

А. Н. Гулов¹, З. Н. Сайфутдинова², Д. В. Митрофанов¹, И. А. Языков¹

Влияние синтетических сред, яичного желтка и пчелиного меда на криоустойчивость спермы трутней

Аннотация. Поиск разбавителя, обеспечивающего получение физиологически оптимальных для сперматозоидов физико-химических параметров (рН, осмолярность) и криопротектора, способного образовать стекловидную структуру без стойких химических соединений с компонентами клетки, позволяет достигнуть значительного прогресса в долгосрочном хранении клеток при низкотемпературном замораживании. Рассматриваются вопросы криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы. Материалом для исследований служила сперма трутней «Приокского» породного типа среднерусской породы пчел, серой горной кавказской и породы пчел карника. Испытывали следующие разбавители на криоустойчивость спермы трутней: полусинтетическая среда С46 (среда Какпакова В. Т.), питательные среды для культур клеток насекомых — Lonza Insect-XPRESS, Graces, Schneider's, JPL-41. В качестве криопротекторов тестировали — диметилсульфоксид (ДМСО) контроль, натуральный пчелиный мед, мед в сочетании: с глицерином, ДМСО, этанолом, метанолом. Исследования показали низкую жизнеспособность (целостность мембран) (Lim 36,5±1,8% — 39,9±0,3%) и подвижность заморожено-оттаянной спермы (Lim 2,0 — 4,0 балла), разбавленной в синтетических средах. Вероятно, ионный состав испытываемых питательных сред с концентрацией ионов водорода (рН) от 4,6–6,5 значительно отличается от ионного состава протоплазмы сперматозоидов трутней. Полусинтетическая среда С46 с добавлением яичного желтка и без ДМСО не обладает криофилактическими свойствами для защиты жизненного ресурса спермы трутней. Пчелиный мед, напротив, в ходе исследований проявил себя в качестве криопротектора, обеспечив сохранный уровень мембран на уровне 37,2±0,5% с подвижностью спермиев 3,0 балла. Самую высокую жизнеспособность сперматозоидов и их подвижность 4,0 балла наблюдали в образце с глицерином в концентрации 3% — 78,0±1,4% и с ДМСО в концентрации 10% — 79,6±1,2%. При этом сперма до замораживания находилась в состоянии мезабиоза в течение 3 мес при 3 °С.

Таким образом, предварительные результаты исследования впервые демонстрируют перспективы неэлектролитной среды по сохранению жизненного ресурса спермы трутней во время криоконсервации.

Ключевые слова: криоконсервация спермы, жизнеспособность сперматозоидов

Авторы:

Гулов Алексей Николаевич — научный сотрудник; e-mail: blee3@yandex.ru;

Сайфутдинова Зифа Низамовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; e-mail: zsaifutdin@yandex.ru;

Митрофанов Дмитрий Викторович — научный сотрудник; e-mail: dima-mitrofanoff2012@yandex.ru;

Языков Иван Алексеевич — младший научный сотрудник; e-mail: vanya.yazikov@mail.ru.

¹ ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства»; 391110, Россия, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, 22;

² ФГБНУ «ФНЦ — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук»; 109428, Россия, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1.

Введение. Главная цель низкотемпературного хранения спермы — это сделать возможным использование ее для искусственного осеменения пчелиных маток с сохранением воспроизводительной способности на уровне осемененных свежесобранной спермой или полученных в условиях естественного спаривания [1]. В этом случае возможно широкое применение замороженной спермы

с целью получения ранних плодных маток. При решении этой задачи необходимо вести систематический контроль состояния спермы в процессе криохранения, осуществлять поиск оптимальных разбавителей и криопротекторов.

Принципиально новые возможности в вопросе сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы возникли с применением питательной среды

С46 для культивирования клеток насекомых дрозофил [2]. Разработанные на постоянных линиях клеток дрозофилы криобиотехнологическая технология и среда С46 позволили создать криобанк спермы трутней медоносной пчелы *Apis mellifera* L. [1], криобанк эмбрионов дрозофилы и аквариумной рыбы *Danio rerio* [3]. В результате многочисленных испытаний наибольший эффект выживаемости спермы трутней (80–100%) установлен при замораживании смеси: сперма от 20 трутней с 0,15 мл среды С46, содержащей 15% эмбриональной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида (ДМСО).

Предлагаемая технология криоконсервации [4], действительно, обеспечивает сохранение 80–95% жизнеспособных (без нарушения плазматической мембраны) сперматозоидов с подвижностью 2–3 балла после длительного хранения в жидком азоте в течение 10 лет и более. Но показатель целостности мембран (жизнеспособность сперматозоидов) в пробе до осеменения не всегда коррелирует с оплодотворяющей способностью сперматозоидов после осеменения маток [5].

На снижение качественных показателей образцов спермы, разбавленных в синтетических средах, вероятно, оказывает влияние концентрация ионов водорода в растворе (рН) [6]. По мнению отечественных исследователей [7] реакция среды оказывает значительное влияние на жизненный ресурс семени. Так, например, сочетание кислой реакции с пониженной температурой среды создает условия для торможения подвижности спермиев, замедляя метаболизм в них, способствует наиболее долгой их сохранности.

Во время длительного хранения в жидком азоте сперматозоиды подвергаются воздействию целого ряда факторов, вызывающих структурные и функциональные изменения клеток. Данные процессы могут быть сгенерированы тем или иным видом криофиликта, используемым в составе экстендера. Недавние исследования показывают, что ДМСО вызывает эпигенетические изменения в структуре ДНК сперматозоидов угрей, в связи с чем были разработаны протоколы замораживания спермы рыб на основе метанола [8, 9]. Криоконсервация на основе метанола с добавлением яичного желтка способствовала значительному улучшению подвижности сперматозоидов после замораживания-оттаивания [10].

Использование этилового спирта в составе среды для замораживания спермы хряка увеличило абсолютный показатель живучести сперматозоидов на 34–41% больше по сравнению с контролем [11]. Введение этилового спирта в оптимальном

количестве в состав среды для хранения спермы в охлажденном состоянии позволяет снизить активацию процесса перекисного окисления липидов.

Яичный желток нашел свое применение и в технологиях по сохранению генетических ресурсов медоносной пчелы [12, 13]. Применение яичного желтка способствовало лучшей сохранности плазматических мембран сперматозоидов и их подвижности после замораживания-оттаивания. Но метаболизм яичного желтка в репродуктивных органах пчелиной матки не изучен. Тем самым создается определенный риск для контаминации спермы микроорганизмами. Несмотря на хорошие качественные показатели спермы в сочетании с желтком после криохранения, оплодотворяющая способность сперматозоидов по-прежнему остается низкой [12].

Повреждение сперматозоидов в процессе длительного хранения в жидком азоте может быть уменьшено путем оптимизации типов криопротекторов. Использование изотонических сред на основе сахаридов с пониженным содержанием катионов оказалось наиболее эффективным для гипотермического хранения спермы человека и лабораторной мыши [14], осетровых рыб [15, 16], криоконсервации спермы быков [17].

Отдельно следует остановиться на натуральном пчелином меде, как богатейшем природном источнике простых и сложных сахаров. Основным компонентом меда являются углеводы, растворенные в небольшом количестве воды: фруктоза 38,0%, глюкоза 31,0%, сахароза 1,0%, вода 13,0–20,0%, другие сахара (мальтоза, мелицитоза) 9,0%, зола 0,17%, прочее 3,38%, а также в незначительных количествах витамины В₁, В₂, В₆, Е, К, С, каротин (провитамин витамина А), фолиевую кислоту (<https://ru.wikipedia.org/wik>). Мед имеет подтвержденные противомикробные (антибактериальные, антимикотические, антимикобактериальные) свойства, интерес к которым в последнее время растет. Добавление пчелиного меда в состав разбавителей для криоконсервации значительно улучшает подвижность сперматозоидов после оттаивания, целостность их мембран и акросом, а также снижает количество аномалий в морфологии сперматозоидов у лошадей [18], быков [19, 20], буйволов [21], коз [22], баранов [23, 24], крыс и мышей [25, 26], рыб [27, 28, 29], человека [30].

Материалы и методы исследований. Отбор спермы проводили по методике [5]. Качество спермы оценивали по показателям — подвижности [23], целостности цитоплазматических мембран сперматозоидов методом флуоресцентной микро-

скопии [31] и морфологии спермиев методом су-правитального окрашивания набором Diff Quick. С целью дифференциации интактных и поврежденных мембран сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии использовали набор по определению жизнеспособности LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit L 7011 (Life Technologies Limited, Scotland). Исследование проводили на биологическом световом микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (ООО «Альтами», Россия) при увеличении 800× (целостность мембран) и 2000× (аномалии в морфологии сперматозоидов). Всего подсчитывали 300 сперматозоидов.

В первой серии исследований проводили испытание следующих питательных сред для культур клеток насекомых: среда С46 (среда Какпакова В.Т.) pH 7,2 (предоставлена ФНИЦ ВНИИЭВ им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН); Lonza Insect-XPRESS™ (Sartorius Stedim, Belgium) pH 6,1 осмолярность 371 мосмоль/кг; Schneider's Drosophila Medium с L-глутамином (Thermo Fisher, USA) pH 4,6, осмолярность 278 мосмоль/кг; Grace's Insect Medium (2x) (Thermo Fisher, USA) pH 6,3, осмолярность 715 мосмоль/кг; JPL-41 Insect Medium с хлоридом кальция, бикарбонатом натрия и без L-глутамин, pH 5,9–6,5, осмолярность 330–370 мосмоль/кг (предоставлена ФНИЦ ВНИИЭВ им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН). Свежеотобранную сперму готовили для замораживания по методике [12], а замораживание образцов осуществляли по методике [3]. Оценку проводили через 7 суток криохранения. Размораживание образцов осуществляли на водяной бане при температуре 34°C в течение 10 мин [34].

Во второй серии опытов исследовали криоустойчивость спермы, разбавленной в полусинтетической среде С46 в сочетании с яичным желтком без добавления и с добавлением ДМСО. Испытывали следующие варианты разбавителя: 1 мл среды С46 + ДМСО 10% (контроль); 0,5 мл среды С46 + ДМСО 10% + 0,5 мл яичного желтка; 0,5 мл среды С46 без ДМСО + 0,5 мл яичного желтка.

Задача третьей серии опытов заключалась в изучении криоустойчивости спермы в неэлектролитной среде. Испытывали следующие варианты разбавителя: мед 50 мл, лактоза 10 мг (20% от объема меда), сахароза 10 мг (20% от объема меда), яичный желток 2,5 мл (5% от объема меда); мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток 2,5 мл, метанол 10% — 6 мл 250 мкл (из соотношения — 1 часть метанола 10% : 8 частей меда); мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный

желток 2,5 мл, этанол 10% — 6 мл 250 мкл (из соотношения 1:8); мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток 2,5 мл, ДМСО 5 мл (10% от объема меда); мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток 2,5 мл, глицерин 3% — 6 мл 250 мкл (из соотношения 1:8). Метанол, этанол 10% и глицерин 3% концентрации готовили предварительно на деионизированной воде (Пан-Эко, Россия). Перед приготовлением разбавителя предварительно разогревали мед на водяной бане при температуре 40–45 °C в течение 30 мин. Концентрацию ионов водорода в разбавителе доводили 6М NaOH до значения pH 8,2. Исходный показатель pH меда — 4,0.

Результаты и обсуждение. Испытываемые нами питательные среды (или синтетические среды) являются таковыми только для культур клеток тех насекомых, для которых они, собственно, синтезированы. В этой связи нет оснований к тому, чтобы в наших исследованиях рассматривать их как питательные, как «синтетический корм» для сперматозоидов трутней медоносной пчелы [7]. В данном случае мы используем их в качестве защитных сред или протекторов, предохраняющих сперматозоиды от преждевременного повреждения внешними силами или разрушения их в ходе расточительного обмена веществ [7].

В ходе предварительной оценки испытываемых синтетических сред выявилось их весьма положительное действие на физиологическое состояние сперматозоидов (табл. 1).

Электролитный состав, pH, осмотическое давление питательных сред и др. оказались удовлетворительными для сперматозоидов трутней на начальном этапе исследований. Было отмечено, что в образцах с диметилсульфоксидом сперматозоиды чаще совершали прямолинейное поступательное движение. По всей видимости, добавление ДМСО в исследуемые образцы спровоцировало плазматическую мембрану сперматозоидов на использование части энергии из окружающей среды. Как известно, проницаемость цитоплазматической мембраны носит избирательный характер. Возможно, индивидуальные особенности мембран сперматозоидов трутней служат возникновению аномалий в морфологии спермиев (дефекты головок) (рис. 1) после разбавления свежеотобранной спермы в питательной среде.

Охлаждение спермы до температуры 3°C переводит сперматозоиды в неактивное состояние. При этом создаются условия, благодаря которым уравниваются существующие концентрационные градиенты соединений, растворенных в про-

топлазме сперматозоидов и в окружающей ее синтетической среде [37]. В связи с чем, после эквипирации разбавленной спермы и произошло незначительное снижение показателя жизнеспособности (целостности мембран), за исключением образца с питательной средой Graces (табл. 2).

Возможно, для образца с Graces требовалось дополнительное время для уравнивания.

При неблагоприятных изменениях среды, в первую очередь, повреждаются акросома и цитоплазматическая мембрана сперматозоидов. После не продолжительного хранения разбавленной спермы

в жидком азоте физиологические показатели сперматозоидов кардинально изменились (табл. 3).

Цитоплазматическая мембрана сперматозоидов, разбавленных в подкисленной синтетической среде, подверглась наибольшему воздействию условий криохранения. Контрольные образцы, разбавленные в среде с pH 7,2 (C46), достоверно надежно были защищены от агрессивных условий хранения в жидком азоте.

Ионный состав применяемых нами синтетических сред для разбавления спермы должен качественно приближаться к ионному составу прото-

Таблица 1. Показатели качества разбавленной спермы до эквипирации

Разбавитель	Показатели качества					
	Жизнеспособность, %		Подвижность, балл		Сперматозоиды с аномальной морфологией (дефекты головок), %	
	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО
Lonza	69,5±9,5	78,8±0,65	4,0	5,0	29,6±7,2	25,4±6,3
Graces	86,7±3,1	78,7±6,4	4,0	5,0	35,3±4,1	41,3±4,6 ^{ab}
C46 (контроль)	85,5±2,3	88,7±2,2	4,0	5,0	12,0±3,5	19,3±3,8 ^b
Schneider's	94,6±2,2	95,2±2,8	4,0	5,0	21,0±5,4	47,0±4,2
JPL-41	95,1±0,4	91,2±0,4	4,0	5,0	30,0±4,7	23,0±5,1

^{ab} — достоверные различия при $p < 0,01$.

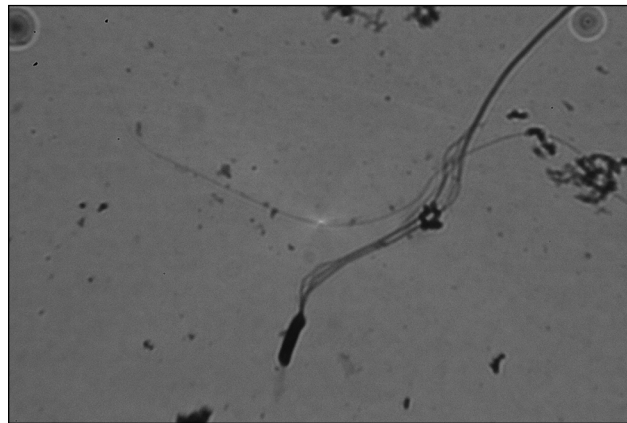
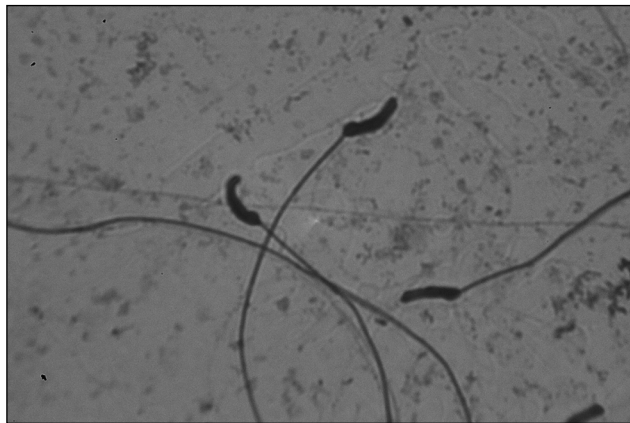


Рис. 1. Сперматозоиды с дефектами головок и жгутика, окрашенные набором Diff Quick

Таблица 2. Показатели качества разбавленной спермы после эквипирации

Разбавитель	Показатели качества		
	Жизнеспособность, %	Подвижность, балл	Сперматозоиды с аномальной морфологией (дефекты головок), %
	с ДМСО	с ДМСО	с ДМСО
Lonza	64,6±7,3	4,0	25,8±5,4 ^a
Graces	89,8±0,6 ^{eb}	4,0	36,7±2,1
C46(контроль)	67,4±5,1 ^b	4,5	20,1±4,2 ^b
Schneider's	73,2±0,3	4,0	40,1±7,3 ^{cad}
JPL-41	81,7±0,6	4,0	28,4±6,3 ^d

^{ad} — достоверные различия при $p < 0,01$, ^{cad} при $p < 0,001$, ^{eb} $p \leq 0,05$.

плазмы сперматозоида с целью равновесия концентрационной ситуации ионов в биологической системе: живая клетка — окружающая среда [37]. По всей видимости, ионный состав испытываемых питательных сред для культур клеток насекомых значительно отличается от ионного состава протоплазмы сперматозоидов трутней медоносной пчелы. Даже в условиях краткосрочного хранения (30–60 сут) спермы при 3°C подкисленные среды не обеспечивают надежной защиты жизненного ресурса спермы [35].

Вероятно, этим и объясняется хорошая сохранность сперматозоидов в разбавителях, приготовленных из естественных продуктов — молоко, сыворотка крови, яичный желток, мед, маточное молочко и т.п.

Применение яичного желтка в ходе собственных исследований благотворно сказалось на сохранности плазматических мембран сперматозоидов трутней (табл. 4).

Однако подвижность сперматозоидов, как опытного, так и контрольного образцов, была предельно низкой на одном уровне. Увеличение степени разбавления спермы (в 67 раз) в синтетической среде и в среде с добавлением яичного желтка не приводит к быстрой гибели сперматозоидов. В свою очередь, отсутствие диметилсульфоксида в разбавителе способствует практически полной гибели сперматозоидов. Таким образом, сама по себе полусинтетическая среда С46, даже с добавлением

яичного желтка, не обладает криопротекторными свойствами для защиты жизненного ресурса спермы трутней.

Следует отметить и тот факт, что использование яичного желтка в составе разбавителя позволило оттаять образцу в течение 1,5–2 мин в сравнении с контрольным образцом, где на полное оттаивание затрачивается 10 мин [34]. Следовательно, на процессы рекристаллизации в замороженной сперме с яичным желтком затрачивается в 5–6,7 раз меньше времени, способствуя тем самым снижению количества повреждений сперматозоидов.

Результаты исследований продемонстрировали нам натуральный пчелиный мед в качестве криопротектора (табл. 5). Пчелиный мед, благодаря своим физико-химическим свойствам, даже без использования дополнительных криопротекторов, превысил показатель целостности мембран (жизнеспособность) на 35% в сравнении со средой С46 без криопротектора. А в сочетании с глицерином 3% или диметилсульфоксидом 10% мед обеспечил самую высокую защиту жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы в сравнении с синтетическими средами и яичным желтком (табл. 6).

Испытания глицерина в качестве криопротектора для спермы трутней медоносных пчел проводились ранее отечественными исследователями [1] и зарубежными [36]. Какпаков В. Т. (1993) в среде С46 с 10% глицерина в сходных условиях замораживания обнаружил очень низкую жизнеспособность (подвижность) сперматозоидов. В та-

Таблица 3. Показатели качества заморожено-оттаянной спермы после 7 суток криохранения

Разбавитель	Показатели качества		
	Жизнеспособность, %	Подвижность, балл	Сперматозоиды с аномальной морфологией (дефекты головок), %
	с ДМСО	с ДМСО	с ДМСО
Lonza	39,9±0,3 ^{ab}	2,0	36,0±1,7
Graces	38,2±0,7 ^{cb}	3,5	38,4±2,7
С46 (контроль)	55,1±2,5^b	4,0	23,8±1,5 ^b
Schneider's	36,5±1,8 ^{db}	2,0	44,3±2,4 ^{db}
JPL-41	3 8,4±0,8 ^{eb}	4,0	36,2±3,1

^{acde} — достоверные различия при $p < 0,01$.

Таблица 4. Показатели качества заморожено-оттаянной спермы после 7 суток криохранения

Разбавитель	Показатели качества	
	Жизнеспособность, %	Подвижность, балл
С46 (1,0 мл) + ДМСО 10% (контроль)	51,5±3,5 ^{ca}	1,5
С46 (0,5 мл) + ДМСО 10% + 0,5 мл желток	47,2±11,3 ^{ba}	1,5
С46 (0,5 мл) (без ДМСО) + 0,5 мл желток	2,7±0,7 ^a	0,5

^{bc} — достоверные различия при $p < 0,05$.

ком соотношении среда оказалась пригодной только для хранения спермы без замораживания при 4°C.

Hopkins B. K. et al. (2010), применив глицерин в концентрации от 8–11,8%, также установили низкую жизнеспособность (35% целостных мембран) сперматозоидов еще до замораживания.

При этом для криоконсервации с медом мы использовали сперму, хранившуюся при 3°C в течение 3 мес., то есть в состоянии мезабиоза и прекращения активного переноса. Во время оценки спермы перед процедурой замораживания первые движения сперматозоидов в виде вибрации мы наблюдали только после 20–25 мин инкубации суспензии спермы с флюорохромами (SYBR-14, PI). До этого момента сперматозоиды были неподвижными и вытянутыми во всю свою длину. Соответственно и цитоплазматические мембраны спер-

миев диагностировались флуоресцентной микроскопией как нежизнеспособные.

Полное оттаивание образцов, хранившихся в криопробирках с медом, происходило в течение 20–30 с. Криоконсервация спермы в меде вызывает незначительные аномалии в морфологии сперматозоидов.

Закключение. Предварительные результаты исследований впервые демонстрируют перспективы натурального пчелиного меда по сохранению жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы во время криоконсервации. Длительное охлаждение неразбавленной спермы (состояние мезабиоза) в течение 3 мес при 3°C создает условия для более эффективного проявления свойств криопротекторов глицерина и ДМСО по защите оргanelл клеток и их энергетического потенциала при низкотемпературном хранении.

Таблица 5. Показатели качества спермы до и после криоконсервации в течение 7 суток в неэлектролитной среде

Разбавитель	Показатели качества					
	Жизнеспособность, %			Подвижность, балл		
	до замораживания	После оттаивания		до замораживания	После оттаивания	
		соломина	пробирка		соломина	пробирка
Мед	45,3±1,6	25,5±3,4	37,2±0,5 ^{cab}	0,5	1,0	3,0
Мед + глицерин 3%	51,5±2,1	41,2±2,3	78,0±1,4^b	0,5	2,0	4,0
Мед + ДМСО 10%	40,5±4,5	26,5±1,8	79,6±1,2^a	0,5	1,0	4,0
Мед + этанол 10%	42,5±3,8	26,9±2,0	28,5±0,9 ^{dab}	0,5	1,0	1,0
Мед + метанол 10%	45,0±2,5	— *	27,7±0,6 ^{cab}	0,5	— *	2

* — сильный разрыв соломин во время оттаивания с потерей образца ^{cdeab} — достоверность различий при p<0,01.

Таблица 6. Показатели качества спермы после криоконсервации в электролитной и неэлектролитной среде

Показатели	Разбавитель		
	С46 + ДМСО 10% (контроль)	Мед + глицерин 3%	Мед + ДМСО 10%
Жизнеспособность, %	55,1±2,5 ^a	78,0±1,4 ^{ba}	79,6±1,2 ^{ca}
Подвижность, балл	4,0	4,0	4,0

^{abc} — достоверные различия при p<0,01.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Рязанской области (проект 18-44-620001)

Литература

1. Какпаков В. Т. Криобанк спермы трутней медоносной пчелы / В. Т. Какпаков, О. В. Кабашова, А. В. Бородачев, Е. С. Какпакова // Пчеловодство. — 1993. — № 8. — С. 4–6.
2. Какпаков В. Т. Получение и характеристика культур соматических клеток дрозофилы: дисс. докт. биол. наук. — Москва, 1989.
3. Пинаев Г. П. Методы культивирования клеток / Г. П. Пинаев, М. С. Богданова // Изд-во Политехн. ун-та, СПб., 2008. — 278 с.

4. Бородачев А. В. Технология длительного хранения спермы трутней в жидком азоте / А. В. Бородачев, О. В. Кабашова // ГНУ НИИП РАСХН. — 2007. — 26 с.
5. Гулов А. Н. Проблемы сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы / А. Н. Гулов // Пчеловодство. — 2018. — №6. — С. 22–25.
6. Гулов А. Н. Перспективы краткосрочного хранения спермы трутней медоносной пчелы / А. Н. Гулов, Е. О. Ларькина // Генетика и разведение животных. — 2018. — № 4. — С. 61–66.
7. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных / В. К. Милованов // М. — 1962. — 696 с.
8. Herranz-Jusdado J. G. Eel sperm cryopreservation: An overview / J.G. Herranz-Jusdado, V. Gallego, M. Morini // Theriogenology. — 2019. — V. 133. — P. 210–215.
9. Nomura K. Sperm cryopreservation protocols for the large-scale fertilization of Japanese eel using a combination of large-volume straws and low sperm dilution ratio / K. Nomura, I. Chong Chu Kohb., R. Iiob // Aquaculture. — 2018. — V. 496. — P. 203–210.
10. Herranz-Jusdado J. G. European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes / J. G. Herranz-Jusdado, V. Gallego, C. Rozenfeld // Aquaculture. — 2019. — V. 506. — P. 42–50.
11. Епишина Т. М. Совершенствование способов повышения воспроизводительных качеств свиней и овец: дисс. докт. биол. наук. — Москва, 2011.
12. Hopkins B. K. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen / B. K. Hopkins, C. Herr, W.S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. — 2012. — V. 24. — P. 1079–1083.
13. Dadkhah F. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol / F. Dadkhah, G. Nehzati-Paghaleh, M. Zhandi, B. K. Hopkins // [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/310389037>.
14. Riel J. M. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation / J. M. Riel, Y. Yamauchi, T. T. F. Huang, J. Grove, M. A. Fard // Biol. Reprod. — 2011. — V. 85. — P. 536–547.
15. Исаев Д. А. Подвижность, сохранность мембран и фрагментация ДНК в сперме стерляди при гипотермическом хранении в безэлектролитном растворе глюкозы и трегалозы / Д. А. Исаев, Е. И. Шишанова, Д. А. Кавтаров, А.П. Глебов // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. — 2016. — № 3. — С. 100–108.
16. Golshahia K. Disaccharide supplementation of extenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon / K. Golshahia, M. Sadegh Aramlib // Aquaculture. — 2018. — V. 486. — P. 261–265.
17. Sitaula R. A study of the effect of sorbitol on osmotic tolerance during partial desiccation of bovine sperm / R. Sitaula, A. Fowler, M. Toner, S. Bhowmick // Cryobiology. — 2010. — V. 60. — P. 331–336.
18. El-Sheshtawy R. I. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters / R. I. El-Sheshtawy, D. A. El-Badry // Asian Pacific Journal of Reproduction. — 2016. — V. 5(4). — P. 331–334.
19. Malik A. Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali / A. Malik, R. Fauzi, M.I. Zakir // Acta veterinaria indonesiana. — 2017. — V. 5(2). — P. 98–104.
20. El-Sheshtawy R. I. Effect of Honey Solution on Semen Preservability of Local Breeds of Cattle Bulls / R. I. El-Sheshtawy, W.S. El-Nattat // World Applied Sciences Journal. — 2014. — V. 32(10). — P. 2076–2078. Doi: 10.5829/idosi.wasj.2014.32.10.911
21. Kandiel M. M. M. Quantitative Ultrastructure Evaluation of Egyptian Buffalo Bull Frozen-Thawed Spermatozoa under the Effect of Honey / M. M. M. Kandiel, A. R. M. El-Khawagah // Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences. — 2019. — V. 6(3). — P. 92–98. Doi: 10.21276/sjavs.2019.6.3.4
22. Shikh Maidina M. Supplementation of Nigella sativa Oil and Honey Prolong the Survival Rate of Fresh and Post-Thawed Goat Sperms / M. Shikh Maidina, M.H. Padlana // Tropical Animal Science Journal. — 2018. — V. 41(2). — P. 94–99. Doi: <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.2.94>
23. Zaghloul A. A. Relevance of Honey Bee in Semen Extender on the Quality of Chilled-Stored Ram Semen / A. A. Zaghloul // J. Animal and Poultry Prod. — 2017. — V. 8(1). — P. 1–5.
24. Jerez-Ebensperger R. The combined use of honey, garlic (*Allium Sativum* L.) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen / R. Jerez-Ebensperger, L. Gil // CryoLetters. — 2015. — V. 36(4). — P. 243–251.
25. Syazana N. S. Effects of Gelam Honey on Sperm Quality and Testis of Rat / N. S. Syazana, N. H. Hashida // Sains Malaysiana. — 2011. — V. 40(11). — P. 1243–1246.

26. Zoheir K. M. A. Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice / K. M. A. Zoheir, G.I. Harisa // Pak. J. Pharm. Sci. — 2015. — V. 28(3). — P. 973–981.
27. Fanni N. A. Quality enhancement of cryopreserved spermatozoa of sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) with honey addition / N. A. Fanni, M. B. Santanumurti // Iraqi Journal of Veterinary Sciences. — 2018. — V. 32(2). — P. 231–236.
28. Ogretmen F. Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*Cyprinus Carpio*) spermatozoa / F. Ogretmen, B. E. İnanan // CryoLetters. — 2014. — V. 35(5). — P. 427–437.
29. Sunarma A. Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842) / A. Sunarma, D. Wisudiyanti Budihastuti, Y. Sistina // Omni-Akuatika. — 2010. — V. 9(11). — P. 51–55.
30. Fakhrildin M-B. M-R. Honey Supplementation to Semen-Freezing Medium Improves Human Sperm Parameters Post-Thawing / M-B. M-R. Fakhrildin, M.D. A-R Rana Alsaadi // Journal of Family and Reproductive Health. — 2014. — V. 8(1). — P. 27–31.
31. Johuson R. Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability / R. Johuson, L. Dahlgren, B. Siegfried, M. Ellis // Journal of Apicultural Research. — 2013. — V. 52(2). — P. 88–95. Doi: 10.3896 / IBRA. 1.52.2.18.
32. Kedzierska-Matysek M. Effect of freezing and room temperatures storage for 18 months on quality of raw rapeseed honey (*Brassica napus*) / M. Kedzierska-Matysek, M. Florek // J Food Sci Technol. — 2016. — V. 53(8). — P. 3349–3355. Doi: 10.1007/s13197-016-2313-x
33. Kantor Z. Glass Transition Temperature of Honey as a Function of Water Content As Determined by Differential Scanning Calorimetry / Z. Kantor et al. // J. Agric. Food Chem. — 1999. — V. 47. — P. 2327–2330.
34. Гулов А. Н. Анализ криоконсервированной спермы трутней / А. Н. Гулов, З. Н. Сайфутдинова, Е. О. Ларькина // Пчеловодство. — 2019. — №2. — С. 16–18.
35. Ларькина Е. О. Инструментальное осеменение маток медоносных пчел с использованием спермы трутней, разбавленной в различных питательных средах / Е. О. Ларькина, Д. В. Галицкая // В монографии «Современные проблемы пчеловодства и апитерапии». — Рыбное: ФГБНУ «ФНИЦ пчеловодства». — 2019. — С. 149–155.
36. Hopkins B. K. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa / B.K. Hopkins, C. Herr // Apidologie. — 2010. — V. 41. — P. 548–556.
37. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф. И. Осташко // «Урожай», К., 1978. — 256 с.

Gulov A.¹, Sayfutdinova Z.², Mitrofanov D.¹, Yazykov I.¹

Cryostability effect on drone sperm of synthetic media, egg yolk and honey

Abstract. The search for a diluent that provides physiologically optimal physical and chemical parameters for spermatozoa (pH, osmolarity) and a cryoprotector that can form a vitreous structure without persistent chemical compounds with cell components allows us to achieve significant progress in long-term storage of cells under low-temperature freezing. The questions of cryopreservation of sperm of honeybee drones are considered. The material for research was the sperm of drones of the «Prioksky» breed type of the Central Russian breed of bees, the gray mountain Caucasian and the breed of Karnik bees. The following diluents were tested for cryostability of drone sperm: semisynthetic medium C46 (medium Kakpakov V. T.), nutrient media for insect cell cultures—Lonza Insect-XPRESS, Graces, Schneider's, JPL-41. As cryoprotectors tested — dimethylsulfoxide (DMSO) control, natural honey, honey in combination with glycerine, DMSO, ethanol, methanol. Studies have shown low viability (membrane integrity) ($\text{Lim } 36,5 \pm 1,8\% - 39,9 \pm 0,3\%$) and mobility of frozen-thawed sperm ($\text{Lim } 2,0 - 4,0$ points), diluted in synthetic media. Probably the ionic composition of the tested nutrient media with a concentration of hydrogen ions (pH) from 4.6–6.5 differs significantly from the ionic composition of the protoplasm of sperm drones. Semisynthetic medium C46 with the addition of egg yolk and without DMSO does not have cryoprotective properties to protect the life resource of drone sperm. Bee honey, on the contrary, in the course of research proved itself as a cryoprotector, ensuring the preservation of membranes at the level of

37.2±0.5% with a sperm motility of 3.0 points. The highest sperm viability and motility of 4.0 points were observed in a sample with glycerol at a concentration of 3% — 78.0±1.4% and with DMSO at a concentration of 10% — 79.6±1.2%. At the same time, the sperm before freezing was in a state of mesabiosis for 3 months at 3°C.

Thus, the preliminary results of the study for the first time demonstrate the prospects of a non-electrolyte environment for the preservation of the life resource of drone sperm during cryopreservation.

Keywords: sperm cryopreservation, sperm viability.

Authors:

Gulov A. — researcher; e-mail: blee3@yandex.ru;

Sayfutdinova Z. — PhD (Biol. Sci.), leading researcher e-mail: zsaifutdin@yandex.ru;

Mitrofanov D. — researcher; e-mail: dima-mitrofanoff2012@yandex.ru;

Yazykov I. — junior researcher; e-mail: vanya.yazykov@mail.ru.

¹ Federal state budgetary scientific institution «Federal beekeeping research centre»; 391110, Russian Federation, Ryazan region, Rybnoe, Pochtovaya st., 22;

² Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Centre VIEV»; 109428, Russian Federation, Moscow, Ryazansky prospect h. 24, b. 1.

References

1. Kakpakov V. T. Cryobank of sperm of drones of a honey bee / V. T. Kakpakov, O. V. Kabashova, A. V. Borodachev, E. S. Kakpakova // Beekeeping. — 1993. — № 8. — P. 4–6.
2. Kakpakov V. T. Obtaining and characterization of cultures of somatic Drosophila cells: Diss. Doct. biol. sciences. Moscow, 1989
3. Pinaev G. P. Cell cultivation methods / G. P. Pinaev, M. S. Bogdanova // Polytechnic Publishing House. University, St. Petersburg, 2008. — 278 p.
4. Borodachev A. V. Technology of long-term storage of drones semen in liquid nitrogen / A. V. Borodachev, O. V. Kabashova // GNU NIIP RAAS. — 2007. — 26 p.
5. Gulov A. N. Problems of conservation of genetic resources of the honey bee / A. N. Gulov // Beekeeping. — 2018. — № 6. — P. 22–25.
6. Gulov A. N. Prospects for short-term storage of semen of drones of a honey bee / A. N. Gulov, E. O. Larkina // Genetics and animal breeding. — 2018. — № 4. — P. 61–66.
7. Milovanov V. K. Biology of reproduction and artificial insemination of animals / V. K. Milovanov // M. — 1962. — 696 p.
8. Herranz-Jusdado J. G. Eel sperm cryopreservation: An overview / J.G. Herranz-Jusdado, V. Gallego, M. Morini // Theriogenology. — 2019. — V. 133. — P. 210–215.
9. Nomura K. Sperm cryopreservation protocols for the large-scale fertilization of Japanese eel using a combination of large-volume straws and low sperm dilution ratio / K. Nomura, I. Chong Chu Kohb., R. Iiob // Aquaculture. — 2018. — V. 496. — P. 203–210.
10. Herranz-Jusdado J. G. European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes / J. G. Herranz-Jusdado, V. Gallego, C. Rozenfeld // Aquaculture. — 2019. — V. 506. — P. 42–50.
11. Epishina T. M. Perfection of ways to increase the reproductive qualities of pigs and sheep: diss. Doct. biol. sciences. Moscow, 2011.
12. Hopkins B. K. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen / B. K. Hopkins, C. Herr, W.S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. — 2012. — V. 24. — P. 1079–1083.
13. Dadkhah F. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol / F. Dadkhah, G. Nehzati-Paghaleh, M. Zhandi, B. K. Hopkins // [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/310389037>.
14. Riel J. M. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation / J. M. Riel, Y. Yamauchi, T. T. F. Huang, J. Grove, M. A. Fard // Biol. Reprod. — 2011. — V. 85. — P. 536–547.
15. Isaev D. A. Mobility, membrane preservation and DNA fragmentation in sperm of sterlet during hypothermic storage in an electrolytic solution of glucose and trehalose / D. A. Isaev, E. I. Shishanova, D. A. Kavtarov, A. P. Glebov // Herald of the ASTU. Ser.: Fisheries. — 2016. — № 3. — P. 100–108.

16. Golshahia K. Disaccharide supplementation of extenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon / K. Golshahia, M. Sadegh Aramlib // *Aquaculture*. — 2018. — V. 486. — P. 261–265.
17. Sitaula R. A study of the effect of sorbitol on osmotic tolerance during partial desiccation of bovine sperm / R. Sitaula, A. Fowler, M. Toner, S. Bhowmick // *Cryobiology*. — 2010. — V. 60. — P. 331–336.
18. El-Sheshtawy R. I. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters / R. I. El-Sheshtawy, D. A. El-Badry // *Asian Pacific Journal of Reproduction*. — 2016. — V. 5(4). — P. 331–334.
19. Malik A. Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali / A. Malik, R. Fauzi, M. I. Zakir // *Acta veterinaria indonesiana*. — 2017. — V. 5(2). — P. 98–104.
20. El-Sheshtawy R. I. Effect of Honey Solution on Semen Preservability of Local Breeds of Cattle Bulls / R. I. El-Sheshtawy, W.S. El-Nattat // *World Applied Sciences Journal*. — 2014. — V. 32(10). — P. 2076–2078. Doi: 10.5829/idosi.wasj.2014.32.10.911.
21. Kandiel M. M. M. Quantitative Ultrastructure Evaluation of Egyptian Buffalo Bull Frozen-Thawed Spermatozoa under the Effect of Honey / M. M. M. Kandiel, A. R. M. El-Khawagah // *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*. — 2019. — V. 6 (3). — P. 92–98. Doi: 10.21276/sjavs.2019.6.3.4.
22. Shikh Maidina M. Supplementation of Nigella sativa Oil and Honey Prolong the Survival Rate of Fresh and Post-Thawed Goat Sperms / M. Shikh Maidina, M.H. Padlana // *Tropical Animal Science Journal*. — 2018. — V. 41(2). — P. 94–99. Doi: <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.2.94>.
23. Zaghloul A. A. Relevance of Honey Bee in Semen Extender on the Quality of Chilled-Stored Ram Semen / A. A. Zaghloul // *J. Animal and Poultry Prod*. — 2017. — V. 8(1). — P. 1–5.
24. Jerez-Ebensperger R. The combined use of honey, garlic (*Allium Sativum* L.) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen / R. Jerez-Ebensperger, L. Gil // *CryoLetters*. — 2015. — V. 36(4). — P. 243–251.
25. Syazana N. S. Effects of Gelam Honey on Sperm Quality and Testis of Rat / N. S. Syazana, N. H. Hashida // *Sains Malaysiana*. — 2011. — V. 40(11). — P. 1243–1246.
26. Zoheir K. M. A. Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice / K. M. A. Zoheir, G.I. Harisa // *Pak. J. Pharm. Sci*. — 2015. — V. 28(3). — P. 973–981.
27. Fanni N. A. Quality enhancement of cryopreserved spermatozoa of sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) with honey addition / N. A. Fanni, M. B. Santanumurti // *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. — 2018. — V. 32(2). — P. 231–236.
28. Ogretmen F. Evaluation of cryoprotective effect of turkish pine honey on common carp (*Cyprinus Carpio*) spermatozoa / F. Ogretmen, B. E. İnanan // *CryoLetters*. — 2014. — V. 35(5). — P. 427–437.
29. Sunarma A. Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842) / A. Sunarma, D. Wisudiyanti Budihastuti, Y. Sistina // *Omni-Akuatika*. — 2010. — V. 9(11). — P. 51–55.
30. Fakhridin M-B. M-R. Honey Supplementation to Semen-Freezing Medium Improves Human Sperm Parameters Post-Thawing / M-B. M-R. Fakhridin, M.D. A-R Rana Alsaadi // *Journal of Family and Reproductive Health*. — 2014. — V. 8(1). — P. 27–31.
31. Johuson R. Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability / R. Johuson, L. Dahlgren, B. Siegfied, M. Ellis // *Journal of Apicultural Research*. — 2013. — V. 52 (2). — P. 88–95. Doi: 10.3896 / IBRA. 1.52.2.18.
32. Kedzierska-Matysek M. Effect of freezing and room temperatures storage for 18 months on quality of raw rapeseed honey (*Brassica napus*) / M. Kedzierska-Matysek, M. Florek // *J Food Sci Technol*. — 2016. — V. 53(8). — P. 3349–3355. Doi: 10.1007/s13197-016-2313-x
33. Kantor Z. Glass Transition Temperature of Honey as a Function of Water Content As Determined by Differential Scanning Calorimetry / Z. Kantor et al. // *J. Agric. Food Chem*. — 1999. — V. 47. — P. 2327–2330.
34. Gulov A. N. Analysis of cryopreserved semen of drones / A. N. Gulov, Z. N. Sayfutdinova, E. O. Larkina // *Beekeeping*. — 2019. — № 2. — P. 16–18.
35. Larkina E. O. Instrumental insemination of the uterus of honey bees using drone semen diluted in various nutrient media / E. O. Larkina, D. V. Galitskaya // In the monograph «Modern problems of beekeeping and apitherapy». — Fish: Federal State Budgetary Institution Scientific Center for Beekeeping. — 2019. — P. 149–155.
36. Hopkins B. K. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa / B.K. Hopkins, C. Herr // *Apidologie*. — 2010. — V. 41. — P. 548–556.
37. Ostashko F. I. Deep freezing and long-term storage of sperm of producers / F. I. Ostashko // K.: Harvest, 1978. — 256 p.