



## ЗООТЕХНИЯ И ВЕТЕРИНАРИЯ

Научная статья/Research Article

УДК 57.013:612.1

DOI: 10.36718/1819-4036-2024-5-116-122

**Марина Николаевна Иващенко<sup>1✉</sup>, Анна Вячеславовна Дерюгина<sup>2</sup>,  
Михаил Иванович Латушко<sup>3</sup>, Андрей Александрович Белов<sup>4</sup>, Анатолий Петрович Еремин<sup>5</sup>**

<sup>1,4,5</sup>Нижегородский государственный агротехнологический университет, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

<sup>3</sup>Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова», Екатеринбург, Россия

<sup>1</sup>kafedra2577@mail.ru

<sup>2</sup>derugina69@yandex.ru

<sup>3</sup>ancord.m@yandex.ru

<sup>4</sup>andrey.raven@gmail.com

<sup>5</sup>erapnn@yandex.ru

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

*Цель исследования – анализ влияния цикла замораживания и оттаивания на морфофункциональные параметры сперматозоидов быков. Исследование проведено в ООО «Нижегородское» по племенной работе Кстовского муниципального района Нижегородской области, на базе кафедры физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского и кафедры физиологии, биохимии животных и акушерства Нижегородского ГАТУ. Объект исследования – спермопродукция черно-пестрых быков. Сперму разбавляли стерильной средой BioXcell. Исследовали нативную разбавленную сперму и сперму после глубокой заморозки. Анализировали подвижность, среднюю скорость движения сперматозоидов на спермоанализаторе SA-500 фирмы «Биола» (Россия). Для оценки ультраструктуры сперматозоидов использовали электронный микроскоп Hitachi SU8220 (Япония). На лазерном интерференционном микроскопе МИМ-340 (Россия, Екатеринбург) в режиме реального времени без фиксации и окрашивания исследовали морфологию сперматозоидов. После криоконсервации семени отмечалось снижение биологической полноценности сперматозоидов, что подтверждается уменьшением подвижности на 13,77 % ( $p \leq 0,05$ ) и средней скорости движения сперматозоидов на 12,95 % ( $p \leq 0,05$ ). Методами электронной и лазерной интерференционной микроскопии показано, что хроматин оттаянных сперматозоидов был недостаточно конденсированный, содержал фибриллы. После криоконсервации у 6,23 % ( $p \leq 0,05$ ) сперматозоидов было изменено положение акросомы, у 18,64 % ( $p \leq 0,05$ ) клеток была изменена форма акросомы. После замораживания и оттаивания у 7,01 % спермиев отмечено уменьшение длины головки, у 17,90 % – уменьшение длины тела, у 9,53 % – уменьшение длины хвоста.*

© Иващенко М.Н., Дерюгина А.В., Латушко М.И., Белов А.А., Еремин А.П., 2024

Вестник КрасГАУ. 2024. № 5. С. 116–122.

Bulliten KrasSAU. 2024;(5):116–122.

ста сперматозоидов. Применение современных методов оценки жизнеспособности сперматозоидов имеет большое значение для понимания процессов, происходящих при криоконсервации семени, и позволяет разработать способы повышения качества спермы при замораживании и оттаивании.

**Ключевые слова:** сперматозоиды, быки, криоконсервация, электронная микроскопия, лазерная интерференционная микроскопия, подвижность сперматозоидов

**Для цитирования:** Морфологические и функциональные показатели сперматозоидов быков при криоконсервации / М.Н. Иващенко [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 5. С. 116–122. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-5-116-122.

**Благодарности:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00205.

**Marina Nikolaevna Ivashchenko**<sup>1✉</sup>, **Anna Vyacheslavovna Deryugina**<sup>2</sup>,

**Mikhail Ivanovich Latushko**<sup>3</sup>, **Andrey Alexandrovich Belov**<sup>4</sup>, **Anatoly Petrovich Eremin**<sup>5</sup>

<sup>1,4,5</sup>Nizhny Novgorod State Agrotechnological University, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>2</sup>National Research Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>3</sup>Production Association Ural Optical-Mechanical Plant named after E.S. Yalamov, Ekaterinburg, Russia

<sup>1</sup>kafedra2577@mail.ru

<sup>2</sup>derugina69@yandex.ru

<sup>3</sup>ancord.m@yandex.ru

<sup>4</sup>andrey.raven@gmail.com

<sup>5</sup>erapnn@yandex.ru

## **BULL SPERM MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL INDICATORS DURING CRYOPRESERVATION**

*The purpose of the study is to analyze the influence of the freezing and thawing cycle on the morphofunctional parameters of bull sperm. The study was conducted at Nizhegorodskoe LLC on breeding work in the Kstov municipal District of the Nizhny Novgorod Region, on the basis of the Department of Physiology and Anatomy of the Institute of Biology and Biomedicine of the Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky and the Department of Physiology, Animal Biochemistry and Obstetrics of Nizhny Novgorod State Technical University. The object of the study is the sperm production of black-and-white bulls. Semen was diluted with sterile BioXcell medium. Native diluted sperm and sperm after deep freezing were studied. Motility and the average speed of sperm movement were analyzed on a sperm analyzer SA-500 from Biola (Russia). To assess the ultrastructure of spermatozoa, a Hitachi SU8220 electron microscope (Japan) was used. Using a laser interference microscope MIM-340 (Russia, Yekaterinburg), the morphology of spermatozoa was studied in real time without fixation or staining. After cryopreservation of the sperm, there was a decrease in the biological usefulness of sperm, which is confirmed by a decrease in motility by 13.77% ( $p \leq 0.05$ ) and the average speed of sperm movement by 12.95% ( $p \leq 0.05$ ). Using electron and laser interference microscopy, it was shown that the chromatin of thawed spermatozoa was insufficiently condensed and contained fibrils. After cryopreservation, the position of the acrosome was changed in 6.23% ( $p \leq 0.05$ ) of sperm, and the shape of the acrosome was changed in 18.64% ( $p \leq 0.05$ ) of cells. After freezing and thawing, 7.01% of sperm showed a decrease in head length, 17.90% - a decrease in body length, and 9.53% - a decrease in sperm tail length. The use of modern methods for assessing sperm viability is of great importance for understanding the processes occurring during sperm cryopreservation and allows us to develop ways to improve the quality of sperm during freezing and thawing.*

**Keywords:** sperm, bulls, cryopreservation, electron microscopy, laser interference microscopy, sperm motility

**For citation:** Bull sperm morphological and functional indicators during cryopreservation / M.N. Ivashchenko [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(5): 116–122 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-5-116-122.

**Acknowledgments:** the research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-26-00205.

**Введение.** В практике воспроизводства крупного рогатого скота важным моментом является период хранения спермы, поскольку этого требуют различные технологические операции. Известным способом хранения спермы является ее криоконсервация [1].

Криоконсервация спермы имеет большое значение для животноводства, поскольку она ускоряет распространение генетического разнообразия. При низких температурах сперматозоиды имеют низкий метаболизм и могут сохраняться продолжительное время в соответствующих разбавителях спермы [2, 3].

Однако криоконсервация значительно снижает качество сперматозоидов. Основные структурные повреждения сперматозоидов связаны с процедурой замораживания и последующего оттаивания, спровоцированы фазовым переходом воды в лед и обратно [4–6]. В процессе криоконсервации меняются структура, функции мембраны. Деструктивные изменения в мембранах в свою очередь приводят к нарушению внутриклеточной компартментации веществ [7].

Используемые к настоящему времени в скотоводстве основные показатели биологической полноценности сперматозоидов (концентрация, подвижность, микробиологический анализ) косвенно оценивают их фертильность. Более подробное представление о морфологическом и генетическом потенциале сперматозоидов можно получить благодаря применению современных методов молекулярной и клеточной биологии.

**Цель исследования** – анализ влияния цикла замораживания и оттаивания на морфофункциональные параметры сперматозоидов быков.

**Задачи:** оценить влияние криоконсервации на морфологию и функции сперматозоидов; современными методами микроскопии (электронной и лазерной интерференционной) определить качественные показатели нативных и оттаянных сперматозоидов.

**Объекты и методы.** Исследования проводили *in vitro* на базе лаборатории в ООО «Нижегородское» по племенной работе (Кстовский муниципальный район Нижегородской области), на базе кафедры физиологии, биохимии и акушер-

ства Нижегородского ГАТУ и кафедры физиологии и анатомии ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Объектом исследования служила спермопродукция черно-пестрых быков. Сбор спермы проводили в соответствии с Национальной технологией замораживания и использования спермы племенных быков-производителей. Были использованы эякуляты быков в возрасте 3 лет. Использовали свежеполученное семя с подвижностью сперматозоидов более 7 баллов, минимальным количеством аномальных клеток [8].

Сперму разбавляли стерильной средой BioXcell (Франция). Исследовали нативную разбавленную разбавителем BioXcell сперму (группа I), сперму после глубокой заморозки (группа II). Заморозку проводили в открытых гранулах. Сперматозоиды замораживали в течение 7,5 мин до температуры  $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем контейнер с образцами помещали в жидкий азот ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Подвижность, среднюю скорость движения сперматозоидов оценивали на спермоанализаторе SA-500 фирмы «Биола» (Россия).

Для оценки ультраструктуры сперматозоидов было проведено электронно-микроскопическое исследование. Эякулят фиксировали 2,5 % раствором глутарового альдегида и 1 % осмиевой кислотой и заливали в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе Hitachi SU8220 (Япония). При электронно-микроскопическом исследовании сперматозоидов проводили анализ формы ядра, состояния хроматина, положения и формы акросомы.

Методом лазерной интерференционной микроскопии исследовали морфологию сперматозоидов. Достоинством метода является отсутствие фиксации, окрашивания, обработки контрастирующими веществами, которые могут приводить к изменениям объекта исследования [9]. Лазерную интерференционную микроскопию сперматозоидов проводили на лазерном интерференционном микроскопе МИМ-340 (Россия, Екатеринбург), используя лазер с длиной волны 650 нм и объектив с увеличением 30 $\times$ . Для захвата изображений применяли видеокамеру VS-415U (НПК Videoscan, Россия) с разрешением 782 $\times$ 582 пикселей. Реконструкцию фазового изображения из интерферограмм осуществляли

методом фазовых шагов в программе WinPhast, для последующей работы с изображениями использовали программу FIJI (США) и Microcal Origin (Microcal Inc., США).

Полученные данные обрабатывали с помощью программы MS Excel. Обработка результатов проводилась по параметрическому t-критерию Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ подвижности сперматозоидов в свежеполученном и замороженном семени быков выявил значительные различия по этому показателю (табл. 1).

После криоконсервации подвижность сперматозоидов уменьшилась на 13,77 % ( $p \leq 0,05$ ).

В процессе замораживания-оттаивания на 12,95 % снизилась средняя скорость движения сперматозоидов с  $85,62 \pm 3,54$  до  $74,53 \pm 2,48$  % ( $p \leq 0,05$ ).

Подвижность, средняя скорость движения сперматозоидов не всегда являются показателем фертильности, целостности ДНК. Разработка и применение новых методов оценки качества и жизнеспособности сперматозоидов позволит провести оценку морфологических нарушений спермиев, определить их причины и повысить показатели оплодотворяющей способности [10, 11].

Таблица 1

**Фертильные показатели сперматозоидов быков и их ультраструктура**

Показатель, %	Нативные сперматозоиды	Оттаянные сперматозоиды
Подвижность	82,51±5,95	71,15±4,34*
Средняя скорость движения	85,62±3,54	74,53±2,48*
Форма ядра – нормальная	95,57±2,29	94,85±2,67
Хроматин конденсированный	94,74±4,06	85,21±4,39*
Положение акросомы – нормальное	97,32±3,41	91,24±2,39*
Форма акросомы – нормальная	90,24±2,24	81,36±2,19*

Здесь и далее: среднее ± SEM, «\*» – статистически значимые различия по отношению к нативным сперматозоидам,  $p \leq 0,05$ .

Провести оценку состояния клеточных оргanelл сперматозоида позволяет количественное электронно-микроскопическое исследование. Изучение сперматозоидов электронно-микроскопическим методом показало, что хроматин нативных сперматозоидов зрелый. После криоконсервации хроматин был недостаточно конденсированный, содержащий фибриллы [11]. В процессе замораживания-оттаивания во всех группах отмечалось снижение доли сперматозоидов с интактными акросомами. Известно, что акросома насыщена водой, что является причиной ее высокой чувствительности к замораживанию. Целостность акросомы, показатель интактности, имеет большое значение для оплодотворения и последующего проникновения сперматозоидов в прозрачную зону. У 6,23 % оттаянных сперматозоидов было измененное положение акросомы, у 18,64 % сперматозоидов была изменена форма акросомы. Нарушение положения и формы акросомы ассоциированы с нарушением подвижности [12].

Электронно-микроскопическое исследование ядра показало, что воздействие криоконсервации на ядро сперматозоидов было минимальным.

Так как окрашивание сперматозоидов при использовании стандартных методов микроскопии может повлиять на их жизнеспособность, следующим этапом исследования было установление размеров сперматозоидов методом лазерной интерференционной микроскопии. Метод основан на анализе изменения показателя преломления клеточных структур. Главным преимуществом метода является возможность исследования интактных, нативных клеток без применения красителей, использование которых может привести к дополнительному нежелательному воздействию на исследуемые биологические объекты.

Размеры сперматозоидов влияют не только на скорость движения спермиев, но и на оплодотворяющую способность. Установили, что длина головки нативных спермиев составляла  $9,53 \pm 0,62$  мкм; шейки –  $1,42 \pm 0,21$ ; тела –  $12,57 \pm 1,91$ , хвоста –  $46,82 \pm 5,25$  мкм (табл. 2).

## Размеры сперматозоидов быков, мкм

Показатель	Нативные сперматозоиды	Оттаянные сперматозоиды
Длина головки спермия	9,53±0,62	8,32±0,55*
Ширина головки спермия	4,82±0,21	4,71±0,32
Длина шейки спермия	1,42±0,21	1,38±0,36
Длина тела спермия	12,57±1,91	10,32±2,13*
Длина хвоста спермия	46,82±5,25	42,36±4,35*

После криоконсервации у 7,01 % спермиев показано уменьшение длины головки, у 17,90 % – уменьшение длины тела, у 9,53 % – уменьшение длины хвоста ( $p \leq 0,05$ ). Изменение размеров сперматозоидов, вероятно, обусловлено осмотическим, тепловым шоком, потерей клеткой жидкости, окислительным стрессом, которые изменяют конфигурацию липидов и белков мембраны и снижают жизнеспособность клеток. У оттаянных сперматозоидов отмечен свернутый хвост, что подтверждает низкую подвижность сперматозоидов, и повышено содержание спермиев с аномальной акросомой, которая играет решающую роль в процессе проникновения сперматозоидов в яйцеклетку.

**Заключение.** Таким образом, проведенное исследование показало, что процесс замораживания и оттаивания семени быков вызывает морфологические и функциональные повреждения сперматозоидов, приводящие к снижению качества спермы. Показатели, получаемые стандартными методами определения морфофункциональных параметров сперматозоидов, не всегда соответствуют высокой оплодотворяющей способности спермы. Поэтому важно использовать методы оценки спермы, которые гарантированно позволят отобрать функционально активные сперматозоиды.

Применение методов оптической микроскопии, обладающих сверхразрешением, позволило получить новые данные о молекулярной активности сперматозоидов после размораживания. Полученные с помощью лазерной интерференционной микроскопии данные позволили определить влияние криоконсервации на сперматозоиды в режиме реального времени без

фиксации и окрашивания клеток. Исследование сперматозоидов методом электронной сканирующей микроскопии с высокой точностью дало возможность определить основные морфологические параметры клеток.

Внедрение в практику животноводства современных методов оценки качества сперматозоидов имеет большое значение для понимания процессов, происходящих при криоконсервации семени, улучшения криовыживаемости сперматозоидов, а также разработки тестов, определяющих оплодотворяющую способность сперматозоидов.

## Список источников

1. Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon // *J Androl.* 2000. № 21. P. 1–7.
2. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Лодяной М.С. Оценка резистентности мембран сперматозоидов быков в процессе долгосрочного хранения // *Естественные и технические науки.* 2022. № 1. С. 107–109.
3. Обеспечение эпизоотического благополучия на племенном предприятии по получению спермы от быков-производителей / М.А. Сушкова [и др.] // *Вестник КрасГАУ.* 2022. № 5. С. 148–154. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-5-148-154.
4. Reliable single sperm cryopreservation in Cell Sleepers for azoospermia management / K. Coetzee [et al.] // *Andrologia.* 2016. № 48. P. 203–210. DOI: 10.1111/and.12434.

5. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa / Y. Endo [et al.] // *Reprod Biomed Online*. 2012. № 24. P. 301–307. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.11.016.
6. Evenson D., Darzynkiewicz Z., Melamed M. Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility // *Science*. 1980. № 210. P. 1131–1133.
7. Baust J.G., Gao D., Baust J.M. Cryopreservation: an emerging paradigm change // *Organogenesis*. 2009. № 5. P. 90–96. DOI: 10.4161/org.5.3.10021.
8. Национальная технология замораживания и использования спермы племенных быков-производителей / под ред. А.И. Абилова, Н.М. Решетниковой. М., 2008. 160 с.
9. Дерюгина А.В., Игнатъев П.С., Иващенко М.Н. Эритроцит и интерференционная микроскопия. Н. Новгород, 2019. 87 с.
10. Каряка В.В. Оценка воспроизводительных особенностей хряков и свиноматок современных генотипов в программах гибридизации // *Молодой ученый*. 2015. № 5.2 (85.2). С. 11–14. URL: <https://moluch.ru/archive/85/16126> (дата обращения: 20.09.2023).
11. Agarwal A., Varghese A.C., Sharma R.K. Markers of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Integrity. *Methods in Molecular Biology // Methods and Protocols*. 2009. Vol. 590. P. 377–402.
12. Tesarik J. Acrosome reaction testing // Report of the consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. ESHRE, Andrology Special Interest Group Hum. Reprod. 1996. Vol. 11. P. 1463–1479.
3. Obespechenie `epizooticheskogo blagopoluchiya na plemennom predpriyatii po polucheniyu spermy ot bykov-proizvoditelej / M.A. Sushkova [i dr.] // *Vestnik KrasGAU*. 2022. № 5. S. 148–154. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-5-148-154.
4. Reliable single sperm cryopreservation in Cell Sleepers for azoospermia management / K. Coetzee [et al.] // *Andrologia*. 2016. № 48. P. 203–210. DOI: 10.1111/and.12434.
5. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa / Y. Endo [et al.] // *Reprod Biomed Online*. 2012. № 24. P. 301–307. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.11.016.
6. Evenson D., Darzynkiewicz Z., Melamed M. Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility // *Science*. 1980. № 210. P. 1131–1133.
7. Baust J.G., Gao D., Baust J.M. Cryopreservation: an emerging paradigm change // *Organogenesis*. 2009. № 5. P. 90–96. DOI: 10.4161/org.5.3.10021.
8. Nacional'naya tehnologiya zamorazhivaniya i ispol'zovaniya spermy plemennyh bykov-proizvoditelej / pod red. A.I. Abilova, N.M. Reshetnikovoj. M., 2008. 160 s.
9. Deryugina A.V., Ignat'ev P.S., Ivaschenko M.N. `Eritroцит i interferencionnaya mikroskopiya. N. Novgorod, 2019. 87 s.
10. Karyaka V.V. Ocenka vosproizvoditel'nyh osobennostej hryakov i svinomatok sovremennyh genotipov v programmah gibrizacii // *Molodoj uchenyj*. 2015. № 5.2 (85.2). S. 11–14. URL: <https://moluch.ru/archive/85/16126> (data obrascheniya: 20.09.2023).
11. Agarwal A., Varghese A.C., Sharma R.K. Markers of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Integrity. *Methods in Molecular Biology // Methods and Protocols*. 2009. Vol. 590. P. 377–402.
12. Tesarik J. Acrosome reaction testing // Report of the consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. ESHRE, Andrology Special Interest Group Hum. Reprod. 1996. Vol. 11. P. 1463–1479.

### References

1. Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon // *J Androl*. 2000. № 21. P. 1–7.
2. Deryugina A.V., Ivaschenko M.N., Lodyanov M.S. Ocenka rezistentnosti membran spermatozoidov bykov v processe dolgosrochnogo hraneniya // *Estestvennye i tehicheskie nauki*. 2022. №. 1. S. 107–109.
1. Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon // *J Androl*. 2000. № 21. P. 1–7.
2. Deryugina A.V., Ivaschenko M.N., Lodyanov M.S. Ocenka rezistentnosti membran spermatozoidov bykov v processe dolgosrochnogo hraneniya // *Estestvennye i tehicheskie nauki*. 2022. №. 1. S. 107–109.

Статья принята к публикации 10.04.2024 / The article accepted for publication 10.04.2024.

Информация об авторах:

**Марина Николаевна Иващенко**<sup>1</sup>, заведующая кафедрой физиологии, биохимии животных и акушерства, кандидат биологических наук, доцент

**Анна Вячеславовна Дерюгина**<sup>2</sup>, заведующая кафедрой физиологии и анатомии, доктор биологических наук, доцент

**Михаил Иванович Латушко**<sup>3</sup>, научный сотрудник отделения микроскопии, кандидат технологических наук

**Андрей Александрович Белов**<sup>4</sup>, доцент кафедры физиологии, биохимии животных и акушерства, кандидат биологических наук, доцент

**Анатолий Петрович Еремин**<sup>5</sup>, доцент кафедры физиологии, биохимии животных и акушерства, кандидат ветеринарных наук, доцент

Information about the authors:

**Marina Nikolaevna Ivashchenko**<sup>1</sup>, Head of the Department of Physiology, Animal Biochemistry and Obstetrics, Candidate of Biological Sciences, Docent

**Anna Vyacheslavovna Deryugina**<sup>2</sup>, Head of the Department of Physiology and Anatomy, Doctor of Biological Sciences, Docent

**Mikhail Ivanovich Latushko**<sup>3</sup>, Researcher at the Microscopy Department, Candidate of Technological Sciences

**Andrey Alexandrovich Belov**<sup>4</sup>, Associate Professor at the Department of Physiology, Animal Biochemistry and Obstetrics, Candidate of Biological Sciences, Docent

**Anatoly Petrovich Eremin**<sup>5</sup>, Associate Professor at the Department of Physiology, Animal Biochemistry and Obstetrics, Candidate of Veterinary Sciences, Docent

