



Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»



Международная научная конференция XII Лужские научные чтения «Современное научное знание: теория и практика»
22 мая Луга, 2024.

«Влияние кверцетина, как компонента криозащитной среды, на качественные показатели сперматозоидов петухов с разной криорезистентностью спермы».

Докладчик - **Плешанов Н. В.**
научный сотрудник отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ.

Исследование выполнено в рамках ГЗ № НИОКТР 124020200127-7

Луга
2024

Одним из важнейших приемов сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц является - криоконсервация семени. Составление криобанков репродуктивных клеток позволяет сохранять и использовать генетический материал для сохранения хозяйственно-полезных признаков, а также воссоздавать породы и популяции, находящиеся на грани исчезновения. При этом качественные показатели сперматозоидов могут быть различными, ввиду индивидуальных особенностей спермы самцов, а также негативного влияния сверхнизких температур на репродуктивные клетки. В процессе криоконсервации и оттаивания на сперматозоиды могут влиять различные факторы, оказывая обратимые и необратимые изменения в клетках.

Одним из таких факторов является оксидативный стресс – процесс связанный с увеличением скорости окисления клеточных компонентов и избыточной выработкой активных форм кислорода (АФК). Это может приводить к разрушению нуклеиновых кислот, повреждению компонентов клеточной стенки и органелл сперматозоидов, особенно липидных, белковых молекул и нарушению работы митохондрий.

Сперматозоиды птиц характеризуются низкой концентрацией цитоплазматических антиоксидантов и повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот в их фосфолипидах. В результате данной особенности мужские гаметы птиц более восприимчивы к перекисному окислению липидов. Поэтому применение вспомогательных антиоксидантных соединений имеет важное значение для эффективного сохранения репродуктивных клеток в процессе замораживания-оттаивания.

В данном исследовании в качестве дополнительного антиоксиданта использовался кверцетин. Кверцетин ($C_{15}H_{10}O_7$) – флавоноид, обладающий меньшей цитотоксичностью и более высокой антиоксидантной активностью (по сравнению с витаминами С и Е). Наличие полифенольной субструктуры в кверцетине позволяет ингибировать окисление и действовать как поглотитель свободных радикалов. Также отмечено мембраностабилизирующее действие вещества. Флавоноид ингибирует кальмодулинзависимые ферменты, такие как АТФазы и фосфолипазы, тем самым влияя на проницаемость мембран.

Задачи

Определить влияние антиоксиданта (кверцетина) на качественные показатели гамет самцов с различной криорезистентностью их семени, до и после проведения протокола замораживания – оттаивания.

Материалы и методы

Опыт проводился на базе ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ. Объектом исследования являлись петухи породы род-айланд красный (n= 19) в возрасте 45 недель жизни.

Петухов разделяли на 2 группы по подвижности сперматозоидов после деконсервации, предварительно оцененных в 43 недели жизни. Группа 1 (n=13) – с общей подвижностью сперматозоидов $\geq 40\%$ и группа 2 (n=6) – с общей подвижностью сперматозоидов $\leq 30\%$, для оценки влияния сред-разбавителей с антиоксидантом. Сперму получали в пенициллиновые флаконы, объемом 10 мл, при помощи метода абдоминального массажа (Burrows and Quinn 1935). В опыте использовали смешанную сперму, полученную от соответствующих групп петухов. Объем смешанных эякулятов измерялся градуированными пипетками и делился на 4 равные аликвоты (1 контроль и 3 опытных), для внесения соответствующего разбавителя. В качестве контрольной среды для разбавления и последующей криоконсервации использовали ЛКС-1. В опытных образцах к ЛКС-1 добавлялись различные концентрации кверцетина, основанные на исследованиях с высокими качественным показателям сперматозоидов после криоконсервации. № 1 (среда + кверцетин 0,005 мг/мл) № 2 (среда + кверцетин 0,010 мг/мл) № 3 (среда + кверцетин 0,020 мг/мл).

Криоконсервация производилась в гранулах, путем прямого накапывания семени в жидкий азот. В качестве криопротектора использовали N,N-Диметилацетамид (DMA) в конечной концентрации - 6%.

Оценку подвижности сперматозоидов проводили с помощью системы визуальной микроскопии Axio Imager («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия).

Концентрацию спермы измеряли с помощью лабораторного фотометра Accuread Photometer (IMV Technologies, Великобритания).

Оценку целостности мембран сперматозоидов нативного и заморожено/оттаянного семени проводили при помощи красителя эозин-нигрозин, в окрашенных препаратах на микроскопе Carl Zeiss Microscopy, Axio Imager, Germany при увеличении $\times 1000$, в каждом препарате оценивалось не менее 200 клеток (по 4 измерения на каждое сочетание).



Оценку апоптоза, уровня АФК в клетках и долю клеток с высоким митохондриальным потенциалом (МПП), после оттаивания, оценивали при помощи проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter, Inc.) с программным обеспечением CytExpert, Version 2.4.0.28 (Beckman Coulter, Inc.).

Процент апоптических клеток определяли с помощью набора Аннексин V/пропидия йодид (PI). Конечная концентрация клеток $3-6 \times 10^6$ /мл, конечная концентрация флуохрома 1 мкМ.

Уровень АФК (H_2O_2) в клетках определяли при помощи флуохрома 2',7'-Дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (H2DCFDA). Конечная концентрация клеток $3-6 \times 10^6$ /мл, конечная концентрация флуохрома 4 мкМ.

Долю клеток с высоким митохондриальным потенциалом оценивали при помощи тетраметилродамина (TMRE).

Для каждой пробы (сочетания), на проточном цитометре, оценивалось не менее 10000 событий.

Таблица 1. Качественные показатели смешанных эякулятов с различной криорезистентностью спермы.

Разбавитель	Группа I				Группа II			
	Нативная сперма		Заморожено-оттаянное семя		Нативная сперма		Заморожено-оттаянное семя	
	Средняя подвижность, %	Среднее кол-во клеток с поврежденной мембраной, %	Средняя подвижность, %	Среднее кол-во клеток с поврежденной мембраной, %	Средняя подвижность, %	Среднее кол-во клеток с поврежденной мембраной, %	Средняя подвижность, %	Среднее кол-во клеток с поврежденной мембраной, %
ЛКС-1	85	12,62 ± 0,67	40,00 ± 2,89	56,04 ± 0,33	81,25 ± 1,85	16,25 ± 1,01	37,50 ± 1,44	66,54 ± 1,13
№ 1 (Q 0,005 мг/мл)	85	10,45 ± 0,25	43,75 ± 1,25	52,05 ± 1,08	81,25 ± 1,85	13,20 ± 1,47	36,25 ± 1,25	59,18 ± 1,74
№ 2 (Q 0,010 мг/мл)	85	10,53 ± 0,67	46,25 ± 3,15	53,34 ± 1,36	81,25 ± 1,85	14,87 ± 0,61	37,50 ± 4,33	60,68 ± 1,38
№ 3 (Q 0,020 мг/мл)	85	10,65 ± 0,27	43,75 ± 3,75	53,41 ± 0,78	81,25 ± 1,85	13,72 ± 0,70	35,00 ± 2,89	60,30 ± 1,71

Таблица 2. Качественные показатели смешанных эякулятов после оттаивания с различной криорезистентностью спермы, оценка при помощи проточной цитометрии.

Группы	Группа I			Группа II		
	Апоптоз клеток, %	Внутриклет. H_2O_2 , %	Клетки с высоким ММП, %	Апоптоз клеток, %	Внутриклет. H_2O_2 , %	Клетки с высоким ММП, %
Контроль (Разбавитель ЛКС-1)	3,43 ±1,54	39,45 ±11,39	67,13 ±8,78	2,34 ±0,52	41,37 ±11,00	62,81 ±5,73
№ 1 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,005 мг/мл)	1,76 ±0,36	15,77 ±4,33	75,45 ±4,33	0,96 ±0,34	20,48 ±8,93	57,51 ±4,90
№ 2 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,010 мг/мл)	2,99 ±0,84	25,34 ±8,00	66,36 ±1,01	2,36 ±0,52	8,63 ±3,68	68,19 ±5,81
№ 3 (Разбавитель ЛКС-1 + кверцетин 0,020 мг/мл)	1,30 ±0,67	5,48 ±1,38	74,76 ±3,05	2,15 ±0,37	22,23 ±11,78	56,64 ±6,78

Выводы

1. По результатам исследований жизнеспособности, наиболее высокие показатели целостности мембран спермиев, были получены в исследовательских средах обеих групп криорезистентности (особенно в среде-разбавителе с добавлением 0,005 мг/мл кверцетина), как в нативном, так и в деконсервированном семени.
2. Комплексный анализ клеток по качественным показателям спермы после криоконсервации, при помощи цитометрической оценки, выявил положительное влияние кверцетина на репродуктивные клетки в обеих группах, в сравнении опытных сред-разбавителей с контролем. Отмечено снижение уровня АФК (пероксида водорода) и процента апоптических клеток в образцах с добавлением различных концентраций антиоксиданта.
3. Использование кверцетина, как антиоксиданта дополняющего среду-разбавитель, позволяет улучшать показатели спермы петухов после протокола замораживания-оттаивания, тем самым расширяя спектр генетического разнообразия (улучшая показатели спермы петухов с низкой криорезистентностью).

Спасибо за внимание!



Благодарю за помощь в работе:

Курочкина А. А. м.н.с., лаборатории биологии развития ВНИИГРЖ

Сотрудников отдела биоресурсных коллекций генофондных пород сельскохозяйственных животных ВНИИГРЖ

Работа выполнена на поголовье птиц БРК «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ