

УДК: 576:611.013.395:636.082.453.53
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.467

ПРИМЕНЕНИЕ ЛИЗАТА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КАЧЕСТВЕ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ СРЕДЫ ДЛЯ РАЗМОРОЖЕННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Корочкина Е.А.* – д-р ветеринар. наук, доц. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID0000-0002-7011-4594); **Беликова А.О.** – асп. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий; **Бахтурина Е.И.** – студент

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

*e.kora@mail.ru

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

Keywords: components of mesenchymal stem cell, sperm 'quality, bulls.

Поступила: 20.06.2025

Принята к публикации: 26.08.2025

Опубликована онлайн: 15.09.2025



РЕФЕРАТ

Криоконсервация половых гамет является важной составляющей программ вспомогательных репродуктивных технологий. Учитывая свойства мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и их производных, главным образом регенерация (за счет цитокинов, факторов роста, экзосом), целью данной работы явилось изучение применения лизата МСК в качестве реабилитационной среды для размороженной спермы быков-производителей. Лизат мезенхимальных стволовых клеток (МСК) — это продукты разрушения МСК, содержащие их биологически активные компоненты: белки, нуклеиновые кислоты, экзосомы, факторы роста и метаболиты. Было сформировано 2 группы проб спермы быков-производителей после оттаивания по 15 образцов в каждой: контрольная, опытная группа. Образцы опытной группы смешивали со средой, содержащей лизат МСК, контрольной группы — с фосфатно-солевым буфером (PBS) в соотношении 1:1. Оценку качественных показателей спермы (подвижность, морфология) проводили спустя 0, 2 и 4 часа инкубации. Проверка статистической гипотезы о различии опыта и контроля проводилась с помощью Т-критерия Вилкоксона. Установлено, что четырехчасовая инкубация сперматозоидов после оттаивания в средах, содержащих лизат МСК способствует ($p < 0,05$) сохранению наибольшего количества морфологически нормальных сперматозоидов ($71,53 \pm 3,21\%$) с наименьшим содержанием дефектов головки ($8,87 \pm 1,10\%$) и хвоста ($18,33 \pm 2,27\%$). Обнаружены статистически достоверные различия ($p < 0,05$), в количестве прогрессивно подвижных и неподвижных сперматозоидов на 4-й час инкубации. Число прогрессивно подвижных сперматозоидов было больше в опытной группе в 1,4 раза, неподвижных в контрольной группе — в 1,3 раза. Полученные данные определяют перспективность использования компо-

нента МСК – лизата в качестве реабилитационной среды для сперматозоидов после оттаивания. Однако для точного определения механизма воздействия необходимо продолжить исследования.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Криоконсервация половых гамет является важной составляющей программ вспомогательных репродуктивных технологий. Это метод длительного сохранения генетического материала путём замораживания в жидком азоте (-196°C). Данная процедура позволяет сохранить жизнеспособность и фертильность сперматозоидов в течение длительного времени. Вместе с тем, воздействие разного диапазона температур, связанное с процедурой криоконсервации и оттаивания, сопровождается морфофункциональными изменениями в сперматозоидах быков-производителей в частности, приводит к снижению подвижности сперматозоидов после разморозки/оттаивания. По данным Watson P. F. и др. (2000), сохранение прогрессивной подвижности наблюдается у 40-60% мужских половых гамет, что связано с повреждением клеточных мембран из-за образования кристаллов льда. Кроме того, согласно исследованиям Thomson L.K. и др. (2009), процедура сопровождается увеличением доли сперматозоидов с фрагментацией ДНК и с нарушением целостности акросомы (J.L.Bailey, 2003). После оттаивания регистрируют снижение переживаемости сперматозоидов и уменьшение продолжительности их жизни в половых путях самки. По данным Aitken R. и Baker M. A. (2020), во время криоконсервации образуются активные формы кислорода, повреждающие липиды мембран и митохондрию средней части шейки сперматозоида. Таким образом, перспективным направлением является разработка сред и средовых компонентов, обеспечивающих максимальную сохранность сперматозоидов во время криоконсервации, а также после оттаивания. Особую актуальность имеет разработка реабилитационных сред, способствующих запуску процесса регенерации структурных элементов мужских половых клеток и обеспечивающих более длительную переживаемость

сперматозоидов. Учитывая свойства мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и их производных, главным образом регенерация (за счет цитокинов, факторов роста, экзосом), целью данной работы явилось изучение применения лизата МСК в качестве реабилитационной среды для размороженной спермы быков-производителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Работу выполняли в научно-образовательной лаборатории кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

Замороженные образцы ($n=30$) были получены в АО «Невское» от быков-производителей голштинской и айширской пород в возрасте от 1,5 до 3-х лет. Оттаивание спермы проводили в условиях водяной бани при температуре 38°C в течение 30 секунд. Сразу же после оттаивания спермы были сформированы опытная ($n=15$) и контрольная ($n=15$) группы. Образцы опытной группы смешивали со средой, содержащей лизат МСК, контрольной группы — фосфатно-солевым буфером (PBS) в соотношении 1:1. Инкубацию проводили в течение 4-х часов при температуре 38°C . Качественные показатели спермы (подвижность, морфология) оценивали спустя 0, 2 и 4 часа инкубации. Оценку подвижности проводили с помощью камеры Маклера (увеличение 10×10). Степень подвижности оценивали по следующим критериям: прогрессивная, медленная прогрессивная, не прогрессивная, неподвижные (согласно протоколу 6-го издания ВОЗ (2021)). Морфологию гамет определяли согласно критериям Крюгера, в качестве красителя использовали набор SpermBlue (Microptic, увеличение с использованием объектива 100×10 , иммерсионное масло).

Костный мозг (КМ) получали после седации диазепамом ($0,05 \text{ мг/кг}$ внутривенно) и местной анестезии 2%-ным гид-

рохлоридом лидокаина у здоровых коров возрастом 1-2 года в хозяйстве Ленинградской области. Пункцию КМ (3 см³) брали после асептической подготовки кожи при помощи иглы для биопсии из подвздошной кости и переносили в стерильную пробирку с гепарином. Пробирки с биоматериалом доставляли в лабораторию при 4 – 8°C в течение 2 часов. В лаборатории отдела разработки клеточных биотехнологий ООО «Стэмреновацио» биоматериал обрабатывали. Для проведения экспериментов по влиянию компонентов МСК на сохранность и поддержание качества спермы быков, клетки деконсервировали и культивировали в среде α MEM + 10 % FBS. Начиная с 3-го пассажа после размораживания, их использовали в работе. Для получения лизата МСК клетки культивировали в течение 96 ч до формирования 90-100%, снимали при помощи 0,05%-ного раствора трипсина в растворе Версена (ООО «НПП «Панэко», Россия), отмывали от диспергирующего раствора при помощи раствора PBS, считали в камере Горяева, готовили суспензию клеток в PBS с концентрацией МСК $2 \cdot 10^7$ кл/мл, фасовали в криопробирки по 100 мкл. Лизат МСК получали при помощи двукратной быстрой заморозки до -196°C — медленного оттаивания при комнатной температуре в течение 20 минут. Финальное оттаивание производили непосредственно перед добавлением к сперматозоидам.

Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы Stattech и Medstatistic «Медицинская Статистика» с вычислением показателей вариационного ряда. В связи с размером выборки проверка статистической гипотезы о различии опыта и контроля проводилась с помощью Т-критерия Вилкоксона для парных сравнений при помощи языка программирования R в среде разработки Rstudio (v. 2025.05.1+513).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Лизат мезенхимальных стволовых клеток (МСК) — это продукты разрушения МСК, содержащие их биологически ак-

тивные компоненты: белки, нуклеиновые кислоты, экзосомы, факторы роста и метаболиты. Они сохраняют терапевтический потенциал МСК, но при этом проще в производстве и хранении.

Результаты икубации образцов спермы с лизатом МСК (опытная группа) и фосфатно-буферном раствором (контрольная группа) представлены на рисунках 1 и 2.

Согласно данным рисунка 1, статистически значимая разница значений была зарегистрирована между контрольной и опытной группами при оценке количества нормальных сперматозоидов сразу после оттаивания ($p < 0,05$), а также спустя 4 часа инкубации ($p < 0,05$). При этом наибольшее количество морфологически нормальных сперматозоидов было зарегистрировано в опытной группе.

При анализе дефектов головки сперматозоидов статистически значимая разница была зарегистрирована спустя 0 часов инкубации ($p < 0,05$), при этом разница средних значений составила 1,4 раза с наибольшим количеством в контрольной группе. Данная тенденция наблюдалась также при анализе дефектов хвоста на 2-й и 4-й часы инкубации ($p < 0,05$), где разница средних значений составила 1,2 раза.

Таким образом, четырехчасовая инкубации сперматозоидов после оттаивания в средах, содержащих лизат МСК способствует сохранению наибольшего количества морфологически нормальных сперматозоидов с наименьшей встречаемостью дефектов головки и хвоста.

Результаты оценки подвижности сперматозоидов в процессе четырехчасовой инкубации в фосфатно-солевом буфере и средах, содержащих лизат МСК отражены на рисунке 2.

Согласно данным рисунка 2, статистически значимая разница значений была зафиксирована при анализе подвижности сперматозоидов на 4-й час инкубации, в частности — количество прогрессивно подвижных сперматозоидов было больше ($p < 0,05$) в опытной группе в среднем в 1,4 раза, неподвижных в контрольной группе ($p < 0,05$) — в 1,3 раза. Получен-

ные результаты указывают на преимущественное сохранение подвижности спер-

матозоидов при инкубации в средах, содержащих лизат МСК.

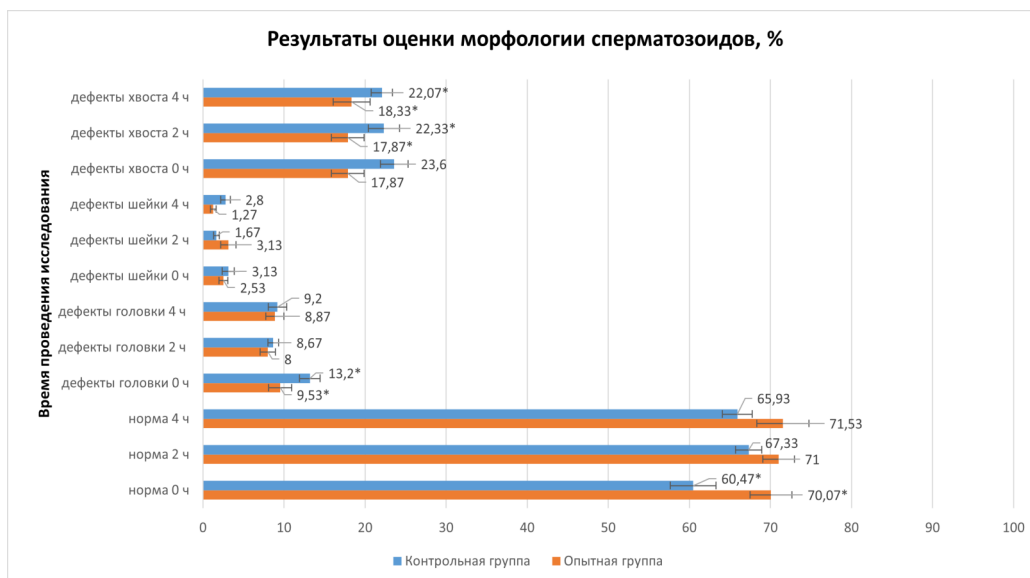


Рисунок 1 – Результаты оценки морфологии сперматозоидов быков-производителей в процессе четырехчасовой инкубации с лизатом МСК ($M \pm t$, $n=15$).
Примечание: * - p -value $< 0,05$.

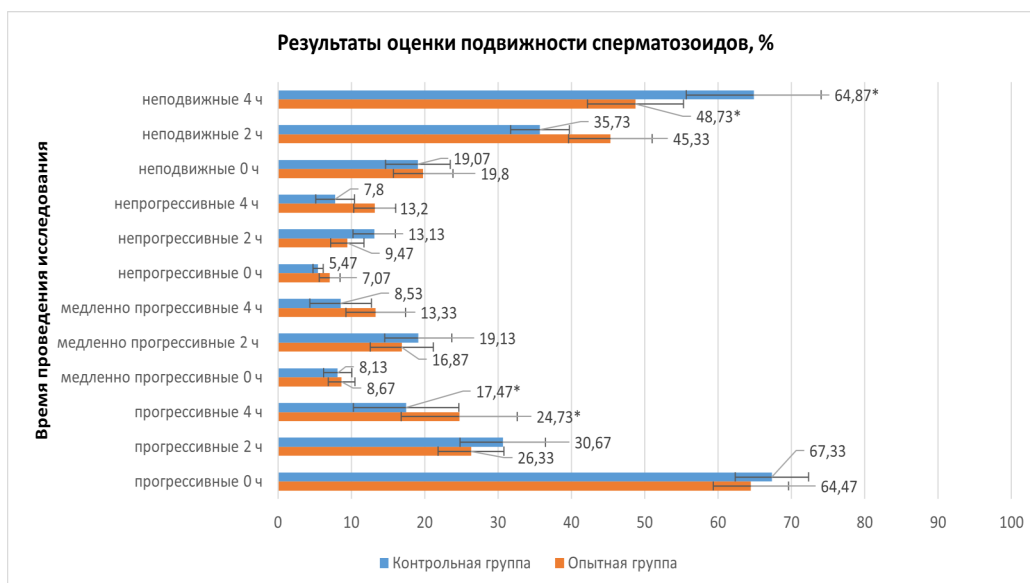


Рисунок 2 – Результаты оценки подвижности сперматозоидов быков-производителей в процессе четырехчасовой инкубации с лизатом МСК ($M \pm t$, $n=15$).
Примечание: * - p -value $< 0,05$.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Полученные данные определяют перспективность использования компонента МСК – лизата в качестве реабилитационной среды для сперматозоидов после оттаивания. Анализ литературных данных подтверждает свойства МСК в аспекте положительного воздействия на сперматозоиды. Так, МСК, трансплантированные в семенники животных с химической или хирургической моделью азооспермии, продемонстрировали способность индуцировать сперматогенез и/или дифференцироваться в половые клетки. Было показано несколько возможных механизмов восстановления функции семенников при МСК-индуцированной регенерации тканей: 1. участие МСК в подавлении антиспермальных антител (АСА) [2]; 2. снижение факторов, приводящих к бесплодию, за счет уменьшения апоптоза [5]; 3. снижение окислительного стресса [1] и стимуляция выработки тестостерона [6] с дифференцировкой в клетки Лейдига [10]; 4. взаимодействие МСК с эндогенными клетками, восстанавливая функцию поврежденных клеток [7].

Принимая во внимание полученные данные, среды, содержащие лизат МСК, можно рассматривать в качестве реабилитационных сред для сперматозоидов после оттаивания. Однако, для точного определения механизма воздействия необходимо продолжить исследования.

USE OF MESENCHYMAL STEM-CELL LYSATE AS A REHABILITATION MEDIUM FOR THAWED SPERM OF STUBBULLS

Korochkina E.A.* – PhD in Veterinary science, Associate Professor, Department of Genetic and Reproductive Technologies;
Belikova A.O. – postgraduate student;
Bachturina E.I. – student

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

*e.kora@mail.ru

ABSTRACT

Cryopreservation of gametes is an important component of assisted reproductive

technology programs. Considering the properties of mesenchymal stem cells (MSCs) and their derivatives, mainly regeneration (due to cytokines, growth factors, exosomes), the aim of this work was to study the use of MSC lysate as a rehabilitation medium for defrosted sperm of breeding bulls. Mesenchymal stem cell (MSC) lysate is a product of MSC destruction containing their biologically active components: proteins, nucleic acids, exosomes, growth factors and metabolites. After thawing, two groups of bull sperm samples were formed: control and experimental, 15 samples each. Samples of the experimental group were mixed with a medium containing MSC lysate, and those of the control group were mixed with phosphate-buffered saline (PBS) in a 1:1 ratio. Sperm quality parameters (motility, morphology) were assessed after 0, 2 and 4 hours of incubation. Due to the sample size, the statistical hypothesis about the difference between the experiment and the control was tested using the Wilcoxon t-test for paired. It was found that four-hour incubation of spermatozoa after thawing in media containing MSC lysate helps to preserve the greatest number of morphologically normal spermatozoa ($71.53 \pm 3.21\%$) with the lowest content of head ($8.87 \pm 1.10\%$) and tail ($18.33 \pm 2.27\%$) defects. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were found in the number of progressively motile and immobile spermatozoa at the 4th hour of incubation. The mean value of progressively motile spermatozoa was 1.4 times higher in the experimental group, and the mean number of immobile spermatozoa in the control group was 1.3 times higher. The obtained data prove the prospects of using the MSC component - lysate as a medium for spermatozoa rehabilitation after thawing. However, further research is needed to precisely determine the mechanism of action.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Abdelaziz MH, Salah El-Din EY, El-Dakdoky MH, Ahmed TA. The impact of mesenchymal stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity and progeny outcome of male prepubertal rats. Birth Defects

Res. 2019;111(13):906–19.

2. Aghamir SMK, Salavati A, Yousefie R, Tootian Z, Ghazaleh N, Jamali M, Azimi P. Does bone marrow-derived mesenchymal stem cell transfusion prevent antisperm antibody production after traumatic testis rupture? *Urology*. 2014;84(1):82–6.

3. Aitken, R. J., Baker, M. A. (2020). Oxidative stress and male reproductive health. *Reproduction*, 160(6), R91-R124.

4. Bailey, J. L., et al. (2003). Assessment of acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 60(1), 125-134.

5. Hsiao C-H, Ji AT-Q, Chang C-C, Cheng C-J, Lee L-M, Ho JH-C. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):113.

6. Kadam P, Ntemou E, Onofre J, Van Saen D, Goossens E. Does co-transplantation of mesenchymal and spermatogonial stem cells improve reproductive efficiency and safety in mice? *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):310.

7. Qian C, Meng Q, Lu J, Zhang L, Li H, Huang B. Human amnion mesenchymal stem cells restore spermatogenesis in mice with busulfan-induced testis toxicity by inhibiting apoptosis and oxidative stress. *Stem Cell Res Ther* 2020;11(1):1–12,

8. Thomson, L. K., et al. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24(9), 2061-2070.

9. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492.

10. Xing X, Zhang Z, Zhong L, Ju G, Zou X, Zhu Y, Sun J. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into steroidogenic cells in vitro. *ExpTherMed*. 2016;12(6):3527–34.

REFERENCES

1. Abdelaziz MH, Salah El-Din EY, El-Dakdoky MH, Ahmed TA. The impact of

mesenchymal stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity and progeny outcome of male prepubertal rats. *Birth Defects Res*. 2019;111(13):906–19.

2. Aghamir SMK, Salavati A, Yousefie R, Tootian Z, Ghazaleh N, Jamali M, Azimi P. Does bone marrow-derived mesenchymal stem cell transfusion prevent antisperm antibody production after traumatic testis rupture? *Urology*. 2014;84(1):82–6.

3. Aitken, R. J., Baker, M. A. (2020). Oxidative stress and male reproductive health. *Reproduction*, 160(6), R91-R124.

4. Bailey, J. L., et al. (2003). Assessment of acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 60(1), 125-134.

5. Hsiao C-H, Ji AT-Q, Chang C-C, Cheng C-J, Lee L-M, Ho JH-C. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):113.

6. Kadam P, Ntemou E, Onofre J, Van Saen D, Goossens E. Does co-transplantation of mesenchymal and spermatogonial stem cells improve reproductive efficiency and safety in mice? *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):310.

7. Qian C, Meng Q, Lu J, Zhang L, Li H, Huang B. Human amnion mesenchymal stem cells restore spermatogenesis in mice with busulfan-induced testis toxicity by inhibiting apoptosis and oxidative stress. *Stem Cell Res Ther* 2020;11(1):1–12.

8. Thomson, L. K., et al. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24(9), 2061-2070.

9. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492.

10. Xing X, Zhang Z, Zhong L, Ju G, Zou X, Zhu Y, Sun J. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into steroidogenic cells in vitro. *ExpTherMed*. 2016;12(6):3527–34.