

**Репродуктивные технологии**

УДК 636.11:591.1

doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1184rus

**РЕПРОДУКТИВНАЯ ФУНКЦИЯ ЖЕРЕБЦОВ ЧИСТОКРОВНОЙ АРАБСКОЙ ПОРОДЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА, ОЦЕНЕННОГО ПО СОСТАВУ ВОЛОСА ИЗ ГРИВЫ\***В.А. БАГИРОВ<sup>1</sup>, В.В. КАЛАШНИКОВ<sup>2</sup>, А.М. ЗАЙЦЕВ<sup>2</sup>, М.М. АТРОЩЕНКО<sup>2</sup>, С.А. МИРОШНИКОВ<sup>3, 4</sup>, О.А. ЗАВЬЯЛОВ<sup>3</sup>, А.Н. ФРОЛОВ<sup>3</sup>

В современном животноводстве наряду с совершенствованием репродуктивных технологий все более актуальным становится восстановление естественной фертильности животных, в особенности племенных производителей. Известно, что репродуктивная функция — одна из наиболее чувствительных к воздействию условий окружающей среды. Важную группу экофизиологических факторов, определяющих морфофункциональные характеристики репродуктивной системы, составляют химические элементы. Среди элементов, влияющих на качественные характеристики спермы, можно выделить жизненно важные макроэлементы (Na, K, Ca, Mg и др.), микроэлементы (Zn, Cu, Mn, Co, Se), а также токсичные элементы (Pb, Cd, Hg и др.), содержание которых даже в небольшом количестве очень вредно и опасно. В настоящем исследовании, выполненном на жеребцах чистокровной арабской породы ( $n = 50$ ), разводимых в условиях одной биогеохимической провинции (Терский племенной конный завод № 169, Ставропольский край, 2016-2017 годы), элементный статус оценивали по содержанию химических элементов в волосе из гривы. Биоматериалом также служила свежая и криоконсервированная сперма. Животные были распределены на группы в зависимости от количества отдельных элементов в волосах: до 25-го перцентиля, в границах интервала 25-75-й перцентиль, выше 75-го перцентиля. Элементный состав волос определяли по 25 химическим элементам (Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, I, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Se, Si, Sn, Hg, Sr, V, Zn) методами атомно-эмиссионной и масс-спектрометрии. Эякуляты оценивали по объему, концентрации, общему числу сперматозоидов и количеству сперматозоидов с прогрессивной подвижностью, выживаемости. Достоверность различий проверяли при помощи U-критерия Манна-Уитни. Увеличение среднестатистических значений содержания в волосах стронция до  $4,19 \pm 0,12$ , селена — до  $0,559 \pm 0,015$ , бора — до  $21,55 \pm 1,14$  мкг/г оказалось сопряжено со снижением объема фильтрата, количества и активности сперматозоидов. Активность и выживаемость сперматозоидов после оттаивания находилась в обратной зависимости от размера обменного пула свинца и олова в организме жеребцов. При увеличении количества этих элементов в волосе до  $0,806 \pm 0,206$  и  $0,051 \pm 0,008$  мкг/г активность сперматозоидов после оттаивания снижалась на 3,8-7,7 %, выживаемость — на 26,4-29,5 %. Наибольшей активностью сперматозоидов характеризовались животные с низким (менее 25-го перцентиля) содержанием в волосах меди, кремния и ванадия. Показатель выживаемости свежей спермы находился под влиянием количества ванадия и характеризовался наибольшей величиной в группах животных с низким содержанием этого элемента в волосе. Таким образом, элементный анализ волос из гривы жеребцов позволяет прогнозировать их воспроизводительную способность и своевременно профилактировать ее снижение.

**Ключевые слова:** лошадь, жеребец, арабская чистокровная порода, элементный статус, репродуктивная функция, качество спермы.

В настоящее время наряду с разработкой новых репродуктивных технологий в животноводстве ведется поиск методов восстановления естественной фертильности животных, в том числе лошадей. Среди причин, вызывающих нарушения репродуктивного здоровья, помимо эндогенных факторов (болезни родителей, инфекции, наследственные тенденции), значительное место занимают условия биогеохимической провинции и экологическая ситуация (1), а также обеспеченность животных минеральными веществами. Химические элементы представляют собой важную группу экофизиологических факторов, определяющих морфофункциональные характеристики репродуктивной системы (2-4).

Элементы, непосредственно влияющие на качественные характери-

\* Образцы криоконсервированной спермы получены из Биоресурсной коллекции «Криобанк генетических ресурсов» ФГБНУ ВНИИ коневодства. Исследования проводились при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-16-01109) и программы развития биоресурсных коллекций ФАНО России.

стики спермы, можно разделить на несколько групп: жизненно важные макроэлементы (Na, K, Ca, Mg и др.); микроэлементы, необходимые для нормального функционирования сперматозоидов (Zn, Cu, Mn, Co, Se) (5); токсичные элементы (Pb, Cd, Hg и др.), содержание которых даже в небольшом количестве чрезвычайно вредно и опасно (6-8).

Исследование спермы жеребцов перед случной кампанией не позволяет быстро и эффективно нивелировать отклонения в содержании отдельных химических элементов через оптимизацию питания животных. Кроме того, из-за относительной трудоемкости и травмоопасности взятия спермы предпочтение отдается заблаговременной оценке ее элементного статуса с использованием какого-либо другого биоматериала. Изучение элементного состава волос достаточно широко распространено в медицине (9). У животных этот неинвазивный метод позволяет комплексно оценить состояние здоровья, исключить причины патологии из-за интоксикации тяжелыми металлами, диагностировать нарушения в питании (10).

В своем исследовании мы впервые выявили связь содержания некоторых химических элементов в волосе из гривы жеребцов-производителей с показателями качества и криоустойчивости спермы. Установлена обратная зависимость между накоплением стронция, селена, бора и объемом эякулята, количеством и активностью сперматозоидов, а также между содержанием свинца, олова и активностью и выживаемостью сперматозоидов после оттаивания. Животные с низким содержанием меди, кремния и ванадия в волосе характеризовались наибольшей активностью сперматозоидов.

Нашей целью было изучение репродуктивной функции племенных жеребцов в зависимости от элементного статуса, оцененного по составу волоса из гривы.

*Методика.* Исследования выполняли в 2016-2017 годах на жеребцах арабской чистокровной породы с живой массой  $410,5 \pm 25,3$  кг в возрасте 4-5 лет (Терский племенной конный завод № 169, Ставропольский край). Обслуживание животных и экспериментальные исследования проводили в соответствии с инструкциями и рекомендациями Приказа Министерства здравоохранения СССР от 27 июля 1978 года № 701 «О внесении дополнений в приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 № 755» и «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals» (National Academy Press, Washington, D.C. 1996). При выполнении работы были предприняты усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшить число используемых образцов. Для исследований отбирали клинически здоровых жеребцов ( $n = 50$ ). В качестве биоматериала использовали волос из гривы, свежую и криоконсервированную сперму. Образцы криоконсервированной спермы были получены из Биоресурсной коллекции «Криобанк генетических ресурсов» (ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства).

Для оценки воспроизводительные качества жеребцов в связи с величиной обменного пула химических элементов, содержание которых определяли в волосах из гривы, животных разделили на группы в зависимости от количества элементов в волосах: до 25-го перцентиля, в границах 25-75-го перцентиля, выше 75-го перцентиля. Выбор перцентильных интервалов основывался на ранее выполненных работах на биосубстратах человека, где была выделена физиологическая норма в популяции — от 25-го до 75-го перцентиля (11). В потребляемом суточном рационе подопытных животных в 2-месячный период, предшествующий отбору образцов, содержалось Ca — 75,3 г, P — 52,8 г, Mg — 14,3 г, Fe — 1211,8 мг, Cu — 128,1 мг, Co — 7,2 мг, Mn — 604 мг, I — 7,4 мг.

Элементный состав анализировали с помощью атомно-эмиссион-

ной и масс-спектрометрии с возбуждением излучения в индуктивно связанной плазме (АЭС-ИСП и МС-ИСП). Озолнение проводили с использованием микроволновой системы разложения SW4 («Berghof», Германия). Содержание 25 элементов (Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, I, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Se, Si, Sn, Hg, Sr, V, Zn) в полученной золе определяли на масс-спектрометре Elan 9000 («Perkin Elmer», США) и атомно-эмиссионном спектрометре Optima 2000 V («Perkin Elmer», США).

Сперму получали от жеребцов на кобылу в охоте с помощью искусственной вагины (ВНИИ коневодства) с интервалом 48 ч (не менее 5 эякулятов от каждого животного). Показатели спермы первых двух эякулятов после периода полового покоя в обработке не использовали. Каждый эякулят первоначально оценивали по следующим показателям: объем, концентрация, общее количество сперматозоидов (total number sperm, TNS), общее количество сперматозоидов с прогрессивной подвижностью (total number of progressively motile sperm cells, TNS PM), выживаемость сперматозоидов при температуре 2-4 °С. Образцы разбавляли лактозо-хелато-цитратно-желточной (ЛХЦЖ) средой в объемном соотношении 1:3. Сперму замораживали в парах жидкого азота по технологии ВНИИ коневодства. Замороженную сперму хранили в жидком азоте при -196 °С. Оттаивание проводили на водяной бане при 40 °С в течение 60 с. После оттаивания криоконсервированной спермы определяли прогрессивную подвижность и выживаемость сперматозоидов при 2-4 °С.

Для проверки гипотезы о нормальности распределения других количественных признаков применяли критерий Шапиро-Уилка. Закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, поэтому достоверность различий проверяли при помощи U-критерия Манна-Уитни. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывали уровень значимости (P), при этом критический уровень значимости принимался меньшим или равным 0,05. В таблицах приведены средние значения показателей (M) и их стандартные ошибки ( $\pm$ SEM). Для обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica 10.0 («StatSoft, Inc.», США).

**Результаты.** Сравнительная оценка состава волос из гривы жеребцов выявила значительные различия в количестве отдельных химических элементов у животных из разных групп (табл. 1).

**1. Содержание химических элементов (мкг/г) в волосе из гривы жеребцов арабской чистокровной породы в зависимости от процентильного интервала ( $M \pm$ SEM, Терский племенной конный завод № 169, Ставропольский край, 2016-2017 годы)**

Элемент	Процентильный интервал		
	< 25	25-75	> 75
Макроэлементы			
Ca	500,100 $\pm$ 21,2400	839,000 $\pm$ 44,9100***	1223,000 $\pm$ 61,0800***
K	275,100 $\pm$ 16,0000	527,400 $\pm$ 28,6000***	1248,000 $\pm$ 167,8000***
Mg	160,300 $\pm$ 21,1200	372,300 $\pm$ 22,2800***	632,500 $\pm$ 27,3900***
Na	94,560 $\pm$ 4,2200	149,500 $\pm$ 4,8800***	286,100 $\pm$ 38,5500***
P	249,200 $\pm$ 55,3540	496,200 $\pm$ 19,6000***	765,300 $\pm$ 29,7230***
Эссенциальные микроэлементы			
Co	0,010 $\pm$ 0,0007	0,020 $\pm$ 0,0010***	0,079 $\pm$ 0,0130***
Cr	0,043 $\pm$ 0,0040	0,130 $\pm$ 0,0140***	0,514 $\pm$ 0,1510**
Cu	4,760 $\pm$ 0,1100	5,670 $\pm$ 0,1250***	7,800 $\pm$ 0,5800***
Fe	25,630 $\pm$ 1,8100	48,760 $\pm$ 3,2900***	168,200 $\pm$ 24,7500***
I	0,018 $\pm$ 0,0040	0,062 $\pm$ 0,0060***	0,232 $\pm$ 0,0570**
Mn	0,555 $\pm$ 0,0370	1,030 $\pm$ 0,0630***	3,830 $\pm$ 0,5350***
Se	0,278 $\pm$ 0,0130	0,395 $\pm$ 0,0130***	0,559 $\pm$ 0,0150***
Zn	126,300 $\pm$ 3,0800	146,900 $\pm$ 2,4900***	181,900 $\pm$ 4,3200***
Условно эссенциальные микроэлементы			
B	1,540 $\pm$ 0,1369	7,050 $\pm$ 1,1200**	21,550 $\pm$ 1,1400***
Li	0,049 $\pm$ 0,0060	0,118 $\pm$ 0,0065***	0,249 $\pm$ 0,0270***

Ni	0,082±0,0030	0,123±0,0090***	0,441±0,0630***
Si	2,900±0,3110	5,700±0,2850***	8,780±0,6660***
Sr	1,0600±0,1002	2,500±0,1780***	4,190±0,1200***
V	0,028±0,0030	0,072±0,0070***	0,239±0,0270***
Токсичные элементы			
Al	7,980±0,7580	24,150±2,2700***	79,800±13,4000**
As	0,016±0,0007	0,024±0,0008***	0,058±0,0100***
Cd	0,002±0,0002	0,004±0,0003**	0,010±0,0010***
Pb	0,027±0,0010	0,061±0,0070	0,806±0,2060*
Sn	0,003±0,0001	0,009±0,0010**	0,051±0,0080***

\* , \*\* , \*\*\* Соответственно P < 0,05; P < 0,01; P < 0,001 по отношению к группе с процентильным интервалом < 25.

Сравнение объема эякулята после фильтрации, полученного от животных с разным содержанием химических элементов в волосе, выявило зависимость этого показателя от количества цинка, бора фосфора, свинца, селена и стронция (табл. 2).

**2. Объем эякулята после фильтрации (мл) в группах жеребцов арабской чистокровной породы согласно процентильному интервалу по содержанию химических элементов в волосе из гривы (M±SEM, Терский племенной конный завод № 169, Ставропольский край, 2016-2017 годы)**

Элемент	Процентильный интервал		
	< 25	25-75	> 75
As	30,51±6,730	36,84±21,260	43,25±23,240
B	51,40±17,690	35,62±20,250	25,90±9,760**
Cu	35,99±11,830	38,30±7,990	35,57±12,700
Fe	38,72±9,910	34,13±8,060	41,77±13,380
Li	45,56±12,820	37,34±13,810	28,06±11,830
Na	46,00±8,610	30,61±3,010*	42,02±9,950
P	61,97±6,950	25,84±1,970***	36,29±5,880**
Pb	25,77±3,790	32,06±4,070	55,57±6,040*
Se	53,69±6,520	35,33±5,100*	24,24±1,930***
Si	28,19±5,000	40,68±10,600	38,27±13,600
Sn	40,67±12,770	35,24±6,650	37,17±18,070
Sr	58,71±6,120	33,77±4,350**	22,54±1,290***
V	38,73±9,910	32,75±8,370	44,71±11,300
Zn	28,74±3,560	32,76±4,230	54,69±8,880*

\* , \*\* , \*\*\* Соответственно P < 0,05; P < 0,01; P < 0,001 по отношению к группе с процентильным интервалом < 25.

Содержание в волосах химических элементов отражает их поступление из рациона (12) и в целом связано с величиной обменного пула в организме (13). Известна также тесная связь между элементным статусом жеребцов и их воспроизводительными качествами (14, 15), что, в свою очередь, определяется влиянием элементов на сперматогенез и качество спермы у млекопитающих (16-18).

Обнаруженное нами увеличение общего объема фильтрата на 66,9-90,3 % по мере роста содержания в волосе цинка в целом согласуется с проведенными ранее исследованиями (19) и объясняется тем, что цинк служит важным фактором нормального функционирования предстательной железы и половой системы в целом (20, 21). Физиологическая роль цинка, содержащегося в секрете предстательной железы, заключается в реализации механизмов разъединения головки и хвоста сперматозоида, а также способности хроматина к деконденсации. Цинк в семенной плазме стабилизирует клеточную мембрану и ядерный хроматин сперматозоидов (22, 23). Этот элемент также играет важную регуляторную роль в процессе конденсации и реакции акросомы (24). Вместе с тем сложно объяснить значительное (почти в 2 раза) снижение объема эякулята на фоне увеличения содержания бора. Ранее никаких негативных последствий по объему и составу спермы, полученной на фоне увеличения дозы бора в питании,

не выявляли (25).

Было обнаружено снижение объема эякулята при увеличении количества условно эссенциального элемента стронция в волосе. По мере увеличения содержания Sr от минимального к максимальному в процентильных интервалах 25-75 и > 75 происходило достоверное снижение объема эякулята соответственно на 73,9 (P < 0,01) и 49,2 % (P < 0,001). Сходную закономерность отмечали по влиянию стронция на показатель TNS, что в целом может указывать на негативное воздействие этого элемента на воспроизводительную способность жеребцов. Однако сложно интерпретировать полученные данные без сведений о физиологической норме стронция как компонента элементного статуса. Возможно, для всей сформированной нами популяции характерен повышенный пул этого элемента. Между тем, стронций способен проявлять уникальные свойства по активации ооцитов с последующим стимулированием их развития до 8-клеточной стадии или стадии бластоцисты (26-28), что может быть использовано для повышения оплодотворяющей способности сперматозоидов и, как следствие, эффективного снижения объема разовой дозы.

Для свинца, напротив, установлено увеличение объема фильтрата на 115,6-73,3 % (P < 0,05) по мере роста его количества в волосе. В целом высокий обменный пул свинца сопряжен с развитием бесплодия, вызванного индукцией спонтанной преждевременной реакции акросомы, а повышение концентрации этого элемента в семенной плазме может отрицательно повлиять на показатели оплодотворения *in vitro* (29).

Необходимо отметить, что понятие физиологической нормы применимо только в отношении эссенциальных и макроэлементов, но не токсичных элементов. Физиологическая норма лежит в пределах 25-75-го процентилей, а значения ниже и выше указанного процентильного интервала для жизненно необходимых элементов можно рассматривать как отклонения от нормы. Несмотря на то, что минимальные значения объема эякулята (25,84 мл) отмечались в группе с содержанием фосфора, соответствующим физиологической норме (25-75-й процентиля), концентрация сперматозоидов в свежей сперме здесь была максимальной (268,2 млн/мл).

### 3. Качественные показатели разбавленной спермы в группах жеребцов арабской чистокровной породы согласно процентильному интервалу по содержанию химических элементов в волосе из гривы ( $M \pm SEM$ , Терский племенной конный завод № 169, Ставропольский край, 2016-2017 годы)

Элемент	Процентильный интервал					
	< 25		25-75		> 75	
	A	B	A	B	A	B
As	50,57±8,630	128,2±38,14	47,97±7,930	121,8±28,67	47,05±6,290	132,7±16,49
B	47,34±6,250	129,4±14,63	48,71±9,450	127,9±32,52	48,57±4,030	120,1±30,24
Cu	53,38±2,410	131,9±19,47	46,80±2,160	128,8±29,51	46,63±1,740*	115,7±32,62
Fe	52,14±6,120	145,4±6,56	47,78±8,690	115,1±18,33	45,70±5,130	131,5±4,78
Li	50,71±10,530	130,2±25,28	47,18±6,420	120,9±33,24	48,48±6,980	134,3±16,61
Na	49,57±9,620	126,8±15,79	48,20±7,690	124,4±13,85	47,42±5,680	130,0±17,20
P	46,57±5,560	125,1±13,60	49,38±9,140	127,9±22,52	47,91±5,740	124,2±21,50
Pb	50,33±7,850	135,3±14,04	49,95±1,460	126,1±11,35	43,14±2,400	123,4±16,56
Se	45,28±7,400	128,5±20,45	49,69±8,580	125,9±30,29	48,52±4,850	125,1±33,04
Si	54,95±2,950	124,9±35,05	47,89±1,570*	131,5±28,99	42,71±2,060**	116,9±17,23
Sn	48,71±8,130	131,9±13,90	49,00±5,810	130,5±16,70	46,87±10,230	114,3±23,03
Sr	48,00±5,650	133,7±7,56	48,22±8,300	120,5±13,44	48,95±8,500	131,7±13,65
V	52,14±2,310	145,4±6,56	48,38±2,070	118,5±8,45	44,49±2,490*	124,3±6,24*
Zn	51,95±7,340	133,8±15,39	48,16±6,570	125,9±16,22	45,14±5,550	120,0±16,00

Примечание. А — активность, %; В — выживаемость, ч.

\*, \*\* Соответственно P < 0,05; P < 0,01; P < 0,001 по отношению к группе с процентильным интервалом < 25.

Наибольшей активностью сперматозоидов характеризовались животные с низким содержанием меди, кремния и ванадия в волосе (табл. 3).

Превышение относительно жеребцов с большим (> 75-го перцентиля) и средним (25-75-й перцентили) количеством этих химических элементов составляло соответственно 6,8 (P < 0,05) и 6,6 % для меди, 12,3 (P < 0,01) и 7,1 % (P < 0,05) — для кремния, 7,3 (P < 0,05) и 3,7 % — для ванадия. В ряде исследований обнаружена обратная связь между высоким содержанием меди и качеством спермы (30, 31). Обменный пул меди также тесно связан с активностью медьсодержащих ферментов (32).

Показатель выживаемости разбавленной спермы при температуре хранения 2-4 °С зависел от количества ванадия и был наибольшим в группах животных с низким (< 25-го перцентиля) содержанием этого элемента — соответственно на 17,0 (P < 0,05) и 22,7 % выше, чем в группах с высоким и средним количеством ванадия в волосе.

Выявлены неординарные, на первый взгляд, изменения в воспроизводительной способности жеребцов в зависимости от величины обменного пула селена. В частности, по мере увеличения количества селена в волосе с 0,278±0,013 до 0,395±0,013 и 0,559±0,015 мкг/г содержание сперматозоидов в эякуляте уменьшалось на 39,2 (P < 0,05) и 18,1 % (P < 0,05). Отмечалось снижение активности сперматозоидов. Известно, что селеновая недостаточность крайне негативно отражается на воспроизводительной способности животных (33). В соответствии с этим при увеличении обеспеченности жеребцов Se следовало ожидать улучшения качества спермы. Однако информация о нормах содержания этого элемента в волосе из гривы отсутствует. Возможно, рассматриваемые нами границы превышали физиологическую норму. В то же время есть данные, демонстрирующие неоднозначное влияние добавок селена на воспроизводительные качества (34, 35). В некоторых исследованиях селеновые добавки не изменяли количество и качество спермы (36). Мы обнаружили снижение числа активных сперматозоидов в эякуляте на фоне роста содержания селена в волосе. Аналогичный результат был получен для бора, лития и стронция (табл. 4).

**4. Количество сперматозоидов (мрд) в эякуляте в группах жеребцов арабской чистокровной породы согласно перцентильному интервалу по содержанию химических элементов в волосе из гривы (M±SEM, Терский племенной конный завод № 169, Ставропольский край, 2016-2017 годы)**

Элемент	Перцентильный интервал					
	< 25		25-75		> 75	
	TNS	TNS PM	TNS	TNS PM	TNS	TNS PM
As	6,83±2,540	3,60±1,570	7,88±3,550	3,82±1,960	9,14±2,350*	4,26±1,030
B	9,75±2,750	4,66±1,720	8,08±3,210	3,98±1,660	5,97±1,890*	2,93±1,070*
Cu	8,13±2,940	4,36±2,170	8,13±1,810	3,84±1,490	7,48±2,040	3,50±1,410
Fe	8,72±1,970	4,51±0,890	7,02±3,040	3,41±1,620	9,28±2,640	4,30±1,040
Li	9,58±0,240	4,72±0,630	7,41±3,770	3,59±0,520	7,58±1,760	3,69±0,400*
Na	9,81±2,260	4,76±1,080	7,19±2,210	3,58±1,870	7,81±2,990	3,67±1,350
P	9,53±0,920	4,36±0,900	6,78±0,710*	3,44±1,620	8,98±3,570	4,36±2,090
Pb	5,98±2,110	3,33±2,340	7,31±1,620	3,68±1,460	10,63±1,910	4,68±1,750
Se	10,5±0,970	4,78±0,630	7,54±0,830*	3,83±0,450	6,38±0,500**	3,11±0,310*
Si	6,81±1,360	3,78±1,040	8,82±2,410	4,27±1,860	7,33±2,290	3,17±1,470
Sn	7,21±2,650	3,60±1,840	8,25±1,930	4,09±1,740	8,16±2,030	3,77±1,370
Sr	10,79±0,870	5,24±0,590	7,75±0,690*	3,71±0,350*	5,64±0,900**	2,91±0,580*
V	8,72±1,970	4,51±0,900	6,74±1,930	3,34±1,640	9,88±2,300	4,43±1,930
Zn	7,45±1,780	3,83±1,030	7,74±1,520	3,83±1,990	9,01±2,120	4,07±1,410

Примечание. TNS — общее число сперматозоидов, TNS PM — общее число сперматозоидов с прогрессивной подвижностью.

\*, \*\* Соответственно P < 0,05; P < 0,01; P < 0,001 по отношению к группе с перцентильным интервалом < 25.

Детальный анализ качества криоконсервированной спермы в зависимости от количества химических элементов в волосе из гривы выявил зависимость выживаемости и активности спермы только от содержания свинца и олова. В частности, при максимальном повышении количества

свинца в волосе наблюдалось уменьшение активности сперматозоидов после оттаивания с 27,66 до 20,00 % ( $P < 0,05$ ) (табл. 5). Аналогичное снижение выживаемости сперматозоидов после оттаивания с 78,4 до 48,9 ч ( $P < 0,05$ ) отмечали при высоком содержании олова (сравнение процентильных интервалов  $> 75$  и  $< 25$ ).

**5. Качественные показатели размороженной спермы в группах жеребцов арабской чистокровной породы согласно процентильному интервалу по содержанию химических элементов в волосе из гривы ( $M \pm SEM$ , Терский племенной конный завод № 169, Ставропольский край, 2016-2017 годы)**

Элемент	Процентильный интервал					
	< 25		25-75		> 75	
	A	B	A	B	A	B
As	23,57±5,160	67,1±13,00	23,07±5,630	64,6±14,55	23,37±2,720	77,8±17,05
B	22,85±3,020	69,6±14,20	24,09±5,730	71,1±55,99	21,95±7,720	62,9±17,61
Cu	26,91±4,550	78,6±17,69	22,74±5,720	67,8±32,84	20,78±5,400	61,1±14,00
Fe	26,00±5,250	76,5±14,66	22,06±5,290	63,3±16,63	23,17±2,570	72,8±16,35
Li	26,42±5,390	70,3±17,21	22,27±6,750	68,4±15,6	22,28±3,450	68,1±11,66
Na	26,50±6,530	73,3±17,62	21,97±8,580	68,7±11,47	22,85±3,800	64,5±11,95
P	23,92±2,970	67,7±15,67	24,37±3,710	70,7±15,75	20,28±4,150	65,8±10,35
Pb	27,66±3,180	67,5±25,23	23,79±2,040	72,8±33,28	20,00±1,780*	58,3±21,27
Se	21,00±5,710	68,1±15,14	25,16±4,570	71,7±11,41	21,51±5,440	63,1±14,30
Si	26,41±5,980	70,5±12,63	23,20±7,290	74,0±12,04	20,31±5,240	55,9±19,09
Sn	26,14±4,220	78,4±7,18	23,42±6,810	75,3±8,56	20,52±11,560	48,9±9,55*
Sr	23,57±2,570	75,4±14,24	22,51±5,700	64,4±16,05	24,62±4,040	71,5±15,65
V	26,00±5,250	76,1±14,66	23,07±6,760	66,2±14,98	21,00±5,410	66,6±14,79
Zn	26,8±5,630	74,5±18,15	22,76±6,320	68,8±20,68	20,85±6,260	63,0±23,24

Примечание. А — активность, %; В — выживаемость, ч.

\*  $P < 0,05$  по отношению к группе с процентильным интервалом  $< 25$ .

В настоящее время накоплен обширный материал о влиянии токсических элементов на качество спермы и воспроизводительную способность. Причем действие токсических элементов множественное и выражается в снижении концентрации сперматозоидов (37) и подавлении их подвижности (38). Установлены значительные отрицательные корреляции между концентрацией свинца в сперме, активностью ( $r = -0,65$ ;  $P < 0,001$ ) и выживаемостью ( $r = -0,62$ ;  $P < 0,001$ ) сперматозоидов (39).

Таким образом, элементный анализ волоса из гривы может быть использован для выявления сниженной воспроизводительной способности жеребцов. Увеличение содержания стронция до  $4,19 \pm 0,12$ , селена — до  $0,559 \pm 0,015$ , бора — до  $21,55 \pm 1,14$  мкг/г в волосе сопряжено со снижением объема эякулята, числа и активности сперматозоидов. Активность и выживаемость сперматозоидов жеребцов после замораживания находится в обратной зависимости от количества свинца и олова в организме. При увеличении содержания олова в волосе до  $0,806 \pm 0,206$  мкг/г наблюдается снижение прогрессивной подвижности сперматозоидов после оттаивания с  $27,66 \pm 3,18$  до  $20,00 \pm 1,78$  % (в среднем на 7,7 %). При росте количества свинца в волосе до  $0,051 \pm 0,008$  мкг/г выживаемость сперматозоидов после оттаивания снижается на 29,5 ч (на 37,6 %). Наибольшей активностью сперматозоидов характеризовались животные с низким (менее 25-го процентиля) содержанием меди, кремния и ванадия в волосе. Показатель выживаемости свежей спермы был связан с количеством ванадия в волосе и был наибольшим в группах животных с низким содержанием этого элемента. Дальнейшая работа предполагает определение референтных и процентильных интервалов для содержания химических элементов в волосе из гривы лошадей в связи с пулом этих элементов в организме.

*1*ФГБНУ Федеральный научный центр  
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,  
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,

Поступила в редакцию  
29 сентября 2017 года

e-mail: vugarbagirov@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства,

391105 Россия, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Дивово,

e-mail: atomiks-77@mail.ru, amzaitceff@mail.ru, vniik08@mail.ru;

<sup>3</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ мясного скотоводства,

460000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29,

e-mail: vniims.or@mail.ru, Oleg-Zavyalov83@mail.ru, Forleh@mail.ru;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО Оренбургский государственный

университет,

460018 Россия, г. Оренбург, просп. Победы, 13

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, V. 52, № 6, pp. 1184-1193

## REPRODUCTIVE FUNCTION IN PUREBRED ARABIAN STALLIONS AS RELATED TO THE LEVELS OF CHEMICAL ELEMENTS IN MANE HAIR SAMPLES

V.A. Bagirov<sup>1</sup>, V.V. Kalaschnikov<sup>2</sup>, A.M. Zaitsev<sup>2</sup>, M.M. Atroshchenko<sup>2</sup>, S.A. Miroshnikov<sup>3, 4</sup>, O.A. Zavalov<sup>3</sup>, A.N. Frolov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Federal Agency of Scientific Organizations, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail vugarbagirov@mail.ru;

<sup>2</sup>All-Russian Research Institute for Horse Breeding, Federal Agency of Scientific Organizations, pos. Divovo, Rybnovskii Region, Ryazan Province, 391105 Russia, e-mail atomiks-77@mail.ru, vniik08@mail.ru, amzaitceff@mail.ru (corresponding authors);

<sup>3</sup>All-Russian Research Institute of Beef Cattle Breeding, Federal Agency of Scientific Organizations, 29, ul. 9 Yanvary, Orenburg, 460000 Russia, e-mail vniims.or@mail.ru, Oleg-Zavyalov83@mail.ru, Forleh@mail.ru;

<sup>4</sup>Orenburg State University, 13, prosp. Pobedy, Orenburg, 460018 Russia

ORCID:

Bagirov V.A. [orcid.org/0000-0001-5398-8815](https://orcid.org/0000-0001-5398-8815)

Zaitsev A.M. [orcid.org/0000-0003-4260-602X](https://orcid.org/0000-0003-4260-602X)

Miroshnikov S.A. [orcid.org/0000-0002-5746-9569](https://orcid.org/0000-0002-5746-9569)

Frolov A.N. [orcid.org/0000-0003-4525-2554](https://orcid.org/0000-0003-4525-2554)

Kalaschnikov V.V. [orcid.org/0000-0001-9845-1691](https://orcid.org/0000-0001-9845-1691)

Atroshchenko M.M. [orcid.org/0000-0001-6023-0332](https://orcid.org/0000-0001-6023-0332)

Zavalov O.A. [orcid.org/0000-0003-2033-3956](https://orcid.org/0000-0003-2033-3956)

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The samples of cryopreserved semen were got from Bioresource Collection «Cryobank of Genetic Resources», ARRIHB.

Supported financially by Russian Science Foundation (project № 17-16-01109) and the program of Federal Agency of Scientific Organizations for bio resource collections

Received September 29, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2017.6.1184eng

### Abstract

In modern animal husbandry, along with the improvement of reproductive technologies, it is becoming increasingly important to restore the natural fertility of livestock, in particular breeding producers. Reproductive function is one of the most sensitive that reacts to changes in biogeochemical and environmental parameters. In this regard, research aimed at studying effects of the level of chemical elements in the body on reproductive function in stallions is rather important. The parameters of sperm quality depending on the level of chemical elements in hair sampled from mane were studied. In this work we used biomaterial of purebred Arabian stallions ( $n = 50$ ) of the same biogeochemical province. Reproductive qualities of stallions were evaluated in relation to the pool of chemical elements rated by concentration in the mane hair. All animals were grouped according to the levels of individual elements in hair (i.e. up to percentile 25, within the interval of percentiles 25-75 and above percentile 75). Also the quality of fresh and cryopreserved semen was estimated. Hair profiles was determined for 25 elements (Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, I, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Se, Si, Sn, Hg, Sr, V, Zn) by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry (ICP-AES and ICP-MS). Ejaculate was assessed for volume, concentration, total spermatozoa number, number of spermatozoa with progressive motility and semen viability. The validity of the differences was verified by Mann-Whitney U test. It has been found out that the mane hair analysis can be used to detect reduced fertility in stallions. Increase in average values of Sr to  $4.19 \pm 0.12$ , Se to  $0.559 \pm 0.015$ , B to  $21.55 \pm 1.14 \mu\text{g/g}$  in hair results in decrease in number and activity of sperm and filtrate volume. Activity and survival of stallion spermatozoa after thawing was in inverse correlation with Pb and Sn pool in the body, as determined by element level in the mane hair. With the increase in the concentration of these elements to  $0.806 \pm 0.206$  and  $0.051 \pm 0.008 \text{ mg/g}$ , the sperm activity declines after thawing by 3.8-7.7 % and survival by 26.4-29.5 %, respectively. Animals with copper, silicon and vanadium in hair less than that of percentile 25, had the most active sperm. The survival rate of fresh sperm was associated with V concentration in hair being the highest in animals with low levels of this mineral. Thus, the assay of mane hair mineral profile can be used in monitoring for timely correction of stallions' fertility.



Keywords: purebred horses, Arabian breed, stallion, profiles of mineral elements in the horse hair, reproductive function, sperm quality.

## REFERENCES

1. Notova S.V., Miroshnikov S.A., Bolodurina I.P., Didikina E.V. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2006, 52: 59-63 (in Russ.).
2. Bertelsmann H., Keppler S., Höltershinken M., Bollwein H., Behne D., Alber D., Bukalis G., Kyriakopoulos A., Sieme H. Selenium in blood, semen, seminal plasma and spermatozoa of stallions and its relationship to sperm quality. *Reprod. Fert. Develop.*, 2010, 22(5): 886-891 (doi: 10.1071/RD10032).
3. Nenkova G., Petrov L., Alexandrova A. Role of trace elements for oxidative status and quality of human sperm. *Balkan. Med. J.*, 2017, 34(4): 343-348 (doi: 10.4274/balkanmedj.2016.0147).
4. Hashemi M.M., Behnampour N., Nejabat M., Tabandeh A., Ghazi-Moghaddam B., Joshaghani H.R. Impact of seminal plasma trace elements on human sperm motility parameters. *Rom. J. Intern. Med.*, 2017, 28 (doi: 10.1515/rjim-2017-0034).
5. Hoffman D.J., Franson J.C., Pattee O.H., Bunck C.M., Anderson A. Survival, growth and accumulation of ingested lead in nestling american kestrels (*Falco sparverius*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1985, 14: 89-94 (doi: 10.1007/BF01055766).
6. Underwood E.J. *Trace elements in human and animal nutrition*. Academic Press, NY, 1977 (ISBN 0-12-709065-7).
7. Fergusson J.E. *The heavy elements: chemistry, environmental impacts and health effects*. Pergamon Press, Oxford, 1990.
8. Massányi P., Trandzik J., Nad P., Koreneková B., Skalisk M., Toman R., Lukac N., Haldo M., Stražak P. Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead, and nickel in bull and ram semen and relation to the occurrence of pathological spermatozoa. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2004, 39(11-12): 3005-3014.
9. Skal'nyi A.V. *Mikroelementy v meditsine*, 2000, 1(1): 2-8 (in Russ.).
10. Oberlis D., Kharland B., Skal'nyi A. *Biologicheskaya rol' makro- i mikroelementov u cheloveka i zhivotnykh* [Macro and microelements in animal and human]. St. Petersburg, 2008 (in Russ.).
11. Skal'naya M.G., Demidov V.A., Skal'nyi A.V. *Mikroelementy v meditsine*, 2003, 4(2): 5-10 (in Russ.).
12. Chojnacka K., Zielińska A., Michalak I., Gyrecki H. The effect of dietary habits on mineral composition of human scalp hair. *Environ. Toxicol. Phar.*, 2010, 30(2): 188-94 (doi: 10.1016/j.etap.2010.06.002).
13. Miroshnikov S.A., Lebedev S.V., Duskaev G.K., Kvan O.V., Sheida E.V., Alijanova I., Rakhmatullin S.G. Value of wool composition in assessing the pool of chemical elements in rabbits and rats. *Biology and Medicine (Aligarh)*, 2015, 7(4): 1-6.
14. Ghallab S.M., Shahat A.M., Fadl A.M., Ayoub M.M., Moawad A.R. Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology*, 2017, 79: 14-20 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.10.001).
15. Contri A., De Amicis I., Molinari A., Faustini M., Gramenzi A., Robbe D., Carluccio A. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*, 2011, 75(7): 1319-1326 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.003).
16. Hamameh S., Gatti J-L. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum. Reprod.*, 1998, 13(4): 20-30 (doi: 10.1093/humrep/13.suppl\_4.20).
17. Chia S.E., Ong C.N., Chua L.H., Ho L.M., Tay S.K. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J. Androl.*, 2000, 21: 53-57.
18. Massanyi P., Trandzik J., Nad P., Toman R., Skalick M., Kornekov B. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian J. Androl.*, 2003, 5: 101-104.
19. Wong W.Y., Flik G., Groenen P.M., Swinkels D.W., Thomas C.M., Copius-Peereboom J.H., Merkus H.M., Steegers-Theunissen R.P. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod. Toxicol.*, 2001, 15(2): 131-136 (doi: 10.1016/S0890-6238(01)00113-7).
20. Cigankova V., Mesaros P., Bires J., Ledecy V., Ciganek J., Tomajkova E. Morphological structure of the testes in stallion at zinc deficiency. *Slovak. Vet. J.*, 1998, 23: 97-100.
21. Eskenazi B., Kidd S.A., Marks A.R., Slotter E., Block G., Wyrobek A.J. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum. Reprod.*, 2005, 20: 1006-1012 (doi: 10.1093/humrep/deh725).
22. Chvapil M. New aspects in biological role of zinc. A stabilizer of macromolecules and biological membrane. *Life Sci.*, 1973, 13: 1041-1049.
23. Kvist U. Sperm nuclear chromatin decondensation ability. An in vitro study on ejaculated

- human spermatozoa. *Acta Physiol. Scand.*, 1980, 486: 1-24.
24. Riffo M., Leiva S., Astudillo J. Effect of zinc on human sperm motility and acrosome reaction. *International Journal of Andrology*, 1992, 15: 229-237 (doi: 10.1111/j.1365-2605.1992.tb01343.x).
  25. Korkmaz M., Yenigün M., Bakırdere S., Ataman O.Y., Keskin S., Muez-zinoğlu T., Lekili M. Effects of chronic boron exposure on semen profile. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011, 143(2): 738-750 (doi: 10.1007/s12011-010-8928-2).
  26. Cibelli J.B., Kiessling A.A., Cunniff K., Richards C., Lanza R.P., West M.D. Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *e-biomed: The Journal of Regenerative Medicine*, 2001, 2(5): 25-31 (doi: 10.1089/152489001753262168).
  27. Lin H., Lei J., Winingger D., Nguyen M.T., Khanna R., Hartmann C., Yan W.L., Huang S.C. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. *Stem Cells*, 2003, 21: 152-161 (doi: 10.1634/stemcells.21-2-152).
  28. Paffoni A., Brevini T.A., Somigliana E., Restelli L., Gandolfi F., Ragni G. In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 2007, 87: 77-82 (doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.063).
  29. Benoff S., Centola G.M., Millan C., Napolitano B., Marmar J.L., Hurlley I.R. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum. Reprod.*, 2003, 18: 374-383 (doi: 10.1093/humrep/deg020).
  30. Huang Y.L., Tseng W.S., Cheng S.Y., Lin T.H. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2000, 76: 207-215 (doi: 10.1385/BTER:76:3:207).
  31. Skandhan K.P. Review on copper in male reproduction and contraception. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.*, 1992, 87: 594-598.
  32. Abdul Rasheed O.F. Association between seminal plasma copper and magnesium levels with oxidative stress in Iraqi infertile men. *Oman Med. J.*, 2010, 25: 168-172 (doi: 10.5001/omj.2010.51).
  33. Agarwal A., Sekhon L.H. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoastheno-teratospermia: is it justified? *Indian J. Urol.*, 2011, 27: 74-85 (doi: 10.4103/0970-1591.78437).
  34. López A., Rijsselaere T., Van Soom A., Leroy J.L., De Clercq J.B., Bols P.E., Maes D. Effect of organic selenium in the diet on sperm quality of boars. *Reprod. Domest. Anim.*, 2010, 45(6): e297-e305 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01560.x).
  35. Lovercamp K.W., Stewart K.R., Lin X., Flowers W.L. Effect of dietary selenium on boar sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 2013, 138: 268-275 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.016).
  36. Kirchhoff K.T., Failing K., Goericke-Pesch S. Effect of dietary vitamin E and selenium supplementation on semen quality in Cairn Terriers with normospermia. *Reprod. Domest. Anim.*, 2017, 52(6): 945-952 (doi: 10.1111/rda.13000).
  37. Pant N., Upadhyay G., Pandey S., Mathur N., Saxena D K., Srivastava S.P. Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. *Reprod. Toxicol.*, 2003, 17: 447-450 (doi: 10.1016/S0890-6238(03)00036-4).
  38. Battersby S., Chandler J.A., Morton M.S. Toxicity and uptake of heavy metals by human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 1982, 37: 230-235.
  39. Taha E.A., Sayed S.K., Ghandour N.M., Mahran A.M., Saleh M.A., Amin M.M., Shamloul R. Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males. *Cent. European J. Urol.*, 2013, 66(1): 84-92 (doi: 10.5173/cej.2013.01.art28).