

Научная статья/Research Article

УДК 576.362:636.082.453.52

DOI: 10.36718/1819-4036-2024-12-94-100

Елена Александровна Корочкина^{1✉}, Анна Валериевна Трифонова²,
Евгений Юрьевич Финагеев³, Варвара Сергеевна Пушкина⁴, Дарья Евгеньевна Главацкая⁵

^{1,3,4,5}Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²ООО «НС-Рабиес», Санкт-Петербург, Россия

¹e.kora@mail.ru

²trifonova@ns-rabies.ru

³finageeve.2016@yandex.ru

⁴pushkina_varechka@mail.ru

⁵dashaglava@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ЛИЗАТА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК) БАРАНОВ НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Цель исследования – изучение влияния лизата (КР) мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ) баранов на качественные показатели сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации. Было сформировано три группы проб по 10 образцов в каждой: контрольная (сперматозоиды $7 \cdot 10^{10}$ кл/мл + буфер PBS 100 мкл, pH – 7,4), первая опытная (сперматозоиды $7 \cdot 10^{10}$ кл/мл + лизат (КР) МСК КМ $2 \cdot 10^8$ кл/мл, pH – 7,2), вторая опытная (сперматозоиды $7 \cdot 10^{10}$ кл/мл + лизат (КР) МСК ЖТ $2 \cdot 10^8$ 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 четырехэтапная оценка качества спермы: 0; 1; 2 и 3 ч после инкубации спермы с лизатом мезенхимальных стволовых клеток при температуре 37 °С. Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации (0; 1; 2 и 3 ч) внутри каждой группы. Достоверными считались различия при $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$. Инкубация спермы баранов в средах, содержащих лизат мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани и костного мозга, в течение 3 ч при температуре 37 °С способствует достоверному сохранению жизнеспособности сперматозоидов с наличием следующих морфофункциональных характеристик: прогрессивность движения – $(43,10 \pm 6,86) \%$ ($p < 0,01$, КР МСК КМ), $(38,31 \pm 7,76) \%$ ($p < 0,01$, КР МСК ЖТ); количество нормальных сперматозоидов $(39,40 \pm 2,40) \%$ ($p < 0,01$, КР МСК ЖТ), количество сперматозоидов с дефектами головок: $(12,10 \pm 1,53) \%$ ($p < 0,01$, КР МСК КМ) и $(13,90 \pm 2,14) \%$ ($p \leq 0,05$, КР МСК ЖТ).

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

Для цитирования: Влияние лизата мезенхимальных стволовых клеток (МСК) баранов на качественные показатели сперматозоидов / Е.А. Корочкина [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 12. С. 94–100. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-12-94-100.

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-0015

Elena Alexandrovna Korochkina^{1✉}, Anna Valerievna Trifonova², Evgeniy Yurievich Finageev³,
Varvara Sergeevna Pushkina⁴, Daria Evgenievna Glavatskaya⁵

^{1,3,4,5}Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russia

²LLC NS-Rabies, Saint Petersburg, Russia

¹e.kora@mail.ru

²trifonova@ns-rabies.ru

³finageeve.2016@yandex.ru

⁴pushkina_varechka@mail.ru

⁵dashaglava@gmail.com

EFFECT OF RAM MESENCHYMAL STEM CELL (MSC) LYSATE ON SPERM QUALITY INDICATORS

The aim of the study was to investigate the effect of lysate (L) of mesenchymal stem cells (MSC) from adipose tissue (AT) and bone marrow (BM) of rams on the qualitative parameters of spermatozoa during three-hour incubation. Three groups of samples were formed with 10 samples in each: control (sperm $7 \cdot 10^{10}$ cells/ml + PBS buffer 100 μ l, pH – 7.4), the first experimental (sperm $7 \cdot 10^{10}$ cells/ml + lysate (L) of MSCs BM $2 \cdot 10^8$ cells/ml, pH – 7.2), the second experimental (sperm $7 \cdot 10^{10}$ cells/ml + lysate (L) of MSCs AT $2 \cdot 10^8$ cells/ml, pH – 7.2). In order to establish the degree of sperm survival in media containing mesenchymal stem cells and to determine their effect on sperm quality, a four-stage sperm quality assessment was performed: 0; 1; 2 and 3 h after sperm incubation with mesenchymal stem cell lysate at 37 °C. Values were compared at each incubation stage (0; 1; 2 and 3 h) within each group. Differences were considered reliable at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$. Incubation of ram sperm in media containing lysate-mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for 3 hours at a temperature of 37 °C contributes to reliable preservation of sperm viability with the following morphofunctional characteristics: progressiveness of movement – $(43.10 \pm 6.86) \%$ ($p < 0.01$, CR BM MSC), $(38.31 \pm 7.76) \%$ ($p < 0.01$, CR AT MSC); the number of normal spermatozoa was $(39.40 \pm 2.40) \%$ ($p < 0.01$, CR MSC AT), the number of spermatozoa with head defects was $(12.10 \pm 1.53) \%$ ($p < 0.01$, CR MSC BM) and $(13.90 \pm 2.14) \%$ ($p \leq 0.05$, CR MSC AT).

Keywords: sperm, stud rams, quality indicators, lysate, mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow

For citation: Effect of ram mesenchymal stem cell (MSC) lysate on sperm quality indicators / E.A. Korochkina [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(12): 94–100 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-12-94-100.

Acknowledgements: the study was supported by a grant from the Russian Science Foundation № 23-26-00157

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – самообновляющаяся мультипотентная популяция клеток взрослого организма. Согласно многочисленным исследованиям, сегодня они являются признанным инструментом регенеративной терапии в медицине и ветеринарии. Ранее предполагалось, что основным механизмом действия МСК является замещение дефектных или утраченных клеток путем дифференцировки и приживления в месте повреждения. Однако результаты исследований продемонстрировали недолгосрочное функционирование имплантированных клеток, что говорит о важности не самих клеток, как строительного материала ткани, а их регуляторных свойств. Попадая в место повреждения, МСК в ответ на внешние сигналы начинают синтез широкого спектра регуляторных молекул, которые как секретируются

вовне, так и высвобождаются при лизисе. Показано, что лизат МСК содержит широкий спектр интрацеллюлярных цитокинов. Сегодня лизат МСК исследователи рассматривают как альтернативный живым МСК эффективный способ лечения многих заболеваний [1]. Принимая во внимание результаты апробации МСК в андрологии, в частности как способа, повышающего качество спермы [2–5], актуальным является изучение влияния лизата МСК как бесклеточной альтернативы на качественные характеристики спермы самцов-производителей на примере баранов.

Цель исследования – изучение влияния лизата (КР) мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ) баранов на качественные показатели сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации.

Задачи: определить влияние лизата МСК на морфологическую структуру сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации; установить динамику кинематических показателей сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации в средах, содержащих лизат МСК.

Материалы и методы. Исследование было проведено в научно-образовательной лаборатории по трансплантации эмбрионов животных на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», а также на базе отдела разработки клеточных биотехнологий ООО «НС-Рабиес». Были проведены взятие и исследование спермы половозрелых баранов романовской породы ($n = 5$) и породы Дорпер ($n = 5$) 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 32222-2013 [6].

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 [7].

Исследование проводилось с помощью микроскопа Levenhuk MED 45T. Для подсчета концентрации сперматозоидов использовалась камера Горяева [7]. Оценка морфологии проводилась ручным способом (200 сперматозоидов в каждом образце), оценка подвижности сперматозоидов проводилась с использованием программы Аргус-CASA. Полученные образцы были разведены в соотношении 1 : 100. Оценка аликвоты спермы производилась под увеличением 10×10 с использованием камеры Маклера. При оценке подвижности учитывалось количество прогрессивнодвигающихся, непрогрессивнодвигающихся и неподвижных сперматозоидов. Для оценки морфологии использовалась окраска набором дифференцированного окрашивания Sperm Blue (Microptic) с предварительной фиксацией мазков (фиксатор 10 мин). Экспозиция мазка в красителе составила 18 мин. Далее была проведена микроскопия (увеличение с использованием объектива 100×10 , 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 баранов породы Дорпер ($n = 3$) в крестьянско-фермерском хозяйстве Ленинградской области. ЖТ (2 см^3) вырезали подкожно 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 см^3) 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 ч.

В лаборатории отдела разработки клеточных биотехнологий ООО «НС-Рабиес» биоматериал обрабатывали. Жировую ткань в условиях ламинарного бокса промывали буфером PBS, измельчали при помощи микроножниц и инкубировали 45 мин при 37 °С в 0,075 %-м растворе коллагеназы (тип 2) («ПанЭко», Россия) при постоянном помешивании. Полученную суспензию фильтровали, центрифугировали, полученный осадок разводили средой α MEM + 10 % FBS и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см^2 . 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, центрифугировали, полученный осадок еще два раза промывали описанным способом. Затем к осадку добавляли среду α MEM + 10 % FBS и высевали в культуральные флаконы площадью 25 см^2 . Через 24 ч среду заменяли и удаляли неприкрепленные клетки. Спустя 48 ч процедуру повторяли. Монослой МСК КМ формировался к 10-м сут после выделения.

В дальнейшем выделенные МСК пассировали для увеличения их количества. На втором пассаже клетки криоконсервировали и депонировали в криобанке.

Для проведения экспериментов по влиянию компонентов МСК на сохранность и поддержание качества спермы баранов клетки деконсервировали и культивировали в среде α MEM + 10 % FBS. Начиная с 3-го пассажа после размораживания, их использовали в работе.

Для приготовления лизата (КР) МСК отделяли от подложки, отмывали от ростовой среды и суспендировали в PBS с концентрацией $2 \cdot 10^8$ кл/мл. Затем суспензию аликвотировали и фасовали в пробирки Эппендорфа. Лизат полу-

чали методом криодеструкции путем двукратного быстрого погружения в жидкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) и медленного оттаивания при комнатной температуре. Полученный таким образом лизат содержал высвобожденные внутриклеточные белково-пептидные компоненты МСК и фрагменты клеточных мембран.

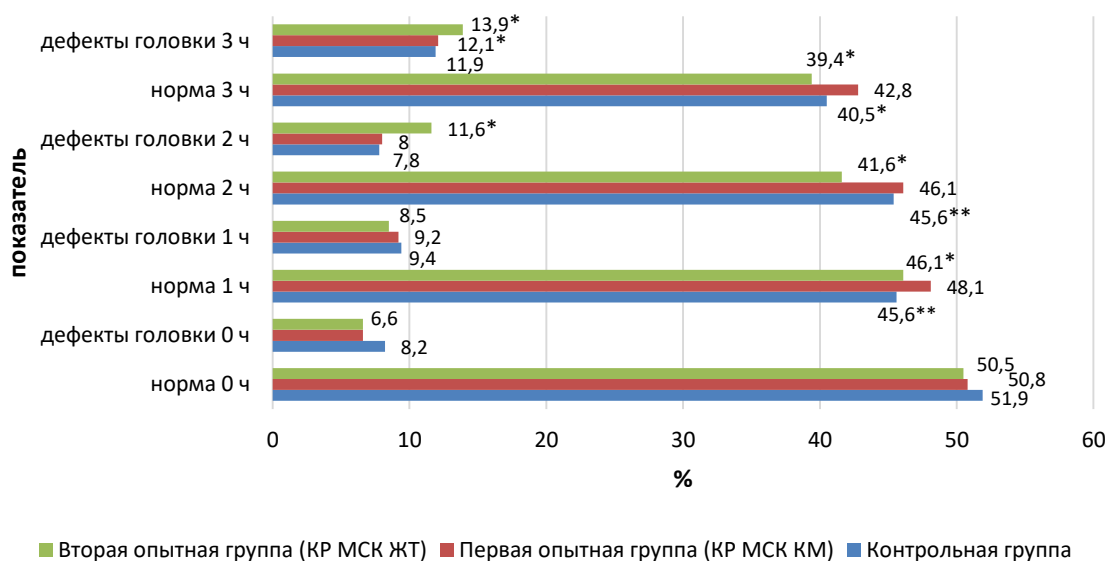
Было сформировано три группы проб по 10 образцов в каждой ($n = 10$): контрольная (сперматозоиды $7 \cdot 10^{10}$ кл/мл + буфер PBS 100 мкл, рН – 7,4), первая опытная (сперматозоиды $7 \cdot 10^{10}$ кл/мл + лизат (КР) МСК КМ $2 \cdot 10^8$ кл/мл, рН – 7,2), вторая опытная (сперматозоиды $7 \cdot 10^{10}$ кл/мл + лизат (КР) МСК ЖТ $2 \cdot 10^8$ кл/мл, рН – 7,2). С целью установления степени переживаемости сперматозоидов в средах, содержащих МСК, и определения их влияния на качественные показатели сперматозоидов была проведена четырехэтапная оценка качества спермы: 0, 1, 2 и 3 ч после инкубации спермы с лизатом мезенхимальных стволовых клеток при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Сравнение значений производилось на каждом этапе инкубации (0, 1, 2 и 3 ч)

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 и их обсуждение. Согласно ранее проведенным исследованиям, за основу был взят протокол использования мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга баранов и козлов в концентрации $2 \cdot 10^8$ кл/мл и сперматозоидов в концентрации $7 \cdot 10^{10}$ кл/мл [2].

Результаты влияния лизата мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга баранов на морфофункциональные характеристики сперматозоидов отражены на рисунках 1–3. При анализе результатов оценки морфологической структуры сперматозоидов, достоверные данные были получены среди значений морфологически нормальных сперматозоидов, а также сперматозоидов с дефектами головки (рис. 1).



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

Рис. 1. Результаты оценки морфологии сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с лизатом МСК (КР) ($M \pm m$, $n=10$).

Согласно данным рисунка 1, статистически значимое снижение количества нормальных сперматозоидов в процессе трехчасовой инкубации было зарегистрировано в контрольной и

второй опытной (КР МСК ЖТ) группах. При этом в течение 1-го ч инкубации разница значений в контрольной и второй опытной группах составила 6,3 % ($p \leq 0,05$) и 4,4 % ($p \leq 0,01$), в течение

2-го часа – 6,5 % ($p \leq 0,05$) и 8,9 % ($p \leq 0,01$), в течение 3-го часа – 11,4 % ($p \leq 0,01$) и 11,1 % ($p \leq 0,01$) по сравнению с показателями 0 часов инкубации. Что касается наличия дефектов в морфологической структуре сперматозоидов, то достоверная разница значений была определена в контрольной группе: увеличение количества сперматозоидов с дефектами хвоста на 8,6 % ($p \leq 0,01$) в процессе двухчасовой инкубации. Данная закономерность наблюдалась также в первой опытной группе (КР МСК КМ): увеличение количества сперматозоидов с дефектами головки в процессе 3-часовой инкубации на 5,5 % ($p \leq 0,01$); во второй опытной группе

(КР МСК ЖТ): увеличение количества сперматозоидов с дефектами головки в процессе 2- и 3-часовой инкубации на 5,0 и 7,3 % ($p \leq 0,01$) соответственно. Таким образом, наиболее выраженное сокращение количества нормальных сперматозоидов и увеличение количества сперматозоидов с дефектами головки отмечаются в контрольной группе. Тенденция к сохранению морфологической целостности сперматозоидов наблюдается во второй опытной группе, при инкубации сперматозоидов с лизатом мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани.

Результаты двигательной активности сперматозоидов отражены на рисунке 2.

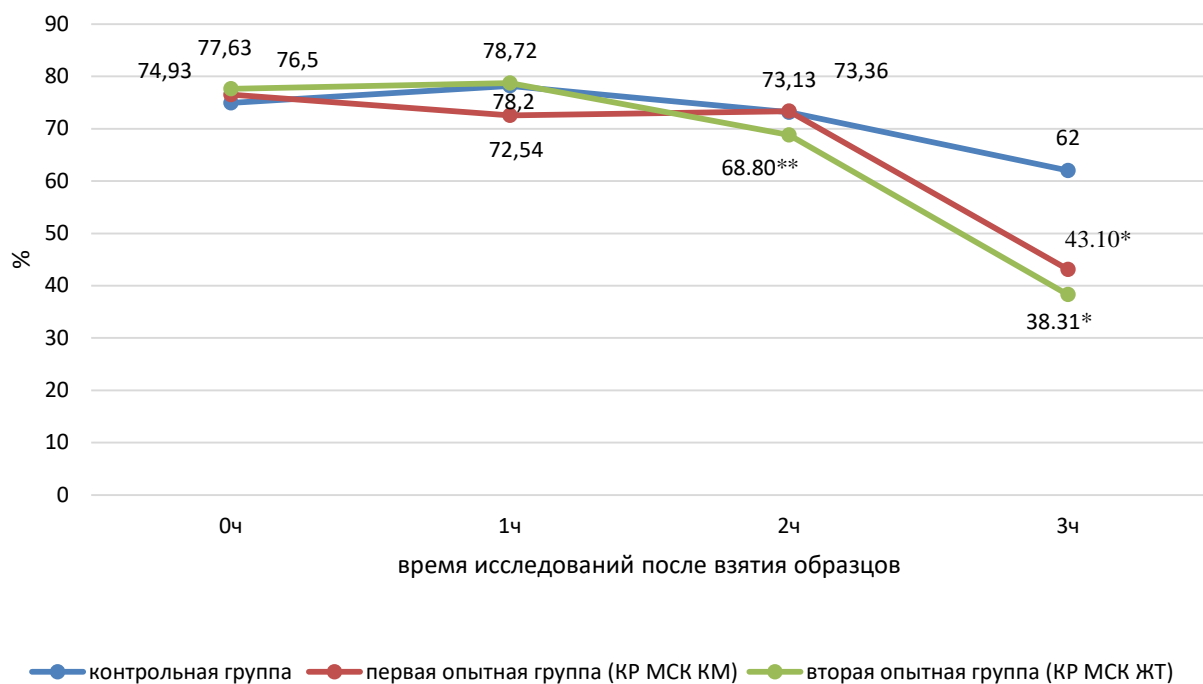


Рис. 2. Динамика прогрессивности движений сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с лизатом МСК (КР) ($M \pm m$, $n=10$)

Согласно данным рисунка 2, статистически значимое уменьшение количества прогрессивно двигающихся сперматозоидов было зарегистрировано в первой и второй опытных группах в течение 2 и 3 ч инкубации. При этом разница значений в первой опытной группе на 3-й час инкубации составила 1,7 раза ($p < 0,01$); во второй опытной группе – 2,1 раз ($p < 0,01$). Количество прогрессивно двигающихся сперматозоидов во время двухчасовой инкубации с лизатом МСК из жировой ткани было достоверно уменьшено ($p \leq 0,05$) и составляло ($68,80 \pm 3,30$) %.

Было зарегистрировано уменьшение количества непрогрессивных сперматозоидов и увеличение количества неподвижных во всех исследуемых группах в течение 2 и 3 ч инкубации (рис. 3). При этом разница значений непрогрессивно двигающихся сперматозоидов в контрольной группе составила 2,1 и 4,6 раза ($p < 0,01$); в первой опытной группе (КР МСК КМ) – 4,5 и 9,3 раза ($p < 0,01$); во второй опытной группе (КР МСК ЖТ) – 3,7 и 11,4 раза ($p < 0,01$) по сравнению с результатами 0 часов инкубации.

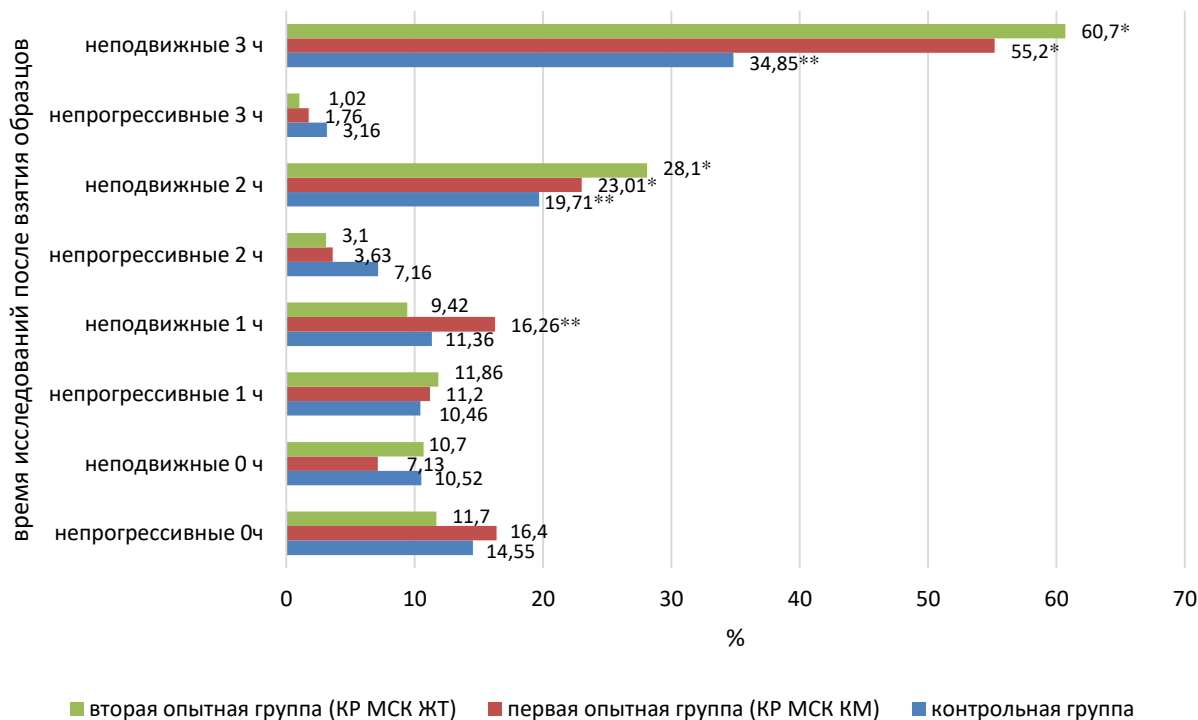


Рис. 3. Динамика количества непрогрессивных и неподвижных сперматозоидов баранов в процессе трехчасовой инкубации с лизатом МСК (КР) ($M \pm m$, $n=10$)

Согласно данным рисунка 3, статистически значимое увеличение количества неподвижных сперматозоидов отмечалось в контрольной группе на 9,19 % и на 24,33 % ($p \leq 0,05$) 2 и 3 часа инкубации, в первой опытной группе (КР МСК КМ) на 9,13 % ($p \leq 0,05$), на 15,8 и 48,1 % ($p < 0,01$) 1, 2 и 3 часа инкубации, а также во второй опытной группе (КР МСК ЖТ) на 17,43 и 50,0 % ($p < 0,01$) 2 и 3 ч инкубации по сравнению с данными 0 часов инкубации.

Заключение. Исходя из полученных данных, инкубация спермы баранов в средах, содержащих компонент мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга – лизат, в течение 3 ч при температуре 37 °С способствует достоверному сохранению жизнеспособности сперматозоидов с наличием следующих морфофункциональных характеристик: прогрессивность движения – ($43,10 \pm 6,86$) % ($p < 0,01$, КР МСК КМ), ($38,31 \pm 7,76$) % ($p < 0,01$, КР МСК ЖТ); количество нормальных сперматозоидов ($39,40 \pm 2,40$) % ($p < 0,01$, КР МСК ЖТ); количество сперматозоидов с дефектами головок: ($12,10 \pm 1,53$) % ($p < 0,01$, КР МСК КМ) и ($13,90 \pm 2,14$) % ($p \leq 0,05$, КР МСК ЖТ).

Необходимо продолжить исследования с целью использования лизата мезенхимальных

стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга в рамках оптимизации протоколов криоконсервации спермы баранов-производителей.

Список источников

1. Malik S., Malik T. Mesenchymal stem cells lysate as a cell-free therapy: a review // Current biotechnology. 2021. 10 (2). P. 78–87.
2. Влияние МСК из жировой ткани и костного мозга баранов на качественные показатели их сперматозоидов / Е.А. Корочкина [и др.] // Ветеринария. 2024. № 1. С. 34–38.
3. Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermic hamster / N. Karimaghaj [et al.] // Iran. J. Basic Med. Sci. 2018. T. 21, № 7. С. 660–667. DOI: 10.22038/ijbms.2018.29040.7010.
4. Tamadon, Amin & Zhan-byrbekuly, Ulanbek & Kairgaliyev, Ilyas & Khoradmehr, Arezoo. (2019). Mesenchymal Stem Cell Therapy of Male Infertility. DOI: 10.5772/intechopen.88343.
5. Qamar, Ahmad & Fang, Xun & Kim, Min Jung & Cho, Jongki. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells // Scientific

- Reports. 2020. 10. DOI: 10.1038/s41598-020-61803-8.
- ГОСТ 32222–2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. М.: Стандарт информ, 2018. 10 с.
 - Баженова Н.Б., Племяшов К.В., Корочкина Е.А. Оценка качественных показателей спермы животных: учебно-методическое пособие. СПб.: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. 25 с.
 - busulfan-induced azoospermic hamster / N. Karimaghai [et al.] // Iran. J. Basic Med. Sci. 2018. Т. 21, № 7. S. 660–667. DOI: 10.22038/ijbms.2018.29040.7010.
 - Tamadon, Amin & Zhan-byrbekuly, Ulanbek & Kairgaliyev, Ilyas & Khoradmehr, Arezoo. (2019). Mesenchymal Stem Cell Therapy of Male Infertility. DOI: 10.5772/intechopen.88343.
 - Qamar, Ahmad & Fang, Xun & Kim, Min Jung & Cho, Jongki. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells // Scientific Reports. 2020. 10. DOI: 10.1038/s41598-020-61803-8.
 - GOST 32222-2013. Sredstva vosproizvodstva. Sperma. Metody otbora prob. M.: Standart inform, 2018. 10 s.
 - Bazhenova N.B., Plemyashov K.V., Korochkina E.A. Ocenka kachestvennyh pokazatelej spermy zhivotnyh: uchebno-metodicheskoe posobie. SPb.: Sankt-Peterburgskij gosudarstvennyj universitet veterinarnoj mediciny, 2023. 25 s.

References

- Malik S., Malik T. Mesenchymal stem cells lysate as a cell-free therapy: a review // Current biotechnology. 2021. 10 (2). P. 78–87.
- Vliyanie MSK iz zhirovoj tkani i kostnogo mozga baranov na kachestvennye pokazateli ih spermatozoidov / E.A. Korochkina [i dr.] // Veterinariya. 2024. № 1. S. 34–38.
- Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stemcells in

Статья принята к публикации 31.10.2024 / The article accepted for publication 31.10.2024.

Информация об авторах:

Елена Александровна Корочкина¹, доцент кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий, доктор ветеринарных наук

Анна Валериевна Трифонова², ведущий специалист, кандидат биологических наук

Евгений Юрьевич Финагеев³, ассистент кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий, кандидат ветеринарных наук

Варвара Сергеевна Пушкина⁴, студентка 5-го курса

Дарья Евгеньевна Главацкая⁵, студентка 5-го курса

Information about the authors:

Elena Alexandrovna Korochkina¹, Associate Professor at the Department of Genetic and Reproductive Biotechnology, Doctor of Veterinary Sciences

Anna Valerievna Trifonova², Leading Specialist, Candidate of Biological Sciences

Evgeniy Yurievich Finageev³, Assistant at the Department of Genetic and Reproductive Biotechnology, Candidate of Veterinary Sciences

Varvara Sergeevna Pushkina⁴, 5th year student

Daria Evgenievna Glavatskaya⁵, 5th year student

