

## КАЧЕСТВО СПЕРМЫ БЫКОВ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *AQP7*, *STK35*, *IFT27* И *PRM1* В СПЕРМАТОЗОИДАХ: КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

© 2024 г. О. Ю. Баркова<sup>1</sup>\*, Д. А. Старикова<sup>1</sup>, И. В. Чистякова<sup>1</sup>, Н. В. Плешанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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”, Пушкин, Санкт-Петербург, 196601 Россия

\*e-mail: barkoffws@list.ru

Поступила в редакцию 31.07.2024 г.

После доработки 12.08.2024 г.

Принята к публикации 25.08.2024 г.

Оценка экспрессии специфичных для сперматозоидов генов – потенциальный ресурс для диагностики нарушенного спермиогенеза, криорезистентности и фертильности этих половых клеток. Это важные показатели качества сперматозоидов, которые необходимо учитывать при отборе быков-производителей для сбора спермы, предназначенной для криоконсервации. Нами проведен корреляционный анализ уровней экспрессии генов *AQP7*, *STK35*, *IFT27* и *PRM1* с показателями качества сперматозоидов в нативной и декриоконсервированной сперме быков голштинской породы. Выявлена высокодостоверная положительная корреляция между уровнями экспрессии *AQP7*, *IFT27* и *PRM1* с несколькими показателями жизнеспособности сперматозоидов и отрицательная – с показателями, характеризующими потерю их функциональности. Результаты исследования могут быть использованы для разработки транскрипционных биомаркеров качества спермы быков-производителей по параметрам криотолерантности и оплодотворяющего потенциала сперматозоидов.

**Ключевые слова:** быки, сперматозоиды, криоконсервация, криотолерантность, экспрессия генов, биомаркеры

**DOI:** 10.56304/S023427582405003X

Крупный рогатый скот входит в число криочувствительных видов, для которых стандартная схема заморозки и оттаивания спермы несет повышенные риски повреждения ДНК мужских гамет и снижения ее оплодотворяющей способности [1, 2]. В последние годы с помощью омиксных технологий пополняются базы данных о роли тех или иных генов, транскриптов и белков в обеспечении криорезистентности и фертильности половых клеток. Относительно новым подходом в данной сфере исследований во всем мире является анализ профилей транскриптов сперматозоидов и ассоциация уровней экспрессии определенных генов с различной криорезистентностью спермы [2–4]. G. Hernández-Silva с соавт. [5] предполагают, что специфические мРНК в эякулированных сперматозоидах могут быть маркерами потенциала мужской фертильности, тогда как из обычного анализа спермы этой информации извлечь нельзя. Следовательно, мРНК сперматозоидов – это потенциальный диагностический ресурс, который позволит охарактеризовать клинические проявления нарушенного сперматогенеза и спермиогенеза.

В качестве исследуемых генов нами были отобраны гены протамин-1 (*PRM1*), аквапорина (*AQP7*), серин/треонинкиназы-35 (*STK35*) и компонента-27 внутригугутикового транспортного комплекса (*IFT27*). Протамин-1 (*PRM1*) – это ядерный белок, который специфически экспрессируется в гаплоидных мужских зародышевых клетках и защищает ДНК сперматозоидов от негативного воздействия факторов окружающей среды путем гиперконденсации хроматина с помощью гистонов. Следовательно, более чем вероятно, что правильная экспрессия протамин-1 представляет собой своего рода контрольную точку хроматина в цикле продукции сперматозоидов [6, 7]. Это значит, что протамины следует рассматривать как потенциальные биомаркеры качества спермы. Например, доказано, что нарушение соотношения в экспрессии генов, кодирующих протамин-1 и протамин-2 (*PRM1* и *PRM2*), ассоциировано с негативными изменениями спермы, такими как астеноспермия и тератозооспермия [8], а адекватное соотношение экспрессии *PRM1/PRM2* (1 : 2) считается биомаркером хорошей функции сперматозоидов и фертильности [9].

Протеинкиназа STK35, также известная как CLK1 и STK35L1, обладает функцией аутофосфорилирования, функционально связана с активными стрессовыми волокнами, прогрессированием клеточного цикла, пролиферацией и ангиогенезом клеток [10]. Предполагают, что локализованный в ядре белок импортин- $\alpha 2$  (IMP- $\alpha 2$ ) участвует в регуляции транскрипции *STK35* во время сперматогенеза [11]. В нескольких базах данных, включая NCBI, представлена информация о повышенных уровнях мРНК *STK35* в семенниках и яичниках мыши по сравнению с другими тканями, из чего следует вывод о возможном участии *STK35* в функционировании клеток этих органов [12].

Компонент внутрижгутикового транспортного комплекса IFT27 (RABL4) играет критическую роль в подвижности и метаболизме сперматозоидов. Заметим, что связанные с IFT белки экспрессируются во время сперматогенеза и играют важную роль в продукции спермы. Что касается IFT27, это компонент небольшого GTP-подобного компонента комплекса IFT-B. Роль IFT27 во внутрижгутиковом транспорте реализуется в основном в тканях, богатых реснитчатыми клетками, таких как почки и яички. Этот белок необходим для мужской фертильности, спермиогенеза и образования жгутиков сперматозоидов, а также участвует в раннем развитии почек и регуляции закладки почек мочеточников. Нарушение работы IFT27 приводит к аномалии жгутиков [13]. А. Mańkowska и соавт. [14] показали, что IFT27 локализован в области средней части сперматозоида и через взаимодействие с RABL2 (RAS oncogene facility-like 2) участвует в транспортировке необходимых для гликолиза белков к фиброзной оболочке сперматозоида. Кроме того, комплекс IFT25/IFT27 играет важную роль в сборке структуры ядра аксономы сперматозоидов.

Осморегуляция играет жизненно важную роль в функционировании сперматозоидов, включая сперматогенез, созревание и оплодотворение. Аквапорин-7 (AQP7) — один из четырех аквапоринов — защищает сперматозоид от осмотических изменений путем эффективного контроля проникновения воды и глицерина в оболочку [15, 16]. Заметим, что глицерин служит важным субстратом для биоэнергетики сперматозоидов. Рядом авторов изучена локализация и экспрессия гена *AQP7* в сперматозоидах быков и хряков и выявлена положительная корреляция между его экспрессией и криорезистентностью, подвижностью и оплодотворяющей способностью этих половых клеток [17–19].

Цель представленной работы заключалась в проведении корреляционного анализа уровней экспрессии генов *AQP7*, *STK35*, *IFT27* и *PRM1* с показателями качества сперматозоидов в нативной

и декриоконсервированной сперме быков голштинской породы.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### *Материалы исследования*

Всего было исследовано 19 проб нативной и 19 проб декриоконсервированной спермы быков голштинской породы в возрасте от 1 года до 3 лет, содержащихся на базе АО “Невское” (Санкт-Петербург, Россия). Одна проба состояла из 3 пайет с дозой спермы объемом 0.5 мл в каждой, концентрация варьировала в диапазоне  $(0.7–1.65) \times 10^9$  клеток/мл. Процедуру криоконсервации спермы проводили на АО “Невское” с использованием в качестве растворителя OptiXcell (IMV Technologies, Франция) в соотношении 1 : 1. Подвижность и концентрацию половых клеток свежего эякулята оценивали с использованием камеры Маклера (Sefi Medical Instrument, Италия).

Перед проведением экспериментов свежий эякулят разбавляли в среде HBSS (Sigma-Aldrich, США), доводя до объема 500 мкл. Концентрацию клеток проверяли на фотометре SDM 1 (Minitube, Германия) и доводили до не превышающей  $(4 \times 10^6)$  клеток/мл. Клетки дважды переосаждали путем центрифугирования на микроцентрифуге M1324 (RWD Life Science, Китай) при 1500 об/мин и 37°C в течение 10 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1.5 мл среды HBSS. Полученные образцы использовали для получения РНК, анализа морфологии клеток, оценки биохимических показателей мужских гамет.

### *Анализ морфологии и оценка биохимических показателей сперматозоидов*

Мазок эякулята окрашивали с использованием набора Диахим-Дифф-Квик (НПФ “АБРИС+”, Россия), согласно рекомендациям производителя. На каждом высушенном при комнатной температуре препарате наблюдали 200 сперматозоидов. Сперматозоиды анализировали при увеличении  $\times 100$ , под иммерсией (с нанесением на препарат капли минерального масла) на световом микроскопе Olympus Vanox-T (Olympus Life Science, Япония).

Анализ целостности мембран, жизнеспособности, мембранного потенциала митохондрий и уровня активных форм кислорода (АФК) проводили с использованием проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Результаты анализировали с помощью программы CytExpert 2.4.

Целостность и жизнеспособность клеточных мембран анализировали с использованием интеркалирующих красителей: окрашивающего живые клетки SYBR Green I (“Евроген”, Россия) и окрашивающего мертвые клетки йодида пропидия (Servicebio, Китай). При оценке мембранного

**Таблица 1.** Олигонуклеотидные праймеры, использованные для анализа экспрессии исследуемых генов  
**Table 1.** Oligonucleotide primers used to analyze the expression of the genes under study

Ген	Праймер		$T_m$ , °C	Продукт, п.н.
	направление	последовательность, 5' → 3'		
<i>PRM1</i>	F	ATGGCCAGATACCGATGCTG	59.96	166
	R	ACCCTCTTCACCTCTCCTCC	59.96	
<i>STK35</i>	F	GTGGAGACCTCGCTCAAAGG,	60.39	135
	R	GGAAAGGAGGGTGTGTCCG	60.00	
<i>AQP7</i>	F	AGGCAACTGGGAGCATAAGG	59.74	153
	R	GTTCCTTCCCCAGCCACTC	60.00	
<i>IFT27</i>	F	GACAACAGGGGTGGATCTGG	60.00	123
	R	TCTCCAGAGTGGAGGACAG	60.00	
<i>GLUT5</i>	F	TGACCTACCACCAACCCTGA	60.10	194
	R	CATGCCTGTGGCTACCAGAA	60.04	
<i>GAPDH</i>	F	CCGCAAGGAGAАCTCAAGGT	59.96	163
	R	CGGCCAAGCAAAAATTGGA	59.97	

*Примечание:* F (forward) – прямой праймер; R (reverse) – обратный праймер;  $T_m$  (melting temperature) – температура плавления.  
*Note:* F – forward primer; R – reverse primer;  $T_m$  – melting temperature.

потенциала митохондрий клетки сперматозоидов окрашивали флуоресцентным липофильным карбоцианиновым красителем JC-1 (Servicebio).

Содержание ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ) определяли по интенсивности окрашивания зеленым флуоресцентным красителем – индикатором внутриклеточного кальция Fluo3 (Servicebio).

Уровень АФК в нативных и деконсервированных сперматозоидах оценивали по окрашиванию спермы красителем  $H_2DCFDA$  (2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетат; “Lumiprobe”, Россия).

#### Выделение и амплификация целевых мРНК

Перед выделением РНК образцы спермы очищали от соматических и мертвых клеток путем центрифугирования в градиенте фикола (“Биолот”, Россия) [20]. РНК из нативной и деконсервированной спермы выделяли с использованием набора ExtractRNA (“Евроген”) по протоколу производителя. Полученные образцы РНК обрабатывали термолабильной ДНКазой EM-100 (“Биолабмикс”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию РНК, измеренную на спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США), доводили до 100 нг/мл. Дизайн олигонуклеотидных праймеров для анализа экспрессии исследуемых генов (табл. 1) проводили на основании информации, представленной в международных базах данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> и [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), с использованием компьютерной программы PRIMER\_3 ([www.genome.wi.mit.edu](http://www.genome.wi.mit.edu)). Для оценки относительной экспрессии целевых генов в качестве рефе-

ренсных использовали *GAPDH* и *GLUT5* (табл. 1). Для синтеза кДНК использовали обратную транскриптазу Mint (“Евроген”) согласно инструкции производителя. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл.

Для амплификации кДНК использовали технологию ПЦР в режиме реального времени в реакционной смеси 5× qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”) с красителем SYBR Green I в соответствии с рекомендациями производителя. Реакцию проводили на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) в следующем режиме: 40 циклов [5 мин при 95°C, 15 с при 95°C, 15 с при 59°C], 20 с при 72°C. Для каждого образца обе стадии: обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени – проводили в трех повторах. Для количественного определения уровня экспрессии целевых генов использовали метод  $2^{-\Delta C_T}$  [34]. Эффективность праймеров ( $E$ ) рассчитывали по формуле:  $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$  – в автоматическом режиме амплификатора. Для всех пар праймеров выполнялся критерий:  $90 < E < 110$  при  $R^2 \geq 0.980$ , – что указывало на их высокую надежность.

#### Статистическая обработка результатов

Статистическую значимость различий исследуемых параметров между группами оценивали методами непараметрического однофакторного анализа ANOVA, а анализ ранговой корреляции проводили с использованием критерия Спирмена в программе SigmaPlot 14.0.

**Таблица 2.** Относительная экспрессия исследованных генов в нативных и декриоконсервированных сперматозоидах  
**Table 2.** Relative expression of the studied genes in native and decryopreserved spermatozoa

Сперматозоиды <sup>a</sup>	Ген				
	Название	Относительная экспрессия	Статистические параметры <sup>b</sup>		
			М	SD	P
Нативные	<i>ITF27</i>	0.588 ± 0.094	0.464	0.413	0.609
д/к <sup>c</sup>		1.548 ± 0.732	0.510	3.190	
Нативные	<i>STK35</i>	0.378 ± 0.065	0.276	0.286	0.759
д/к		1.263 ± 0.541	0.281	2.360	
Нативные	<i>PRM1</i>	1.732 ± 1.328	0.325	5.787	0.672
д/к		11.598 ± 10.404	0.276	45.349	
Нативные	<i>AQP7</i>	0.443 ± 0.148	0.256	0.647	0.343
д/к		1.371 ± 0.853	0.223	3.719	

*Примечание:* <sup>a</sup> Каждый образец сперматозоидов получен от 19 быков голштинской породы; <sup>b</sup> приведены медианные значения (М), стандартное отклонение (SD) и *p*-value (*P*), рассчитанные методом непараметрического однофакторного анализа ANOVA; <sup>c</sup> декриоконсервированные сперматозоиды.

*Note:* <sup>a</sup> Each sperm sample was obtained from 19 Holstein bulls; <sup>b</sup> median (M), standard deviation (SD) and *p*-value (*P*) calculated by nonparametric one-factor ANOVA analysis are given; <sup>c</sup> decryopreserved spermatozoa.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенного анализа для всех исследованных генов: *AQP7*, *STK35*, *ITF27* и *PRM1* – была выявлена повышенная экспрессия в декриоконсервированных сперматозоидах по сравнению с нативными. Однако, несмотря на значительные различия средних значений относительной экспрессии в нативных и декриоконсервированных сперматозоидах, статистически значимых различий не зарегистрировано, что, по-видимому, связано с использованием непараметрических методов статистического расчета по медиане признака (табл. 2).

Анализ корреляционных связей выявил разную степень зависимости между уровнем экспрессии исследуемых генов и важными показателями качества спермы.

Транскрипт гена *AQP7* имел достоверную среднюю положительную корреляцию с общим числом клеток, содержанием нормальных клеток, высокой степенью поляризации митохондриальных мембран в нативных и декриоконсервированных сперматозоидах. Положительное корреляционное влияние экспрессии гена *AQP7* на признаки спермы подтверждалось достоверной высокой отрицательной корреляцией с такими признаками, как низкая степень поляризации митохондриальных мембран, дефект акросомы и содержание дефектных сперматозоидов в нативной и декриоконсервированной сперме (табл. 3).

Высокий потенциал митохондриальной мембраны считается одним из наиболее значимых показателей активности сперматозоидов. Он отражает работу митохондрии и имеет фундамен-

тальное значение для подвижности сперматозоида и его оплодотворяющей способности. Митохондриальный потенциал непосредственно вовлечен в механизмы генерации АТФ и АФК, а также в регуляцию окислительно-восстановительного равновесия и уровня кальция в клетке [21]. R. Kasimanickam и др. [22] обнаружили достоверную корреляцию между содержанием мРНК *AQP7* и относительным изменением объема спермы ( $r = 0.73$ ,  $P < 0.05$ ), частотой оплодотворения ( $r = 0.67$ ,  $P < 0.05$ ) у быков-производителей голштинской породы: у быков с более высоким показателем частоты оплодотворения содержание мРНК *AQP7* в замороженной–размороженной сперме было значительно выше [22]. С каждым годом появляется все больше информации по аквапоринам не только как о порах для небольших растворенных веществ, но и как о реальных участниках сигнальных путей. Недавно J. Ribeiro и др. [23] показали, что белок *AQP7* играет ключевую роль в проницаемости глицерина – в присутствии его специфического ингибитора Z433927330 на 55% снижалась диффузия глицерина через мембрану сперматозоидов и усиливалась астенозооспермия. Кроме того, экспрессия гена *AQP7* была повышена в здоровых сперматозоидах по сравнению со сперматозоидами с разной патологией. Следовательно, экспрессия гена *AQP7* может служить ценным показателем продуктивности сперматозоидов и их функции.

Для экспрессии гена *ITF27* выявлена высокозначимая отрицательная корреляция с показателем дефекта акросомы в замороженной–размороженной сперме и близкая к достоверной для нативной спермы. Также найдена высокодосто-

**Таблица 3.** Анализ корреляционных связей между уровнем относительной экспрессии исследуемых генов и показателями качества спермы быков

**Table 3.** Analysis of correlations between the level of relative expression of the studied genes and bull sperm quality indicators

Сперма		Корреляции Спирмена ( <i>r</i> ) для показателей качества спермы и экспрессии целевых генов <sup>a</sup>							
показатель качества	состояние	AQP7		PRM1		STK35		ITF27	
		<i>r</i>	<i>p</i> -value	<i>r</i>	<i>p</i> -value	<i>r</i>	<i>p</i> -value	<i>r</i>	<i>p</i> -value
Концентрация клеток (10 <sup>6</sup> /мл)	Нативное	-0.357	0.129	-0.296	0.219	-0.386	0.136	-0.404	0.086
	д/к <sup>b</sup>	0.005	0.980	-0.0417	0.865	-0.009	0.969	-0.156	0.523
Подвижность (баллы)	Нативное	-0.308	0.197	-0.330	0.167	-0.266	0.314	-0.190	0.435
	д/к	0.019	0.934	-0.435	0.064	0.007	0.976	0.182	0.456
Общее число клеток (клеток/мкл)	Нативное	0.460	<b>0.040</b>	<b>0.549</b>	<b>0.015</b>	0.232	0.438	<b>0.712</b>	<b>0.000</b>
	д/к	0.103	0.667	0.315	0.184	<b>0.765</b>	<b>0.000</b>	<b>0.560</b>	<b>0.012</b>
Нормальные клетки (клеток/мкл)	Нативное	0.540	<b>0.016</b>	<b>0.735</b>	<b>0.000</b>	<b>-0.576</b>	<b>0.009</b>	<b>0.556</b>	<b>0.013</b>
	д/к	-0.035	0.883	<b>0.515</b>	<b>0.046</b>	<b>-0.589</b>	<b>0.015</b>	0.255	0.292
Дефектные клетки (клеток/мкл)	Нативное	0.742	<b>0.000</b>	<b>-0.501</b>	<b>0.028</b>	<b>0.542</b>	<b>0.029</b>	-0.074	0.761
	д/к	-0.170	0.480	<b>-0.701</b>	<b>0.000</b>	<b>0.608</b>	<b>0.012</b>	-0.002	0.986
Дефектные акросомы (клеток/мкл)	Нативное	-0.491	<b>0.032</b>	0.411	0.079	0.058	0.809	<b>-0.427</b>	<b>0.067</b>
	д/к	-0.720	<b>0.000</b>	0.323	0.174	0.143	0.555	<b>-0.731</b>	<b>0.000</b>
Мертвые клетки (клеток/мкл)	Нативное	-0.107	0.657	0.160	0.507	<b>-0.016</b>	<b>0.945</b>	0.123	0.616
	д/к	0.012	0.957	0.022	0.922	0.067	0.797	0.043	0.860
Живые клетки (клеток/мкл)	Нативное	0.233	0.330	0.325	0.171	-0.176	0.505	0.384	0.105
	д/к	-0.237	0.323	-0.022	0.922	<b>-0.671</b>	<b>0.004</b>	-0.194	0.427
Низкая степень поляризации митохондриальных мембран (%)	Нативное	-0.137	0.657	0.105	0.662	-0.215	0.416	-0.135	0.575
	д/к	<b>-0.688</b>	<b>0.001</b>	-0.400	0.080	<b>-0.708</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.647</b>	<b>0.003</b>
Средняя степень поляризации митохондриальных мембран (%)	Нативное	0.337	0.570	0.353	0.140	<b>0.457</b>	<b>0.073</b>	0.336	0.157
	д/к	0.238	0.319	<b>0.400</b>	<b>0.089</b>	<b>0.564</b>	<b>0.022</b>	<b>0.560</b>	<b>0.012</b>
Высокая степень поляризации митохондриальных мембран (%)	Нативное	-0.262	0.274	-0.145	0.550	-0.316	0.228	-0.169	0.484
	д/к	<b>0.527</b>	<b>0.020</b>	<b>0.536</b>	<b>0.018</b>	<b>0.693</b>	<b>0.002</b>	<b>0.603</b>	<b>0.006</b>
Низкое содержание Ca <sup>2+</sup> (%)	Нативное	0.286	0.244	<b>0.738</b>	<b>0.000</b>	0.257	0.346	0.319	0.192
	д/к	-0.031	0.894	0.038	0.871	0.132	0.617	0.094	0.700
Среднее содержание Ca <sup>2+</sup> (%)	Нативное	-0.112	0.641	0.119	0.620	-0.047	0.856	-0.068	0.776
	д/к	0.272	0.255	0.400	0.075	<b>0.594</b>	<b>0.015</b>	<b>0.449</b>	<b>0.053</b>
Высокое содержание Ca <sup>2+</sup> (%)	Нативное	0.089	0.710	-0.028	0.905	0.015	0.952	0.275	0.249
	д/к	-0.125	0.605	-0.200	0.405	-0.171	0.519	-0.095	0.700
Очень высокое содержание Ca <sup>2+</sup> (%)	Нативное	-0.134	0.580	-0.049	0.837	-0.150	0.571	-0.130	0.590
	д/к	0.143	0.555	0.143	0.555	-0.045	0.881	0.034	0.888
АФК	Нативное	-0.133	0.580	0.182	0.448	-0.121	0.615	0.035	0.883
	д/к <sup>b</sup>	-0.104	0.667	-0.223	0.353	<b>-0.451</b>	<b>0.051</b>	<b>-0.537</b>	<b>0.017</b>

Примечание: <sup>a</sup> Полужирным шрифтом выделены статистически значимые корреляции; <sup>b</sup> декриоконсервированные сперматозоиды.  
 Note: <sup>a</sup> Statistically significant correlations are highlighted in bold; <sup>b</sup> decryopreserved spermatozoa.

верная отрицательная корреляция с другими неблагоприятными признаками сперматозоидов, такими как содержание АФК и низкая степень поляризации митохондриальных мембран, в декриоконсервированной сперме. В то же время отмечена достоверная положительная связь с содержанием нормальных клеток в нативной сперме, общим числом клеток, высокой и средней степенью поляризации митохондриальных мембран и средним содержанием  $\text{Ca}^{2+}$  в декриоконсервированной сперме (табл. 3).

Известно, что чрезмерное повышение концентрации внутриклеточного кальция характерно для сперматозоидов с нарушенной целостностью цитоплазматической мембраны. Это ведет к преждевременной капацитации и сильно снижает оплодотворяющую способность спермы. Кроме того, в этих условиях усиливается генерация АФК и, как следствие, апоптоз, что приводит к преждевременной гибели клеток [24, 25]. Процедура криоконсервации активно запускает оба вышеуказанных процесса.

Корреляционный анализ уровня экспрессии гена *STK35* с продуктивными признаками спермы не дал адекватной оценки. Так, экспрессия *STK35* со средней степенью достоверности отрицательно коррелировала с содержанием как нормальных, так и живых клеток при положительной корреляционной связи с общим числом клеток, высокой и средней степенью поляризации митохондриальных мембран и средним содержанием  $\text{Ca}^{2+}$ . Также для этого гена выявлена отрицательная корреляция с содержанием АФК и поляризацией митохондриальных мембран (табл. 3). Согласно данным Y. Yasuda и др. [26], конститутивная сверхэкспрессия белков *STK35* усиливала независимую от каспаз гибель клеток в условиях окислительного стресса. N. Prieto-Martínez и др. [19] выявили, что гены *STK35* и *IFT27* дифференциально экспрессируются в сперматозоидах хряков с высокой и низкой криотолерантностью спермы, а определенные полиморфные варианты в 5'-фланкирующих регуляторных областях генов *STK35* и *IFT27* можно рассматривать как потенциальные генетические маркеры для прогнозирования криорезистентности спермы хряка.

Уровень экспрессии гена *PRM1* имел высокодостоверную положительную корреляцию с содержанием нормальных клеток и содержанием живых клеток в нативной и в замороженной–размороженной сперме. Транскрипт гена *PRM1* имел высокодостоверную отрицательную связь с низким уровнем  $\text{Ca}^{2+}$  в нативной сперме и высокой степенью поляризации митохондриальных мембран в декриоконсервированных сперматозоидах. S. Carreau и др. [27] обнаружили, что уровень мРНК *PRM1* значительно выше в низкоподвижной, чем в высокоподвижной фракции сперматозоидов. Одна-

ко относительная экспрессия гена *PRM1* и содержание белка *PRM1* были достоверно выше у быков с высоким качеством спермы, чем с низким ( $p < 0.05$ ), и достоверно положительно коррелировали ( $p < 0.01$ ) с фертильностью. Таким образом, ген *PRM1* можно рассматривать в качестве потенциального кандидата на маркеры фертильности у быков [28].

На основании полученных данных можно считать исследованные гены: *AQP7*, *ITF27*, *PRM1* — перспективными маркерами качества спермы, так как их экспрессия положительно коррелирует с некоторыми показателями жизнеспособности сперматозоидов и отрицательно — с определяющими нежизнеспособность. Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшей разработки генетических маркеров функциональности и криорезистентности спермы быков-производителей голштинской породы.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках работ по гранту Российского научного фонда (№ 22-76-10041).

## ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все эксперименты с животными проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 2013 года и были одобрены Комиссией по этике Российского научно-исследовательского института генетики и селекции сельскохозяйственных животных — филиала ФГБНУ ФНЦ животноводства им. Л.К. Эрнста (протокол № 2020-4 от 03.03.2020).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grötter L.G., Cattaneo L., Marini P.E., Kjelland M.E., Ferré L.B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reprod. Domest. Anim.*, 2019, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
2. Khan M.Z., Sathanawongs A., Zhang Y. Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. *Front. Vet. Sci.*, 2021, 8, 609180. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
3. Aliakbari F., Eshghifar N., Mirfakhraie R., Pourghorban P., Azizi F. Coding and non-coding RNAs, as male fertility and infertility biomarkers. *Int. J. Fertil. Steril.*, 2021, 15(3), 158–166. <https://doi.org/10.22074/IJFS.2021.134602>
4. Selvaraju S., Ramya L., Parthipan S., Swathi D., Bin-sila B.K. Deciphering the complexity of sperm tran-

- scriptome reveals genes governing functional membrane and acrosome integrities potentially influence fertility. *Cell Tissue Res.*, 2021, 385(1), 207–222. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03443-6>
5. *Hernández-Silva G., Caballero-Campo P., Chirinos M.* Sperm mRNAs as potential markers of male fertility. *Reprod. Biol.*, 2022, 22(2), 100636. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100636>
  6. *Steger K., Balhorn R.* Sperm nuclear protamines: a checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anat. Histol. Embryol.*, 2018, 47(4), 273–279. <https://doi.org/10.1111/ahc.12361>
  7. *Rogenhofer N., Ott J., Pilatz A., Wolf J., Thaler C.J., Windischbauer L.* Unexplained recurrent miscarriages are associated with an aberrant sperm protamine mRNA content. *Hum. Reprod.*, 2017, 32(8), 1574–1582. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex224>
  8. *Moghbelinejad S., Najafipour R., Hashjin A.S.* Comparison of protamine 1 to protamine 2 mRNA ratio and *YBX2* gene mRNA content in testicular tissue of fertile and azoospermic men. *Int. J. Fertil. Steril.*, 2015, 9(3), 338–345. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2015.4549>
  9. *Aoki V.W., Liu L., Jones K.P., Hatasaka H.H., Gibson M., Peterson C.M.* Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil. Steril.*, 2006, 86(5), 1408–1415. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.04.024>
  10. *Miyamoto Y., Whiley P.A.F., Goh H.Y.* The *STK35* locus contributes to normal gametogenesis and encodes a lncRNA responsive to oxidative stress. *Biol. Open*, 2018, 7(8), 26–31. <https://doi.org/10.1242/bio.032631>
  11. *Hogarth C.A., Calanni S., Jans D.A., Loveland K.L.* Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Dev. Dyn.*, 2006, 5(1), 253–262. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20569>
  12. *Lizio M., Harshbarger J., Shimoji H., Severin J., Kasukawa T., Sahin S., Abugessaisa I., Fukuda S., Hori F., Ishikawa-Kato S., Mungall C.J., Arner E., Baillie J.K., Bertin N., Bono H., de Hoon M., Diehl A.D., Dimont E., Freeman T.C., Fujieda K., Hide W., Kaliyaperumal R., Katayama T., Lassmann T., Meehan T.F., Nishikata K., Ono H., Rehli M., Sandelin A., Schultes E.A., 't Hoen P.A., Tatum Z., Thompson M., Toyoda T., Wright D.W., Daub C.O., Itoh M., Carninci P., Hayashizaki Y., Forrest A.R., Kawaji H.* Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol.*, 2015, 16(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0560-6>
  13. *Zhang Y., Liu H., Li W., Zhang Z., Shang X., Zhang D., Li Y., Zhang S., Liu J., Hess R.A., Pazour G.J., Zhang Z.* Intraflagellar transporter protein (IFT27), an IFT25 binding partner, is essential for male fertility and spermiogenesis in mice. *Dev. Biol.*, 2017, 432(1), 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.023>
  14. *Mańkowska A., Brym P., Sobiech P., Fraser L.* Promoter polymorphisms in *STK35* and *IFT27* genes and their associations with boar sperm freezability. *Theriogenology*, 2022, 189, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.023>
  15. *Calamita G., Delporte C.* Involvement of aquaglyceroporins in energy metabolism in health and disease. *Biochimie*, 2021, 188, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.03.001>
  16. *Falato M., Chan R., Chen L.Y.* Aquaglyceroporin AQP7's affinity for its substrate glycerol: have we reached convergence in the computed values of glycerol-aquaglyceroporin affinity? *RSC Adv.*, 2022, 12(5), 3128–3135. <https://doi.org/10.1039/d1ra07367b>
  17. *Fujii T., Hirayama H., Fukuda S., Kageyama S., Naito A., Yoshino H., Moriyasu S., Yamazaki T., Sakamoto K., Hayakawa H.* Expression and localization of aquaporins 3 and 7 in bull spermatozoa and their relevance to sperm motility after cryopreservation. *J. Reprod. Dev.*, 2018, 64(4), 327–335. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-166>
  18. *Prieto-Martínez N., Morató R., Muiño R., Hidalgo C.O., Rodríguez-Gil J.E., Bonet S., Yeste M.* Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa: identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2017, 29(6), 1249–1259. <https://doi.org/10.1071/RD16077>
  19. *Prieto-Martínez N., Vilagran I., Morató R., Rivera Del Álamo M.M., Rodríguez-Gil J.E., Bonet S., Yeste M.* Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures. *Andrology*, 2017, 5(6), 1153–1164. <https://doi.org/10.1111/andr.12410>
  20. *Highland H.N., Rishika A.S., Almira S.S., Kanthi P.B.* Ficoll-400 density gradient method as an effective sperm preparation technique for assisted reproductive techniques. *J. Hum. Reprod. Sci.*, 2016, 9(3), 194–199. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.192070>
  21. *Carrageta D.F., Freire-Brito L., Oliveira P.F., Alves M.G.* Evaluation of human spermatozoa mitochondrial membrane potential using the JC-1 dye. *Curr. Protoc.*, 2022, 2(9), 531. <https://doi.org/10.1002/cpz1.531>
  22. *Kasimanickam R.K., Kasimanickam V.R., Arangasamy A., Kastelic J.P.* Associations of hypoosmotic swelling test, relative sperm volume shift, aquaporin7 mRNA abundance and bull fertility estimates. *Theriogenology*, 2017, 89, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.011>
  23. *Ribeiro J.C., Bernardino R.L., Gonçalves A., Barros A., Calamita G., Alves M.G., Oliveira P.F.* Aquaporin-7-mediated glycerol permeability is linked to human sperm motility in asthenozoospermia and during sperm capacitation. *Cells*, 2023, 12(15), 2003. <https://doi.org/10.3390/cells12152003>
  24. *Hezavehei M., Sharafi M., Kouchesfahani H.M., Henkel R., Agarwal A., Esmaeili V., Shahverdi A.* Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online*, 2018, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
  25. *Treulen F., Arias M.E., Aguila L., Uribe P., Felmer R.* Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. *Cryobiology*, 2018, 83, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.001>

26. Yasuda Y., Miyamoto Y., Yamashiro T., Asally M., Masui A., Wong C., Loveland K.L., Yoneda Y. Nuclear retention of importin  $\alpha$  coordinates cell fate through changes in gene expression. *EMBO J.*, 2012, 31(1), 83–94.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.360>
27. Carreau S., Lambard S., Said L., Saad A., Galeraud-Denis I. RNA dynamics of fertile and infertile spermatozoa. *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, 35(Pt. 3), 634–636.  
<https://doi.org/10.1042/BST0350634>
28. Pardede B.P., Agil M., Karja N.W.K., Sumantri C., Supriatna I., Purwantara B. *PRM1* gene expression and its protein abundance in frozen-thawed spermatozoa as potential fertility markers in breeding bulls. *Vet. Sci.*, 2022, 9(3), 111.  
<https://doi.org/10.3390/vetsci9030111>

## Semen Quality of Holstein Bulls and Expression of *AQP7*, *STK35*, *ITF27* and *PRM1* Genes: Correlation Analysis

O. Yu. Barkova<sup>a, #</sup>, D. A. Starikova<sup>a</sup>, I. V. Chistyakova<sup>a</sup>, and N. V. Pleshanov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals (VNIIGRZh) – Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, 196601 Russia

<sup>#</sup>e-mail: barkoffws@list.ru

**Abstract**—Evaluation of sperm-specific gene expression is a potential resource for diagnostics of impaired spermiogenesis, cryoresistance and fertility of these germ cells. These are important indicators of sperm quality, which should be taken into account when selecting breeding bulls for collecting semen intended for cryopreservation. Here, a correlation analysis of the expression levels of *AQP7*, *STK35*, *ITF27* and *PRM1* genes with sperm quality indicators in native and decryopreserved sperm of Holstein bulls was carried out. We found a highly reliable positive correlation between the expression of *AQP7*, *ITF27*, *PRM1* with a number of spermatozoa viability indicators and a negative one with indicators characterizing the loss of their functionality. The results obtained can be used for developing transcriptional biomarkers of sperm quality in breeding bulls based on the parameters of cryotolerance and fertilizing potential of spermatozoa.

**Keywords:** bulls, spermatozoa, cryopreservation, cryotolerance, gene expression, biomarkers