

УДК:576.362:636.2.082.453.52

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.486

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДНОГО МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК СПОСОБА ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Корочкина Е.А.^{1*} – д-р ветеринар. наук, доц. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID0000-0002-7011-4594); Трифонова А.В.² – канд. биол. наук, директор по науке, Никитин В.В.¹ – асс. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий; Главацкая Д.Е.¹ – асп.; Пушкина В.С.¹ – асп.

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»
² ООО «Стэмреновацио»

*e.kora@mail.ru

Ключевые слова: качество спермы, быки-производители, производные мезенхимальных стволовых клеток.

Key words: spermquality, breedingbulls, components of mesenchymalstemcell.

Поступила: 08.11.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния производного мезенхимальных стволовых клеток (лизата) из жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ) быков на качество нативной спермы. Всего было взято 10 образцов. Каждый образец был разделен на аликвоты (после центрифугирования (7 min 600 об/мин) и удаления семенной плазмы) в соответствии следующим группам: контрольная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + буфер PBS 100 мкл), первая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + лизат МСК КМ 2×10^8 кл/мл), вторая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + лизат МСК ЖТ 2×10^8 кл/мл). Была проведена четырехэтапная оценка качества спермы: 0, 2 и 4 часов инкубации при температуре 37°C. Согласно результатам проведенных исследований, достоверное снижение количества нормальных форм сперматозоидов было зарегистрировано при оценке 4-х часовой инкубации спермы. При этом, разница значений в контрольной и первой опытной группах составила 1,3 раза ($p < 0,05$ для обеих групп), во второй опытной – 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с данными 0 часов инкубации. Было зарегистрировано наибольшее количество морфологически нормальных форм сперматозоидов в первой опытной группе, при инкубации сперматозоидов с продуктами секреции МСК из костного мозга. Было получено статистически значимое сокращение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов спустя 2 и 4 часа инкубации по сравнению с данными, полученными при оценке двигательной активности в 0 часов инкубации. Так, разница значений в контрольной группе составила 1,4 (2 и 4 часа, $p < 0,01$), в первой опытной

группе – 1,1 ($p<0,05$) и 1,4 ($p<0,01$), во второй опытной группе – 1,2($p<0,05$) и 1,6 ($p<0,05$) раз 2 и 4 часа соответственно. Наибольшее количество прогрессивнодвигающихся сперматозоидов было зарегистрировано при взаимодействии половых клеток быка с лизатом МСК в течение двух часов инкубации, полученных из костного мозга и составило $74,75\pm2,39\%$.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Производство высококачественного семени быков является одним из ключевых факторов успешной реализации плана племенной работы в животноводстве. Многочисленными исследованиями установлен широкий спектр факторов, влияющих на качество спермы производителей, основными из которых являются генетика, сезон года, температура окружающей среды, режим эксплуатации производителя, его возраст, особенности кормления и многие другие [1-5]. Научно-практикующими специалистами разработаны различные способы коррекции негативного влияния вышеперечисленных факторов, а также методы повышения качественных показателей спермы. Это две группы, направленные на воздействие на организм производителей с помощью экзогенного введения препаратов и, непосредственно, воздействие на сперму, а именно - применение сред/добавок/коллоидного центрифугирования и др. [6]. Принимая во внимание огромное количество полученных результатов, проблема сохранности оплодотворяющей способности сперматозоидов остается актуальной. Довольно интересным и малоизученным направлением является технологии регенеративной медицины, главным образом мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Многочисленные исследования продемонстрировали потенциальную роль МСК в различных биологических процессах, таких как участие в регенерации клеток и изменении клеточного фенотипа. Кроме того, установлено, что МСК регулируют механизмы восстановления, происходящие на клеточном уровне за счет секретомы или высвобождения различных факторов, главным образом – белков. Qamar A.Y. с соавтор. (2020) в своих исследованиях, направленных на изучение жизнеспособности спер-

мы собак после оттаивания при разбавлении средами, содержащими МСК из жировой ткани указывает на положительный эффект МСК, в частности – высокая сохранность целостности плазматической и акросомальной мембран сперматозоидов после оттаивания. Авторы предполагают, что возможной причиной улучшения целостности является такие белки как аннексин, дисферлин, фибронектин, участвующие в процессе регенерации клетки [7]. Значение аннексинов – участие в экзоцитозе, эндоцитозе, агрегации; фибронектина – регуляция клеточных процессов, а также поддержание и восстановление поврежденной ткани. Что касается дисферлина, то данный трансмембранный кальций-связывающий белок принимает участие в репарации сарколеммы и внутриклеточных везикулярных систем после повреждений, регуляции эндо-и экзоцитоза и воспаления [8]. Учитывая вышеизложенные факты, МСК и их производные (кондиционированная среда и лизат) обладают высоким потенциалом в аспекте регенерации клеток. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение влияния производного мезенхимальных стволовых клеток (лизат) из жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ) быков на качество нативной спермы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования были проведены в научно-исследовательской лаборатории кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», а также в отделе разработки клеточных биотехнологий ООО «Стэмреновацио». Было проведено взятие спермы половозрелых быков ($n=2$) голштинской породы в возрасте 14-15 месяцев с помощью искусственной вагины модели IMV (Франция) согласно

ГОСТ32222–2013 [9]. Быки содержатся в виварии на базе ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Всего было взято 10 образцов. Каждый образец был разделен на аликвоты (после центрифугирования (7 min 600 об/мин) и удаления семенной плазмы) в соответствии следующим группам: контрольная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + буфер PBS 100 мкл), первая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + лизат МСК КМ 2×10^8 кл/мл), вторая опытная (сперматозоиды 7×10^{10} кл/мл + лизат МСК ЖТ 2×10^8 кл/мл). Концентрация образцов была достигнута с помощью математического подсчета с учетом исходного объема. Была проведена трехэтапная оценка качества спермы: 0, 2 и 4 часов инкубации при температуре 37°C. Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации (0, 2 и 4 часа) внутри каждой группы. При этом достоверным считались различия при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$.

Исследование спермы проводилось с помощью микроскопа Levenhuk MED 45T. Для подсчета концентрации сперматозоидов использовалась камера Горяева [10]. Оценка подвижности сперматозоидов проводилась с помощью камеры Маклера (увеличение X100, разведение образцов 1:100) с учетом следующих показателей подвижности: прогрессивно двигающиеся, не прогрессивно двигающиеся и неподвижные сперматозоиды. Оценка морфологии проводилась по методу Крюгера (200 сперматозоидов в каждом образце), при этом для окрашивания мазков был использован набор SpermBlue (Microptic) с предварительной фиксацией мазков (фиксатор: 10 минут, краситель: 18 минут) и последующей микроскопией (увеличение с использованием объектива x1000, иммерсионное масло). За основу был взят протокол использования МСК и их производных для баранов и козлов-производителей [11-12].

Жировую ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ) получали после убоя быков голштинской породы (n=5) в племенном хозяйстве Выборгского района Ленинградской области. Клетки деконсервировали культивировали в среде α MEM +

10 % FBS. Начиная с 3-го пассажа после размораживания, их использовали в работе.

Для приготовления лизата МСК отделяли от подложки, отмывали от ростовой среды и суспендировали в PBS с концентрацией 2×10^8 кл/мл. Затем суспензию алиquotировали и фасовали в пробирки Эппендорфа. Лизат получали методом криодеструкции путем двукратного быстрого погружения в жидкий азот (-196°C) и медленного оттаивания при комнатной температуре. Полученный таким образом лизат содержал высвобожденные внутриклеточные белково-пептидные компоненты МСК и фрагменты клеточных мембран.

Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и MedCalc с вычислением показателей вариационного ряда и t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Результаты влияния производного МСК - лизата из жировой ткани и костного мозга быков на качественные показатели сперматозоидов в процессе четырехчасовой инкубации отражены на рисунках 1-2.

При анализе результатов оценки морфологии сперматозоидов быка в процессе четырехчасовой инкубации нужно отметить, что достоверная разница значений, главным образом, отмечалась среди значений морфологически нормальных форм половых клеток (рис.1).

Согласно данным рисунка 1, достоверное снижение количества нормальных форм сперматозоидов была зарегистрировано при оценке 4-х часовой инкубации спермы. Так, разница значений в контрольной и первой опытной группах составила 1,3 раза ($p < 0,05$ для обеих групп), во второй опытной – 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с данными 0 часов инкубации. Нужно отметить тенденцию к незначительному увеличению количества нормальных форм сперматозоидов по завершению второго часа инкубации спермы с лизатом МСК, полученных из жировой ткани и костного мозга (разница недо-

верна). Можно предположить, что причиной данной закономерности является паракринная функция МСК, в частности секреция факторов роста фибробластов (bFGF), фактора роста кератиноцитов (KGF), стромального фактора-1 (SDF-1), моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), интерлейкина-8 (IL-8) и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). Данные белки принимают участие в регенеративном процессе, подавляя апоптоз [7]. Было зарегистрировано наибольшее количество морфологически нормальных форм сперматозоидов в первой опытной группе, при инкубации сперматозоидов с лизатом МСК из костного мозга. Динамика прогрессивно двигающихся сперматозоидов отражена на рисунке 2.

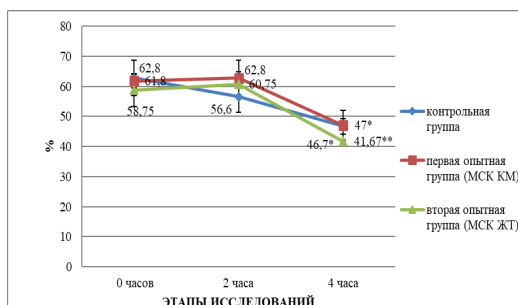


Рисунок 1 – Динамика количества морфологически нормальных форм сперматозоидов быков в процессе четырехчасовой инкубации с компонентом МСК – лизатом ($M \pm t$, $n=5$). Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, проведенные исследования указывают на положительное влияние производного МСК – лизата из костного мозга быков, содержащего высвобожденные внутриклеточные белково-пептидные компоненты МСК и фрагменты клеточных мембран, на морфологическую структуру и подвижность сперматозоидов в процессе четырехчасовой инку-

При анализе данных рисунка 2, статистически значимые изменения значений отмечались внутри каждой группы, в частности сокращение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов, 2 и 4 часа инкубации по сравнению с данными, полученные при оценке двигательной активности в 0 часов инкубации. Так, разница значений в контрольной группе составила 1,4 (2 и 4 часа, $p < 0,01$), в первой опытной группе – 1,1 ($p < 0,05$) и 1,4 ($p < 0,01$), во второй опытной группе – 1,2 ($p < 0,05$) и 1,6 ($p < 0,05$) раз 2 и 4 часа соответственно. Наибольшее количество прогрессивно двигающихся сперматозоидов было зарегистрировано при взаимодействии половых клеток быка с лизатом МСК в течение двух часов инкубации, полученных из костного мозга, и составило $74,75 \pm 2,39\%$.

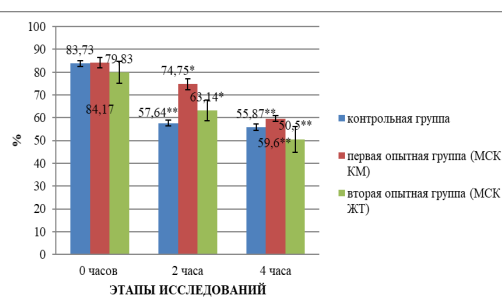


Рисунок 2 – Динамика прогрессивно двигающихся сперматозоидов быков в процессе четырехчасовой инкубации с компонентом МСК – лизатом ($M \pm t$, $n=10$). Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ (достоверно по сравнению с результатами 0 часов инкубации спермы).

бации. Принимая во внимание время переживаемости сперматозоидов в половых путях самки, смешивание лизата, полученного из костного мозга со спермой быков способствует более длительному сохранению жизнеспособности и увеличению двигательной активности сперматозоидов при проведении искусственного осеменения, что положительно отразится на его результативности. Было установле-

но выраженное сохранение прогрессивной подвижности сперматозоидов при смешивании с лизатом МСК, полученным из костного мозга в процессе двухчасовой инкубации с разницей значений в контроле, равной 18,88%, что может указывать на высокую вероятность успешного искусственного осеменения. Однако для изучения механизма положительного влияния производного МСК на качественные показатели спермы быков необходимо продолжить исследования.

PROSPECTS FOR USING COMPONENT MESENCHYMAL STEM CELLS AS A WAY TO IMPROVE THE QUALITY OF BULLS' 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; **Nikitin V.V.** ¹ – Assistant, Department of Genetic and Reproductive Technologies; **Glavatskay D.** ¹ – PhD student, **Pushkina V.S.** ¹ – PhD student

¹ St. Petersburg state academy of veterinary medicine

² LLC "Scientific Center for Cytogenetic Testing"

*e.kora@mail.ru

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of mesenchymal stem cell derivative (lysate) from adipose tissue (AT) and bone marrow (BM) of bulls on the quality of native sperm. A total of 10 samples were taken. Each sample was divided into aliquots (after centrifugation (7 min 600 rpm) and removal of seminal plasma) according to the following groups: control (sperm 7x10¹⁰ cells/ml + PBS buffer 100 µl), the first experimental (sperm 7x10¹⁰ cells/ml + BM MSC lysate 2x10⁸ cells/ml), the second experimental (sperm 7x10¹⁰ cells/ml + AT MSC lysate 2x10⁸ cells/ml). A four-stage assessment of sperm quality was carried out: 0, 2 and 4 hours of incubation at a temperature of 37°C. According to the results of the studies, a reliable decrease in the number of

normal spermatozoa was recorded when assessing 4-hour sperm incubation. At the same time, the difference in values in the control and first experimental groups was 1.3 times ($p < 0.05$ for both groups), in the second experimental - 1.4 times ($p < 0.05$) compared with the data of 0 hours of incubation. The highest number of morphologically normal spermatozoa was recorded in the first experimental group, when incubating spermatozoa with bone marrow MSC secretion products. A statistically significant decrease in the number of progressively moving spermatozoa was obtained after 2 and 4 hours of incubation compared with the data obtained when assessing motility at 0 hours of incubation. Thus, the difference in values in the control group was 1.4 (2 and 4 hours, $p < 0.01$), in the first experimental group - 1.1 ($p < 0.05$) and 1.4 ($p < 0.01$), in the second experimental group - 1.2 ($p < 0.05$) and 1.6 ($p < 0.05$) times 2 and 4 hours, respectively. The highest number of progressively moving spermatozoa was recorded during the interaction of bovine germ cells with the MSC lysate during two hours of incubation, obtained from the bone marrow and amounted to 74.75±2.39%.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Fuerst-Waltl B. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls / B. Fuerst-Waltl, H. Schwarzenbacher, Ch. Perner, J. Sölkner // *Animal Reproduction Science*. - Volume 95. - Issues 1–2. – 2006. – P. 27-37.
2. Hürland M. The use of machine learning methods to predict sperm quality in Holstein bulls / M. Hürland, D.A. Kuhlitz, C. Kuhlitz, J.H. Osmer, M. Jung, M. Schulze // *Theriogenology*. - 2023. - Feb;197:16-25. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.032.
3. Llamas-Luceño N. High temperature-humidity index compromises sperm quality and fertility of Holstein bulls in temperate climates / N. Llamas-Luceño, M. Hostens, E. Mullaart, M. Broekhuijs, P. Lonergan, A. Van Soom // *Journal of Dairy Science*. - Volume 103. - Issue 10. - 2020. – P. 9502-

9514.

4. Losano JD. A. Characterization of bioenergetic and kinematic plasticity of bovine sperm reveals novel and dynamic temporal traits / A. Losano JD., CL. Souders, CJ. Martyniuk, BW. Daigneault // *Reproduction*. 2023;166(2):135-147. <http://doi.org/10.1530/REP-23-0095>. PMID:37252841.

5. Kowalczyk A. The role of environmental optimization for storing bulls' sperm cells / A. Kowalczyk, M. Kuczaj, E. Czerniawska-Piątkowska // *SystBiolReprod Med.* – 2020. – Oct;66(5):300-310. doi: 10.1080/19396368.2020.1795432. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32808820.

6. Корочкина, Е. А. Способы повышения качества спермопродукции самцов-производителей (обзор) / Е. А. Корочкина, К. Э. Молоденкова // *Вестник АГАТУ*. – 2024. – № 1(13). – С. 1-8.

7. Qamar AY, Fang X, Bang S, Shin ST, Cho J. The effect of astaxanthin supplementation on the post-thaw quality of dog semen. *ReprodDomest Anim.* 2020 Sep;55(9):1163-1171 (doi: 10.1111/rda.13758).

8. Захаров, А.С. Биохимические и патологические аспекты дисферлин-ассоциированных мышечных дистрофий / А.С. Захаров, Н.В. Короткова, Н.Д. Мжаванадзе, А.А. Никифоров // *Наука молодых – Eruditio Juvenium*. -2021. - №1. - С.157-168.

9. ГОСТ 32222–2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. – Введен 2015-01-27. – М.: Стандарт информ, 2018. – 10 с.

10. Баженова, Н. Б. Оценка качественных показателей спермы животных: учебно-методическое пособие / Н. Б. Баженова, К. В. Племяшов, Е. А. Корочкина. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – 25 с.

11. Корочкина, Е.А. Влияние компонентов мезенхимальных стволовых клеток козлов на качественные показатели сперматозоидов / Е. А. Корочкина, А. В. Трифонова, Е. Ю. Финагеев [и др.] // *Ветеринария и кормление*. – 2024. – № 2. – С. 40-44. – DOI 10.30917/ATT-VK-1814-9588-

2024-2-9.

12. Корочкина, Е.А. Влияние МСК из жировой ткани и костного мозга баранов на качественные показатели их сперматозоидов / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, Д. Е. Главацкая [и др.] // *Ветеринария*. – 2024. – № 1. – С. 37-41. – DOI 10.30896/0042-4846.2024.27.1.37-41.

REFERENCES

Fuerst-Waltl B. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls / B. Fuerst-Waltl, H. Schwarzenbacher, Ch. Perner, J. Sölkner // *Animal Reproduction Science*. - Volume 95. - Issues 1–2. – 2006. – P. 27-37.

Hürland M. The use of machine learning methods to predict sperm quality in Holstein bulls / M. Hürland, D.A. Kuhlitz, C. Kuhlitz, J.H. Osmers, M. Jung, M. Schulze // *Theriogenology*. - 2023. - Feb;197:16-25. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.032.

Llamas-Luceño N. High temperature-humidity index compromises sperm quality and fertility of Holstein bulls in temperate climates / N. Llamas-Luceño, M. Hostens, E. Mullaart, M. Broekhuijse, P. Lonergan, A. Van Soom // *Journal of Dairy Science*, - Volume 103. - Issue 10.- 2020. – P. 9502-9514.

Losano JD. A. Characterization of bioenergetic and kinematic plasticity of bovine sperm reveals novel and dynamic temporal traits / A. Losano JD., CL. Souders, CJ. Martyniuk, BW. Daigneault // *Reproduction*. 2023;166(2):135-147. <http://doi.org/10.1530/REP-23-0095>. PMID:37252841.

Kowalczyk A. The role of environmental optimization for storing bulls' sperm cells / A. Kowalczyk, M. Kuczaj, E. Czerniawska-Piątkowska // *SystBiolReprod Med.* – 2020. – Oct;66(5):300-310. doi: 10.1080/19396368.2020.1795432. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32808820.

Korochkina, E. A. Methods for improving the quality of sperm production in male breeders (review) / E. A. Korochkina, K. E. Molodenkova // *Bulletin of AGATU*. - 2024.

- No. 1 (13). - P. 1-8.
Qamar AY, Fang X, Bang S, Shin ST, Cho J. The effect of astaxanthin supplementation on the post-thaw quality of dog semen. *ReprodDomest Anim.* 2020 Sep;55(9):1163-1171 (doi: 10.1111/rda.13758).
Zakharov, A.S. Biochemical and pathophysiological aspects of dysferlin-associated muscular dystrophies / A.S. Zakharov, N.V. Korotkova, N.D. Mzhavanadze, A.A. Nikiforov // *Science of the Young - EruditioJuvenium.* - 2021. - No. 1. - P.157-168.
GOST 32222-2013.Sredstva vosproizvodstva. Sperma. Metodyotbora prob. – M.: Standart inform. 2018. 10 s.
Bazhenova N. B., PlemyashovK. V., KorochkinaE. A. Otsenkakachestvennykhpokazateleyspermyzhivotnykh. Sankt-Peterburg: Sankt-Peterburgskiygosudarstvennyyuniversitetveternarnoymeditsiny, 2023. 25 s.
Korochkina, E.A. Effect of components of goat mesenchymal stem cells on the qualitative parameters of spermatozoa / E. A. Korochkina, A. V. Trifonova, E. Yu. Finageev [et al.] // *Veterinary Science and Feeding.* - 2024. - No. 2. - P. 40-44. - DOI 10.30917 / ATT-VK-1814-9588-2024-2-9.
Korochkina, E.A. Effect of MSCs from adipose tissue and bone marrow of rams on their qualitative parameters / E. A. Korochkina, E. Yu. Finageev, D. E. Glavatskaya [et al.] // *Veterinary Science.* - 2024. - No. 1. - P. 37-41. – DOI 10.30896/0042-4846.2024.27.1.37-41.