков. Изучили нативную сперму и сперму после глубокой заморозки, разбавленную BioXcell и BioXcell с молекулярным водородом. Добавление молекулярного водорода в среду для разбавления спермы и последующая заморозка изменяли функциональный статус клеток после размораживания, увеличилась подвижность сперматозоидов, количество быстрых сперматозоидов, снизилось число медленных клеток относительно анализируемых показателей сперматозоидов после криоконсервации, не подвергшихся воздействию молекулярного водорода. После оттаивания подвижность сперматозоидов возросла на 12%, средняя скорость движения – 9%, содержание АТФ – в два раза. Результаты эксперимента показали, что добавление молекулярного водорода в состав разбавителя спермы улучшает биологические показатели качества спермы быков, ее фертильность, повышает энергетический метаболизм сперматозоидов.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, молекулярный водород, сперматозоиды, криоконсервация, подвижность, АТФ

CORRECTION OF METABOLIC AND STRUCTURAL DISORDERS IN BULL SPERMATOZOIDS DURING CRYOPRESERVATION USING MOLECULAR HYDROGEN

M.N. Ivashchenko^{1,2}, PhD in Biological Sciences

A.V. Deryugina¹, Grand PhD in Biological Sciences

A.A. Belov^{1,2}, PhD in Biological Sciences

M.I. Latushko³, PhD in Engineering Sciences

P.S. Ignatiev³, PhD in Physical and Mathematical Sciences

A.I. Erzutov³, PhD Student

M.S. Lodyanoy¹, PhD in Biological Sciences

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. Yalakov”, Yekaterinburg, Russia

E-mail: kafedra2577@mail.ru

Abstract. The influence of molecular hydrogen on the fertility parameters and energy metabolism of spermatozooids of black-and-white Holstein bulls was studied. Sperm was diluted with sterile BioXcell medium (France), diluted in hydrogen water. We studied native sperm diluted with BioXcell and BioXcell with molecular hydrogen, as well as after deep freezing with and without pre-treatment with molecular hydrogen. The addition of molecular hydrogen to the medium for diluting sperm and subsequent freezing changed the functional status of cells after thawing, leading to an increase in their motility, an increase in the number of motile and fast sperm, and a decrease in the number of slow cells relative to the analyzed indicators of regenerative cells after cryopreservation that were not exposed to molecular hydrogen. Sperm motility after thawing was 12% higher ($p \leq 0.05$), the average movement speed was 9% ($p \leq 0.05$), and the ATP content was two times higher than in sperm samples not treated with molecular hydrogen. The results of the experiment showed that the addition of molecular hydrogen to the semen extender improves the biological indicators of the quality of bull sperm, its fertility, and increases the energy metabolism of spermatozooids.

Keywords: cattle, molecular hydrogen, spermatozoa, cryopreservation, mobility, ATP

* 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.

Уровень воспроизводства в животноводстве определяется количественными и качественными показателями спермы быков. [3, 4] Большое теоретическое и практическое значение имеет изучение ее способности к криоконсервации.

Многочисленными исследованиями установлено, что процесс замораживания вызывает неблагоприятные изменения в половых клетках, их повреждение или полную гибель. [2] Технология сохранения гамет позволяет получить примерно 50% живых сперматозоидов после оттаивания. [17]

Причина гибели спермиев при криоконсервации — затвердевание воды, которой в сперме содержится примерно 90%. Образовавшие кристаллы льда разрушают структуру протоплазмы и ядра сперматозоидов. При охлаждении лед появляется изначально в жидкой фазе спермы, в результате растворенные в ней сахара и соли образуют гипертонические растворы, под действием которых сперматозоиды обезвоживаются. [8, 17]

Совершенствование протоколов криоконсервации спермы помогло бы решить множество проблем, связанных со снижением ее качества после оттаивания. [12, 13]

Молекулярный водород относится к группе соединений, тормозящих на клеточном уровне свободнорадикальные процессы, повышающих активность антиоксидантной системы, усиливающих метаболизм, восстанавливающих структуру клеточных мембран. Он может положительно повлиять на морфологические и функциональные показатели сперматозоидов. [9, 10]

Решающее значение для определения оптимальной функции спермы имеет прогрессивная подвижность сперматозоидов. [15, 16] Для ее поддержания на необходимом для оплодотворения уровне требуются затраты АТФ. [11, 14]

Цель работы — изучить влияние молекулярного водорода на функциональный статус нативных и деконсервированных сперматозоидов быков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ООО «Нижегородское» (Кстовский муниципальный район Нижегородской области) исследовали *in vitro* сперму *черно-пестрых голшти-низированных* быков. Сбор проводили у животных в возрасте трех лет в соответствии с национальной технологией замораживания и использования спермы племенных быков-производителей. Взято около 150 эякулятов с подвижностью сперматозоидов более 7 баллов и минимальным количеством аномальных форм клеток.

Сперму разбавляли стерильной средой BioXcell (Франция). Для изучения влияния молекулярного водорода на сперматозоиды быков BioXcell разводили водородной водой. Затем осуществляли итоговое разбавление, фасовку и эквilibрацию (экспозиция при 4°C в течение трех-четырех часов). Сперматозоиды замораживали в открытых гранулах по 0,2 мл (ГОСТ 26030-2015) в течение 7,5 мин. до температуры минус 145°C, затем контейнер с образцами помещали в жидкий азот (минус 196°C).

После окончания семидневного карантина семя размораживали по стандартной технологии.

Освобождали сперматозоиды от семенной плазмы отмывая ее физиологическим раствором, дважды центрифугируя по 10 мин. при 400g, надосадочную жидкость сливали. Осадок суспендировали в 1 мл физиологического раствора. Лизис сперматозоидов проводили трехкратным замораживанием/оттаиванием. Затем образцы центрифугировали 5 мин. при 2500g.

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

Исследовали нативную сперму, разбавленную BioXcell (группа I), нативную разбавленную BioXcell с молекулярным водородом (II), сперму после криоконсервации (III) и после глубокой заморозки, предварительно обработанную молекулярным водородом (IV).

Определяли качественные показатели фертильности сперматозоидов на спермоанализаторе SA-500 «Биола» (Россия) и содержание в них АТФ методом И.Л. Виноградовой с соавторами. [1]

Полученные данные обрабатывали в программе Microsoft Excel. Результаты анализировали по параметрическому t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нативные эякуляты имели 82,51±5,95% подвижных сперматозоидов. После криоконсервации 71,15±4,34% из них были протестированы как подвижные (см. таблицу).

Приведенные в таблице экспериментальные данные показывают, что в нативной сперме количество подвижных сперматозоидов составило в среднем 35,76±6,17 млн/доза, быстрых — 65,54±7,14 и медленных — 45,37±4,17, после криоконсервации подвижных сперматозоидов было в среднем 27,35±5,16, быстрых — 51,77±6,13 и медленных — 46,38±4,44 млн/доза.

Скорость движения сперматозоидов — один из наиболее информативных показателей качества спермы. Исследования ученых на замороженно-оттаянной сперме крупного рогатого скота подтверждают, что значительную связь с оплодотворяющей способностью имеет не подвижность сперматозоидов, а скорость их движения. [5] В ходе проведенных экспериментов произошло снижение скорости движения сперматозоидов после замораживания с 85,62±3,54 до 74,53±2,48 мкм/сек ($p \leq 0,05$).

Известно, что концентрация АТФ в сперматозоидах положительно коррелирует с оплодотворяющей способностью. [6, 14] Согласно полученным данным, в оттаявших сперматозоидах концентрация АТФ ниже, чем в нативных. До замораживания содержание АТФ в сперматозоидах — 0,79±0,09 мкмоль/л, после оттаивания — 0,28±0,05 мкмоль/л.

По результатам исследований установлено, что при глубоком замораживании спермы быков *черно-пестрой* породы в сперматозоидах наблюдаются из-

Влияние молекулярного водорода на показатели фертильности и внутриклеточное содержание АТФ в сперматозоидах быков, М±т

Критерий фертильности сперматозоидов	Нативные разбавленные сперматозоиды		Сперматозоиды после	
	группа I	после воздействия молекулярным водородом (группа II)	криоконсервации (группа III)	воздействия молекулярным водородом и криоконсервации (группа IV)
Подвижность, %	82,51±5,95	79,81±5,55	71,15±4,34*	79,62±3,60* ^Δ
Количество подвижных, млн/доза	35,76±6,17	36,67±6,12	27,35±5,16*	33,71±6,03* ^Δ
Количество быстрых, млн/доза	65,54±7,14	66,32±6,72	51,77±6,13*	58,98±6,55* ^Δ
Количество медленных, млн/доза	45,37±4,17	43,27±4,45	46,38±4,44	41±3,96 ^Δ
Средняя скорость движения, мкм/сек.	85,62±3,54	83,27±4,47	74,53±2,48*	81,56±3,52* ^Δ
Содержание АТФ, мкмоль/л	0,79±0,09	0,75±0,12	0,28±0,05*	0,47±0,04* ^Δ

Примечание. среднее ± SEM, «*» – статистически значимые различия по отношению к группе I, p<0,05; «Δ» – статистически значимые различия между группами после криоконсервации (группы III и IV), p<0,05.

менения фертильных показателей и биохимических процессов, связанных с генерацией энергии.

Добавление молекулярного водорода в среду для разбавления спермы и последующая заморозка изменяло функциональный статус клеток после размораживания, приводило к увеличению их подвижности, повышению количества подвижных и быстрых сперматозоидов, снижению числа медленных клеток относительно анализируемых показателей регенеративных клеток после криоконсервации, не подвергшихся воздействию молекулярного водорода. Подвижность сперматозоидов после оттаивания была выше на 12%, средняя скорость движения – 9%, содержание АТФ – в два раза, чем в образцах спермы, не обработанных молекулярным водородом.

Результаты экспериментов показали, что добавление молекулярного водорода в состав разбавителя спермы улучшает биологические показатели качества спермы быков, ее фертильность, повышает энергетический метаболизм сперматозоидов.

Положительное влияние молекулярного водорода на метаболические и структурные показатели сперматозоидов возможно обусловлено антиоксидантными свойствами молекулярного водорода. [7, 9, 10] Известно, что в процессе криоконсервации в сперматозоидах происходит накопление супероксидных радикалов, что приводит к повреждению ДНК, белков, липидов, развитию окислительного стресса. [4, 5]

На основании проведенной работы можно заключить, что добавление молекулярного водорода в среду для замораживания спермы быков повышает биологическую полноценность сперматозоидов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Виноградова И.Л. Метод одновременного определения 2,3 ДФГ и АТФ в эритроцитах // Лабораторное дело. 1980. № 7. С. 424–426.
2. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Лодяной М.С. Оценка резистентности мембран сперматозоидов быков в процессе долгосрочного хранения // Естественные и технические науки. 2022. Т. 1 (164). С. 107–109.
3. Добсон Х., Уокер С.Л., Моррис М.Дж. и др. Почему становится все труднее успешно искусственно осеменять молочных коров? // Animal. 2008. Т. 2. С. 1104–11. DOI: 10.1017/S175173110800236X

4. Желтиков А.И., Коновалова Т.В., Себежко О.И. и др. Качество спермы быков красных пород ОАО племпредприятие «Барнаульское» и устойчивость ее к криоконсервации // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. 2021. Т. 1. С. 92–100. <https://doi.org/10.31677/2072-6724-2021-58-1-92-100>
5. Ляшенко А.А. Биологические показатели спермы быков в зависимости от срока хранения в жидком азоте // Зоотехническая наука Беларуси. 2015. Т. 50. № 1. С. 126–134.
6. Мохаммадзаде С., Максудов Г.Ю., Фрунджян В.Г. и др. Функциональные изменения сперматозоидов мыши при сохранении in vitro // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2008. № 2. С. 7–10.
7. Накао А. Эффективность воды, богатой водородом, на антиоксидантный статус субъектов с потенциальным метаболическим синдромом – открытое пилотное исследование // J Clin Biochem Nutr. 2010. № 46. С. 140–149.
8. Национальная технология замораживания и использования спермы племенных быков-производителей / под ред. А.И. Абилова, Н.М. Решетниковой. М.: 2008. 160 с.
9. 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.
10. Artamonov M.Yu., 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. PP. 636. <https://doi.org/10.3390/antiox12030636>.
11. Aziz N., Said T., Paasch U., Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. Hum Reprod. 2007. Vol. 22. PP. 1413–1419.
12. Forero-Gonzalez R.A., Celeghini E.C.C., Raphael C.F. et al. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes// Andrology. 2012. № 44. PP. 154–159.
13. Kadirvel G., Kathiravan P., Kumar S. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa// Theriogenology. 2011. Vol. 75. № 9. PP. 1630–1639.
14. Rodriguez-Miranda E., Buffone M., Edwards S. et al. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate Alters Motility and

- Improves the Fertilizing Capability of Mouse Sperm. *Biol Reprod.* 2008. Vol. 79. PP. 164–171.
15. Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise // *Acta Veterinaria Brno.* 2013. Vol. 82. № 1. PP. 31–35.
 16. Storey B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe // *International Journal of Developmental Biology.* 2008. Vol. 52. № 5–6. PP. 427–437.
 17. Talukdar D.J. Cryocapacitation and fertility of cryopreserved semen // *Int. J. Livestock Res.* 2015. Vol. 5. PP. 11–18.
- REFERENCES**
1. Vinogradova I.L. Metod odnovenennogo opredeleniya 2,3 DFG i ATF v eritrocitah // *Laboratornoe delo.* 1980. № 7. S. 424–426.
 2. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Lodyanov M.S. Ocenka rezistentnosti membran spermatozoidov bykov v processe dolgosrochnogo hraneniya // *Estestvennye i tekhnicheskie nauki.* 2022. T. 1 (164). S. 107–109.
 3. Dobson H., Uoker S.L., Morris M.Dzh. i dr. Pochemu stanovitsya vse trudnee uspesjno iskusstvenno osemenyat' molochnyh korov? // *Animal.* 2008. T. 2. S. 1104–11. DOI: 10.1017/S175173110800236X
 4. Zheltikov A.I., Konovalova T.V., Sebezhenko O.I. i dr. Kachestvo spermy bykov krasnyh porod OAO plempredpriyatie «Barnaul'skoe» i ustojchivost' ee k kriokonservacii // *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* 2021. T. 1. S. 92–100. <https://doi.org/10.31677/2072-6724-2021-58-1-92-100>
 5. Lyashenko A.A. Biologicheskie pokazateli spermy bykov v zavisimosti ot sroka hraneniya v zhidkom azote // *Zootekhnicheskaya nauka Belarusi.* 2015. T. 50. № 1. S. 126–134.
 6. Mohammadzade S., Maksudov G.Yu., Frundzhyan V.G. i dr. Funkcional'nye izmeneniya spermatozoidov myshi pri sohraneni in vitro // *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya.* 2008. № 2. S. 7–10.
 7. Nakao A. Effektivnost' vody, bogatoj vodorodom, na antioksidantnyj status sub"ektov s potencial'nyim metabolicheskim sindromom – otkrytoe pilotnoe issledovanie // *J Clin Biochem Nutr.* 2010. № 46. S. 140–149.
 8. Nacional'naya tekhnologiya zamorazhivaniya i ispol'zovaniya spermy plemennyh bykov-proizvoditelej / pod red. A.I. Abilova, N.M. Reshetnikovoj. M.: 2008. 160 s.
 9. 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.
 10. Artamonov M.Yu., 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. PP. 636. <https://doi.org/10.3390/antiox12030636>.
 11. Aziz N., Said T., Paasch U., Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod.* 2007. Vol. 22. PP. 1413–1419.
 12. Forero-Gonzalez R.A., Celeghini E.C.C., Raphael C.F. et al. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes // *Andrology.* 2012. № 44. PP. 154–159.
 13. Kadirvel G., Kathiravan P., Kumar S. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa // *Theriogenology.* 2011. Vol. 75. № 9. PP. 1630–1639.
 14. Rodriguez-Miranda E., Buffone M., Edwards S. et al. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate Alters Motility and Improves the Fertilizing Capability of Mouse Sperm. *Biol Reprod.* 2008. Vol. 79. PP. 164–171.
 15. Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise // *Acta Veterinaria Brno.* 2013. Vol. 82. № 1. PP. 31–35.
 16. Storey B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe // *International Journal of Developmental Biology.* 2008. Vol. 52. № 5–6. PP. 427–437.
 17. Talukdar D.J. Cryocapacitation and fertility of cryopreserved semen // *Int. J. Livestock Res.* 2015. Vol. 5. PP. 11–18.

*Поступила в редакцию 08.11.2023
Принята к публикации 22.11.2023*