

УДК:602.9:636.39.082.453.52

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.421

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И КОСТНОГО МОЗГА КОЗЛОВ НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИХ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Корочкина Е.А.^{1*} – канд. ветеринар. наук, доц. кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID 0000-0002-7011-4594); Трифонова А.В.² – канд. биол. наук, директор по науке; Финагеев Е.Ю.¹ – канд. ветеринар. наук, асс. кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий; Главацкая Д.Е.¹ – студ.; Пушкина В. С.¹ – студ.

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

² ООО «ЦитоГенТест»

*e.kora@mail.ru

Ключевые слова: сперма, козлы-производители, качественные показатели, мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани и костного мозга

Keywords: sperm, breedinggoats, cryopreservationprotocol, artificialinsemination

Финансирование: РНФ № 23-26-00157 «Влияние МСК из жировой ткани и костного мозга мелких жвачных животных на качественные показатели их сперматозоидов до и после криоконсервации» (соглашение № 23-26-00157 от 13.01.2023).

Поступила: 15.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ

Целью настоящих исследований является изучение влияния мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов на качественные показатели их сперматозоидов. Была проведена комплексная оценка качества спермы (объем, концентрация, морфология, подвижность) козлов (n=10) зааненской и чешской породы в возрасте 1-2,5 лет по общепринятым методикам и протоколам. Жировую ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ) получали после убоя козлов (n=3) в крестьянско-фермерском хозяйстве Волховского района Ленинградской области. После обработки полученных проб проводили выделение, накопление и криоконсервацию мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани и костного мозга козлов. Было сформировано три группы проб по 10 в каждой: контрольная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + буфер PBS 100 мкл, pH – 7,4), первая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + МСК ЖТ 2×10^8 кл/мл, pH – 7,2), вторая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + МСК КМ 2×10^8 кл/мл, pH – 7,2) и проведена четырех-этапная оценка качества спермы: после инкубации спермы с мезенхимальными стволовыми клетками при температуре 38°C 0, 1, 2 и 3 часа. Исходя из полученных результатов, рабочим протоколом использования мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга для спермы козлов-производителей является концентрация МСК – 2×10^8 кл/мл и концентрация сперматозоидов козлов – 7×10^{10} кл/мл. Проведенными исследованиями установлено положительное влияние мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов на качественные показатели их сперматозои-

дов. При этом сперматозоиды в течение трехчасовой инкубации сохраняют жизнеспособность с прогрессивностью движений равной $51,5 \pm 8,46 - 51,8 \pm 5,2\%$ и количеством морфологически нормальных сперматозоидов, равным $50,40 \pm 2,21 - 51,10 \pm 3,14\%$ (3 часа после инкубации, МСК из жировой ткани и костного мозга соответственно).

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Козоводство, как одна из традиционных отраслей животноводства, получила широкое распространение по всей территории России. Козы неприхотливы в уходе и способны адаптироваться в различных природно-климатических условиях. К ряду биологических преимуществ коз также относят скороспелость и многоплодность, они универсальны в своей продуктивности и позволяют получить ценное сырье — шерсть, а также молоко, мясо и шкуры. Еще в 1967 году Совет министров СССР выпустил постановление в поддержку отечественного козоводства, однако, активно развивающееся на тот момент овцеводство заняло лидирующие позиции в мясном и шерстном сегменте рынка. В настоящее время козоводство является перспективным и активно развивающимся направлением молочного животноводства, имеющим достаточно высокий спрос на рынке. В связи с интенсификацией козоводства в стране появляется необходимость в рационализации всех производственных процессов и увеличении эффективности воспроизводства поголовья. На сегодняшний день в России не создан стойкий отечественный генофонд ценных козлов-производителей, позволяющих передавать свои качества потомству. Ввиду этого встает вопрос о наиболее эффективном использовании генетического материала имеющихся в стране высокоценных производителей. Введение в практику метода искусственного осеменения позволяет значительно увеличить темп селекционно-племенной работы, уменьшает нагрузку на ценных козлов-производителей, снижает риски возникновения болезней, передающихся половым путем, что способствует существенному повышению продуктивности животных. Однако, данный метод осеменения не нашел широкого применения в козоводстве. Одной из причин этого стала низкая криорезистентность сперматозои-

дов козлов-производителей. Так, по данным Аксеновой П.В. и Ермакова А.М. (2015), после процесса заморозки сохранность подвижных сперматозоидов снижается до 40-50%, однако, при этом оплодотворяющая способность оттаянной спермы не превышает 35%. Данные указывают на значительные деструктивные изменения в структуре мембраны и акросомы сперматозоидов после глубокой заморозки [1, 10].

В связи с этим актуальным является разработка сред или средовых компонентов, обладающих регенеративными и протекторными свойствами. Особый интерес в данном вопросе представляет влияние мезенхимальных стволовых клеток (далее — МСК) и их секрета на качественные показатели спермы козлов-производителей.

МСК — мультипотентные клетки, обладающие способностью к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток мезенхимального происхождения. Многочисленными исследованиями доказана терапевтическая эффективность применения МСК в процессах регенерации клеток/тканей. Некоторые данные указывают на то, что микровезикулы, секретируемые МСК, участвуют в регенерации поврежденных эндогенных клеток, что можно рассматривать как эффективный биологический подход для поддержания и улучшения качественных показателей сперматозоидов [3, 5, 7, 9].

Целью настоящих исследований является изучение влияния мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов на качественные показатели их сперматозоидов. Для реализации поставленной цели были определены следующие задачи: разработка протокола использования мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов, установление степени переживаемости сперматозоидов в средах, содержащих мезенхимальные

стволовые клетки и проведением оценки качества сперматозоидов. Данная работа является основой для дальнейшего исследования с перспективой использования протокола криоконсервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования были проведены в научно-образовательной лаборатории по трансплантации эмбрионов животных на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины», а также на базе научного центра ООО «ЦитоГенТест». Были проведены взятие и исследование спермы козлов зааненской и чешской породы в возрасте 1-2,5 лет. Всего было взято 10 образцов (n=10). Отбор проб был произведен с помощью искусственной вагины модели IMV (Франция) согласно ГОСТ-Т32222–2013 [4].

Оценка спермы состояла из макро- и микроскопического исследований. При макроскопической оценке проводили исследование объема, запаха и цвета спермы, при микроскопической - определение концентрации, исследование морфологии и подвижности [6, 8].

Исследование проводилось с помощью микроскопа Levenhuk MED 45T. Для подсчета концентрации сперматозоидов использовалась камера Горяева [2]. Оценка морфологии и подвижности сперматозоидов проводилась с использованием программы Аргус-CASA. Полученные образцы были разведены в соотношении 1:100. Оценка аликвоты спермы производилась под увеличением 10x10 с использованием камеры Маклера. При оценке подвижности учитывались следующие кинематические параметры подвижности: VAP - средняя скорость движения головки по усредненной траектории, мкм/сек; VSL - скорость прямолинейного движения головки, мкм/сек; VCL - средняя скорость движения сперматозоидов по реальной траектории, мкм/сек; ALH - среднее отклонение головки, мкм; BCF - частота колебательных усредненных движений, Гц; STR - степень прямолинейности направленного движения сперматозоидов,

%; LIN - степень волнистости треков, %; WOB - процент осцилляции, %. Для оценки морфологии использовалась окраска по Романовскому-Гимзе с предварительной фиксацией мазков (фиксатор: триа-рилметан, растворенный в метиловом спирте, 7 минут). Экспозиция мазка в красителе составила 20 минут. Далее была проведена микроскопия (увеличение с использованием иммерсионного объектива 100x10, иммерсионное масло). При оценке морфологии учитывалось количество нормальных сперматозоидов, а также количество сперматозоидов с дефектами головки, шейки и хвостовой части.

Жировую ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ) получали после убоя козлов зааненской и чешской породы (n=3) в крестьянско-фермерском хозяйстве Волховского района Ленинградской области. ЖТ (2 см³) вырезали в области брюшины (мезогастрий) и помещали в стерильную пробирку с 10 мл транспортировочной среды (буферный раствор, содержащий 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, Gibco, США). КМ (3 см³) брали из бедренной кости иглой для аспирации костного мозга и переносили в стерильную пробирку с гепарином. Пробирки с биоматериалом доставляли в лабораторию при 4 – 8 °С в течение 3 часов.

В лаборатории биотехнологий научного центра ООО «ЦитоГенТест» пробы обрабатывали. Жировую ткань в условиях ламинарного бокса несколько раз тщательно промывали стерильным буфером PBS, измельчали при помощи микроножниц и инкубировали 45 мин при 37 °С в 0,075%-ном растворе коллагеназы (тип 2) (ПанЭко, Россия) при постоянном помешивании. Фермент инактивировали добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 1000 об/мин). Жидкую фазу с крупными кусками ткани и зрелыми жировыми клетками удаляли пипеткой Пастера, осадок ресуспендировали в среде αMEM. Затем полученную суспензию фильтровали через сетчатый фильтр с размером пор 100 мкм, фильтрат вновь центрифугиро-

вали (10 мин при 1000 об/мин), полученный осадок разводили средой α MEM + 10 % FBS и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см². Через 24 ч среду заменяли и удаляли неприкрепленные клетки. Монослой МСК ЖТ формировался к 10 суткам после выделения.

КМ разбавляли 1:1 стерильным раствором PBS с 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли, осадок вновь разбавляли стерильным раствором PBS с антибиотиками и центрифугировали, как описано выше. Отмывание клеток проводили еще раз. Затем к осадку добавляли среду α MEM + 10 % FBS и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см². Через 24 часа среду заменяли и удаляли неприкрепленные клетки. Спустя 48 часов процедуру повторили. Монослой МСК КМ формировался к 10 суткам после выделения.

В дальнейшем выделенные МСК пасировали для увеличения их количества. На втором пассаже клетки криоконсервировали и депонировали в Криобанке ООО «ЦитоГенТест».

Для проведения экспериментов по влиянию МСК на сохранность и поддержание качества спермы козлов клетки деконсервировали и культивировали в среде α MEM + 10 % FBS. Начиная с 3-го пассажа после размораживания, их использовали в работе. Для этого МСК отделяли от подложки, отмывали от ростовой среды и суспендировали в PBS с концентрацией 2×10^8 кл/мл.

Было сформировано три группы проб по 10 в каждой: контрольная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + буфер PBS 100 мкл, pH – 7,4), первая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + МСК ЖТ 2×10^8 кл/мл, pH – 7,2) и вторая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + МСК КМ 2×10^8 кл/мл, pH – 7,2). С целью установления степени переживаемости сперматозоидов в средах, содержащих мезенхимальные стволовые клетки и определения их влияния на качественные показатели сперматозоидов была проведена четырех-

этапная оценка качества спермы: 0, 1, 2 и 3 часа после инкубации спермы с мезенхимальными стволовыми клетками при температуре 38°C. Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации (0, 1, 2 и 3 часа) внутри каждой группы. При этом достоверными считались различия при $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$.

Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и Medstatistic «Медицинская Статистика» с вычислением показателей вариационного ряда и t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Согласно ранее проведенным исследованиям, за основу был взят протокол использования мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга в концентрации 2×10^6 кл/мл и сперматозоидов самцов баранов в концентрации 7×10^{10} кл/мл.

Согласно результатам комплексной оценки качества, сперма козлов была желтого цвета, имела специфический запах, объем в среднем составлял 0.7 ± 0.05 мл, концентрация – 7.71 ± 0.95 млрд.

Результаты сравнительного анализа влияния мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов на морфофункциональные характеристики их сперматозоидов отражены на рисунках 1-3, а также в таблице 1.

В процессе анализа морфологических показателей сперматозоидов (рис.1), было установлено закономерное и статистически значимое снижение количества нормальных сперматозоидов и увеличение количества сперматозоидов с дефектами в структуре головки и хвостовой части в процессе трехчасовой инкубации спермы в различных средах (буфер PBS, мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани и костного мозга).

Наиболее выраженные изменения в морфологической структуре сперматозоидов наблюдались в контрольной группе, в частности статистически значимое снижение количества нормальных сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации в 1,3; 1,4, и 1,5 раз ($p \leq 0,01$) по сравнению с

показателями 0 часов инкубации. Данная тенденция отмечалась также в опытных группах: первой опытной группе (МСК ЖТ) – в 1,2 (1, 2 часа после взятия, ($p \leq 0,01$)) и 1,4 раза (3 часа после взятия, ($p \leq 0,01$)); второй опытной группе (МСК КМ) – в 1,2 ($p \leq 0,05$), 1,3 и 1,4 раз, ($p \leq 0,01$). В процессе трехчасовой инкубации образцов наблюдалось статистически значимое увеличение таких патологических форм сперматозоидов как дефекты головки и хвостовой части. При этом достоверная разница значений среди количества сперматозоидов с дефектами головок наблюдалась в контрольной и второй опытной (МСК КМ) группах спустя 2 и 3 часа инкубации в 2,1 ($p \leq 0,01$); 2,2 ($p \leq 0,05$) раз, а также 1,9 и 1,7 ($p \leq 0,05$) раз соответственно по сравнению со значениями 0 часов после взятия спермы. Кроме того, было зафиксировано статистически значимое увеличение сперматозоидов с дефектами хвоста после 1го, 2го и 3го часа

инкубации образцов во всех исследуемых группах, а именно в контрольной группе в 2,6 ($p \leq 0,01$); 3,0 ($p \leq 0,05$) и 3,4 ($p \leq 0,01$) раз; в первой опытной группе (МСК ЖТ) в 2,0 ($p \leq 0,05$); 2,1 и 2,5 ($p \leq 0,01$) раз; во второй опытной группе (МСК КМ) в 2,2; 2,3 и 2,6 ($p \leq 0,01$) раз соответственно по сравнению с показателями 0 часов инкубации. Таким образом, в процессе трехчасовой инкубации спермы в различных средах (с МСК и без них) наблюдается нарушение морфологической целостности сперматозоидов. При этом наибольшее количество патологических форм отмечается в контрольной группе (буфер PBS). Количество нормальных сперматозоидов после проведения трехчасовой инкубации спермы составило $47,30 \pm 4,96\%$ / $50,40 \pm 2,21\%$ / $51,10 \pm 3,14\%$ в контрольной группе, первой (МСК ЖТ) и второй (МСК КМ) опытных группах соответственно.

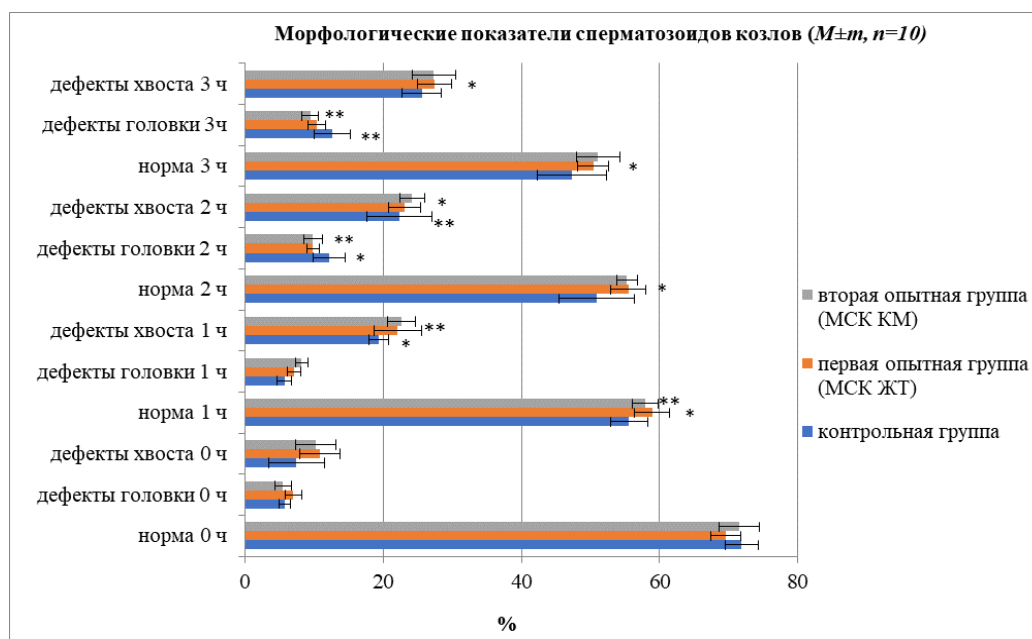


Рисунок 1 – Морфологические показатели сперматозоидов козлов ($M \pm m, n=10$).

Примечание: * - $p \leq 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы)

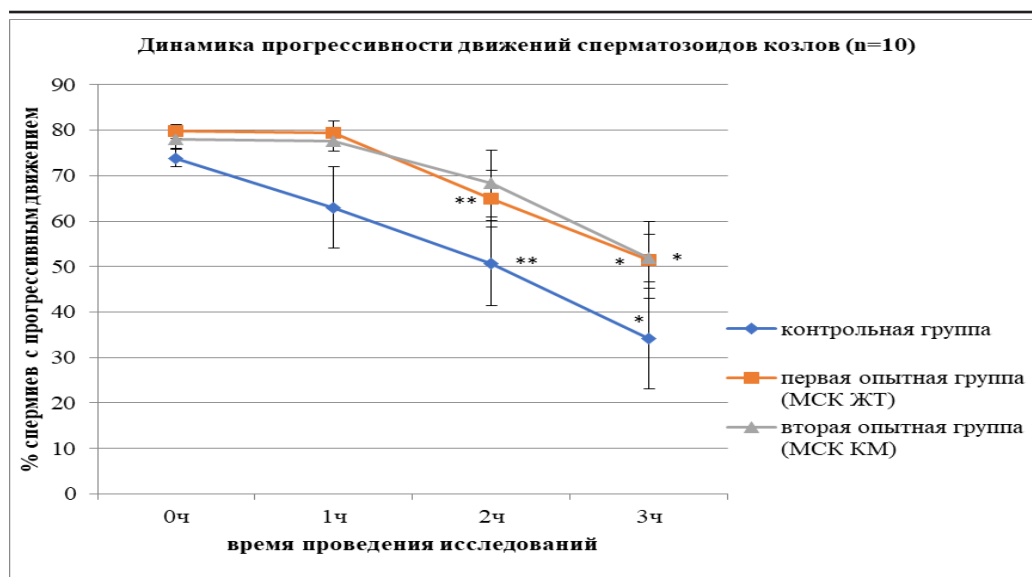


Рисунок 2 – Динамика подвижности сперматозоидов козлов ($M \pm m$, $n=10$).

Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы)

Результаты двигательной активности сперматозоидов, находящихся в различных средах в процессе трехчасовой инкубации отражены на рисунках 2 и 3, в таблице 1.

Так, снижение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов наблюдалось во всех группах, однако, в контрольной группе данная тенденция была наиболее выраженной.

При анализе полученных данных (рис.2), статистически значимая разница наблюдалась при сравнении значений прогрессивно двигающихся сперматозоидов после 2 и 3 часов инкубации в контрольной (снижение в 1,4 ($p \leq 0,05$); 2,1 ($p < 0,01$) раз) и первой опытной (МСК ЖТ: снижение в 1,2 ($p \leq 0,05$); 1,5 ($p < 0,01$) раз), после 3 часов во второй опытной группе (МСК КМ: снижение в 1,5 ($p < 0,01$) раз) соответственно по сравнению со значениями, полученными при оценке подвижности 0 часов инкубации спермы.

Количество неподвижных сперматозоидов закономерно возрастало во всех исследуемых группах в процессе трехчасо-

вой инкубации образцов (рис.3), при этом достоверная разница была зарегистрирована 2 и 3 часа после инкубации среди неподвижных сперматозоидов контрольной (увеличение в 4,4 и 5,3 ($p < 0,01$) раз) и первой опытной (МСК ЖТ: увеличение в 3,4 и 5,4 ($p < 0,01$) раз) групп, а также второй опытной группы (МСК КМ: увеличение в 3,8 ($p < 0,01$) раз) 3 часа после инкубации по сравнению с показателями 0 часов инкубации спермы.

Таким образом, после трехчасовой инкубации сперматозоидов в средах содержащих мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани и костного мозга козлов, а также в буфере PBS наблюдается снижение активности сперматозоидов, что соответствует биохимическим процессам, протекающим в данных клетках вне организма животного, а также соответствует морфологической картине. Вместе с тем, стоит отметить наиболее выраженную интенсивность данных процессов у сперматозоидов, находящихся в буферных средах без добавления мезенхимальных стволовых клеток. При этом количество прогрессивно двигающихся

сперматозоидов в контрольной, первой и второй опытных группах 3 часа после ин-

кубации составило $34,11 \pm 11,04\%$ / $51,50 \pm 4,46\%$ и $51,81 \pm 5,20\%$ соответственно.

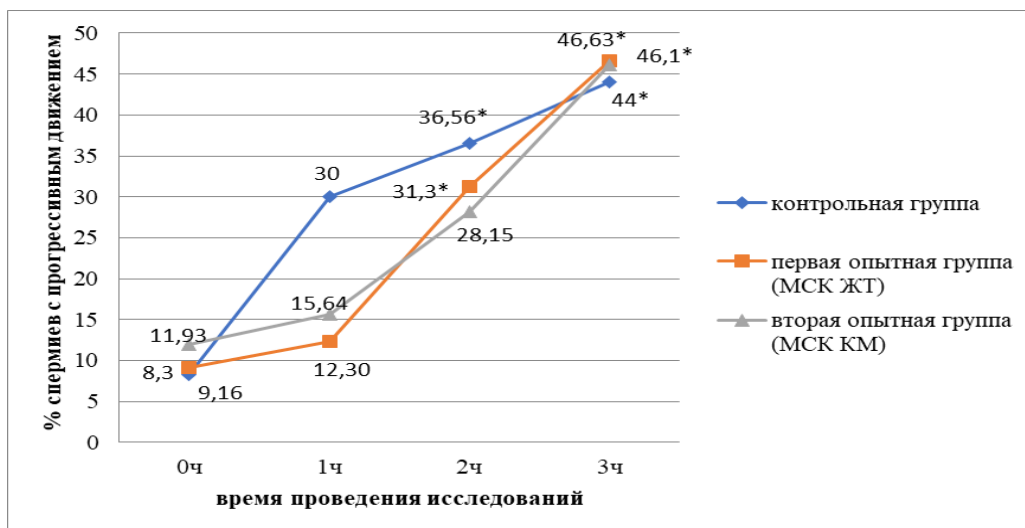


Рисунок 3 – Количество неподвижных сперматозоидов в динамике ($M \pm m$, $n=10$).

Примечание: * - $p < 0,01$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы)

Таблица 1 – Результаты оценки скорости движения сперматозоидов козлов в динамике ($M \pm m$, $n=10$)

Время проведения исследований	Показатели скорости движения сперматозоидов ($M \pm m$)		
	VSL	VCL	VAP
<i>Контрольная группа ($n=10$)</i>			
0 ч	948.35 ± 136.64	1256.20 ± 117.52	980.34 ± 135.51
1 ч	822.4 ± 259.23	1236.94 ± 271.60	922.6 ± 256.74
2 ч	$502.12 \pm 119.13^{**}$	$747.0 \pm 124.27^*$	$547.83 \pm 122.95^{**}$
3 ч	$314.61 \pm 123.09^*$	$470.53 \pm 172.3^*$	$342.92 \pm 131.12^*$
<i>Первая опытная группа (МСК ЖТ, $n=10$)</i>			
0ч	877.93 ± 167.03	1171.86 ± 157.20	934.25 ± 166.46
1ч	914.62 ± 163.93	1180.62 ± 174.30	967.30 ± 167.20
2ч	781.50 ± 158.83	940.20 ± 160.40	795.30 ± 158.30
3ч	$465,0 \pm 128.14$	$611.20 \pm 147.31^*$	$481.56 \pm 129.74^{**}$
<i>Вторая опытная группа (МСК КМ, $n=10$)</i>			
0ч	696.90 ± 206.63	929.40 ± 206.75	741.21 ± 210.64
1ч	1060.31 ± 159.93	1259.44 ± 155.7	1089.76 ± 154.62
2ч	447.20 ± 141.8	654.64 ± 157.23	475.51 ± 144.2
3ч	404.05 ± 56.26	620.10 ± 119.8	406.36 ± 71.8

Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p \leq 0,05$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы)

При оценке кинематических параметров подвижности сперматозоидов, достоверные различия были получены среди таких параметров как VSL (скорость прямолинейного движения головки), VCL (средняя скорость движения сперматозоидов по реальной траектории), VAP (средняя скорость движения головки по усредненной траектории) (табл.1).

Так, достоверное снижение скорости движения сперматозоидов отмечалось у сперматозоидов контрольной группы преимущественно 2 и 3 часа после инкубации: VSL (в 1,8 ($p \leq 0,05$) и 3,0 ($p < 0,01$) раз), VCL (в 1,7 и 2,6 ($p < 0,01$) раз), VAP (в 1,8 ($p \leq 0,05$) и 2,8 ($p < 0,01$) раз) соответственно по сравнению с показателями 0 часов инкубации спермы. Данная тенденция также наблюдалась у сперматозоидов первой опытной группы (МСК ЖТ). При этом было зафиксировано статистически значимое снижение средней скорости движения сперматозоидов по реальной траектории (VCL, $p < 0,01$) и средней скорости движения головки по усредненной траектории (VAP, $p \leq 0,05$) в 1,9 раза по сравнению с результатами, полученными 0 часов инкубации.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Рабочим протоколом использования мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга для спермы козлов-производителей является концентрация МСК - 2×10^8 кл/мл и концентрация сперматозоидов козлов - 7×10^{10} кл/мл.

Проведенными исследованиями установлено:

1. Время переживаемости сперматозоидов в средах, содержащих мезенхимальные стволовые клетки, составляет 3 часа, при этом сперматозоиды сохраняют жизнеспособность и имеют такие показатели: прогрессивность движений $51,5 \pm 8,46 - 51,8 \pm 5,2\%$, количество морфологически нормальных сперматозоидов $50,40 \pm 2,21 - 51,10 \pm 3,14\%$ (МСК ЖТ и МСК КМ соответственно).

2. Положительное влияние мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга козлов на каче-

ственные показатели их сперматозоидов: сохранение прогрессивности движения в течение часа после взятия спермы, достаточно длительное сохранение двигательной активности и структурной целостности сперматозоидов после трехчасовой инкубации по сравнению с показателями контрольной группой (снижение прогрессивности движений и морфологически нормальных сперматозоидов в 2,1 и 1,5 раз (контрольная группа, $p < 0,01$) и в 1,5 и 1,4 раза (опытные группы с МСК, $p < 0,01$) соответственно;

3. Предположительный вывод: среды, содержащие мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани и костного мозга можно использовать в качестве сред/средовых компонентов, способных регулировать клеточный объем и сохранять гомеостаз. Однако, необходимо дальнейшее проведение исследований жизнеспособности сперматозоидов при 0, 4, 6-часовой инкубации и оценки их качественных показателей.

THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE ADIPOSE TISSUE AND BONE MARROW OF GOATS ON THE QUALITY INDICATORS OF THEIR SPERM

Korochkina E.A.^{1*} – PhD. In Veterinary science, Associate Professor, Department of Genetic and Reproductive Technologies; **Trifonova A.V.**² – PhD in biological science, the director of science; **Finageev E.Y.**¹ – PhD. In Veterinary sciences, Assistant, Department of Genetic and Reproductive Technologies; **Glavatskaya D.E.**¹ – student; **Pushkina V.S.**¹ – student.

*e.kora@mail.ru

St. Petersburg state academy of veterinary medicine
LTD “CitoGenTest”

Financing: Russian Science Foundation №. 23-26-00157 “The influence of MSCs from adipose tissue and bone marrow of small ruminants on the quality indicators of their sperm before and after cryopreservation” (agreement №. 23-26-00157 dated 01/13/2023).

ABSTRACT

The purpose of this research is to study the influence of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow of goats on the quality parameters of their sperm. A complex evaluation of sperm quality (volume, concentration, morphology, motility) of Saanen and Czech goats (n=10) at the age of 1-2.5 years was carried out according to generally accepted methods and protocols. Adipose tissue (AT) and bone marrow (BM) were obtained after the slaughter of goats (n=6) on a peasant farm in the Volkhov district of the Leningrad region. After processing the obtained samples, mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue and bone marrow of goats were isolated, accumulated and cryopreserved. Three groups of samples of 10 each were formed: control (spermatozoa 7×10^{10} cells/ml + PBS buffer 100 μ l, pH – 7.4), first experimental (spermatozoa 7×10^{10} cells/ml + MSCs 2×10^{10} cells/ml, pH – 7.2), the second was experimental (sperm 7×10^{10} cells/ml + BM MSCs 2×10^8 cells/ml, pH – 7.2) and a four-stage assessment of sperm quality was carried out: after incubation of sperm with mesenchymal stem cells at a temperature of 38°C for 0, 1, 2 and 3 hours. Based on the results obtained, the working protocol for the use of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for the sperm of breeding goats is the concentration of MSCs – 2×10^8 cells/ml and the concentration of goat spermatozoa – 7×10^{10} cells/ml. The studies conducted have established the positive effect of mesenchymal stem cells from the adipose tissue and bone marrow of goats on the quality indicators of their sperm. At the same time, spermatozoa remain viable during three-hour incubation with a progression of movements equal to 51.5 ± 8.46 – $51.8 \pm 5.2\%$ and a number of morphologically normal sperm equal to 50.40 ± 2.21 – 51.10 ± 3 , 14% (3 hours after incubation, MSCs from adipose tissue and bone marrow, respectively).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Аксёнова П. В., Ермаков А. М. Биология репродукции коз: Монография. - СПб.: Издательство «Лань», 2015. - 134 с.
2. Баженова, Н.Б. Оценка качества спермы животных / Н. Б. Баженова, К.В. Племяшов. - СПб.: «Издательство СПбГАВМ», 2007. – 22 с.
3. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 1 / Под ред. М. А. Пальцева. - М.: ОАО Издательство «Медицина», издательство «Шико», 2009. - 272 с.
4. ГОСТ 32222-2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. - Введен 2015-01-27. - М.: Стандарт информ, 2018. – 10 с.
5. Мокаризаде А. и др. Микровезикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток: трофические челноки для улучшения показателей качества спермы // Репродуктивная токсикология. - 2013. - Т. 42. - С. 78-84.
6. Chandler, J.E. Semen quality characteristics of dairy goats / J.E. Chandler, C.L. Painter, R.W. Adkison, M.A. Memon, P.G. Hoyt // Journal of Dairy Science. - 2008. - Vol. 71. (6). - P. 1638-1646.
7. Gugjoo, M. B. Goat Mesenchymal Stem Cell Basic Research and Potential Applications / M. B. Gugjoo, Amar Pal, M. R. Fazili, R. A. Shah, M. S. Mir G. T. Sharma // Mesenchymal Stem Cell in Veterinary Sciences. - 2020. - P. 153–179.
8. Herrera Vargas, D. Conventional and functional evaluation of semen in male dairy goats / Herrera Vargas, D.; Castano Escobar, M.; Arcila Davila, D.etal. // Veterinarska Stanica. – 2023. - Vol. 54 (2). - P 129-136.
9. Mudasir, B. G. Goat mesenchymal stem cell basic research and potential applications / Mudasir B. G., Amarpal, Mujeeb ur R. F., Riaz A. S.etal. // Small Ruminant Research. -2020.- Vol.-183.
10. Vincent Ramukhithi F., Characterisation of semen and phenotypic parameters in relation to male goat fertility / Vincent Ramukhithi F, Caswell Chokoe T, Ronald T, Christina Lehloenya K. // Goat Science - Environment, Health and Economy. - 2021.

REFERENCES

1. Aksenova P.V., Ermakov A.M. Biology of goat reproduction: Monograph. - St. Petersburg: Lan Publishing House, 2015. - 134 p.
2. Bazhenova, N.B. Assessing the quality of animal sperm / N.B. Bazhenova, K.V. Plemyashov. - St. Petersburg: Publishing House SPbGAVM, 2007. – 22 p.
3. Stem cell biology and cell technology. Volume 1 / Ed. M. A. Paltseva. - M.: OJSC Publishing House "Medicine", publishing house "Shiko", 2009. - 272 p.
4. GOST 32222-2013. Means of reproduction. Sperm. Sampling methods. - Veden 2015-01-27. - M.: Standard Inform, 2018. – 10 p.
5. Mokarizadeh A. et al. Microvesicles obtained from mesenchymal stem cells: trophic shuttles to improve sperm quality indicators // Reproductive toxicology. - 2013. - T. 42. - P. 78-84.
6. Chandler, J.E. Semen quality characteristics of dairy goats / J.E. Chandler, C.L. Painter, R.W. Adkison, M.A. Memon, P.G. Hoyt // Journal of Dairy Science. - 2008. - Vol. 71. (6). - P. 1638-1646.
7. Gugjoo, M. B. Goat Mesenchymal Stem Cell Basic Research and Potential Applications / M. B. Gugjoo, Amar Pal, M. R. Fazili, R. A. Shah, M. S. Mir G. T. Sharma // Mesenchymal Stem Cell in Veterinary Sciences. - 2020.- P. 153–179.
8. Herrera Vargas, D. Conventional and functional evaluation of semen in male dairy goats / Herrera Vargas, D.; Castano Escobar, M.; Arcila Davila, D.etal. // Veterinarska Stanica. – 2023. - Vol. 54 (2). - P 129-136.
9. Mudasir, B. G. Goat mesenchymal stem cell basic research and potential applications / Mudasir B. G., Amarpal, Mujeer ur R. F., Riaz A. S.etal. // Small Ruminant Research. -2020.- Vol.-183.
10. Vincent Ramukhithi F., Characterisation of semen and phenotypic parameters in relation to male goat fertility / Vincent Ramukhithi F, Caswell Chokoe T, Ronald T, Christina Lehloenya K. // Goat Science - Environment, Health and Economy. - 2021.