

## СВЕРХМАЛЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ И ЖЕРЕБЦОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И ДЕЙСТВИИ ВРЕДНЫХ ФАКТОРОВ

Е.В. НИКИТКИНА<sup>1</sup>, И.Ш. ШАПИЕВ<sup>1</sup>, К.В. ПЛЕМЯШОВ<sup>1</sup>, С.А. ХАРИТОНОВ<sup>2</sup>

Один из подходов к решению практических проблем криоконсервации клеток заключается в повышении устойчивости сперматозоидов к повреждающему действию низких температур. Мы изучили влияние производных бензимидазола этил-1-бензимидазол-2-ил-сульфанила, 2-этилсульфанилбензимидазол-1-ила и 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в концентрациях  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-15}$  М на сохранность сперматозоидов при замораживании и оттаивании, на их устойчивость к холодовому шоку и изменению осмотического давления. Установлено, что изученные вещества повышали живучесть бычьих сперматозоидов при хранении в лактозо-цитратной среде. При этом наибольшую активность и сохранность отмечали при введении в среду для замораживания спермы 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в сверхнизкой концентрации  $10^{-13}$ - $10^{-15}$  М. Время переживания сперматозоидов до сохранения подвижности у 10 % клеток повышалось по сравнению с контролем на 73 %. Аналогичные результаты получили при замораживании-оттаивании спермы жеребцов в присутствии 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в концентрации  $10^{-13}$  М: доля подвижных неповрежденных клеток после замораживания-оттаивания оказалась на  $15,2 \pm 3,49$  млн/мл ( $P < 0,01$ ) больше, чем в среде без добавки. Выживаемость сперматозоидов быков после замораживания-оттаивания была на 8,1 % ( $P < 0,01$ ) выше, чем в контроле, сохранность акросом — на  $1,9 \pm 0,63$  % ( $P < 0,05$ ) выше. При изменении осмолярности среды для разбавления спермы и после холодового шока 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота увеличивала живучесть сперматозоидов быка при повышенной температуре (40 °С). Можно предположить, что наблюдаемый эффект связан с защитным действием 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты на плазматическую мембрану и мембранные структуры митохондрий сперматозоидов. Действительно, динитрофенол практически одинаково усиливал клеточное дыхание в опыте и контроле, тогда как сукцинат, который проникает через поврежденные мембраны, оказывал меньшее стимулирующее влияние в присутствии 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты. В результате проведенных исследований предложена гипотеза о механизме действия сверхмалых концентраций производных бензимидазола на криорезистентность половых клеток при замораживании. Молекулы исследуемого вещества взаимодействуют с рецептором на внешней мембране сперматозоида, что вызывает перестройку мембранных структур клетки. Одновременно происходит изменение вязкости воды, ассоциированной с белками мембраны, из-за формирования водородных связей с кислотными остатками в молекуле производного бензимидазола. В результате повышается устойчивость мембранных структур сперматозоидов к повреждениям вследствие колебаний осмотического давления. Такое состояние воды, возможно, сказывается на характере кристаллообразования при замерзании в сторону уменьшения размеров кристаллов, что снижает их повреждающее действие.

**Ключевые слова:** сперма, замораживание, бензимидазол, сверхмалые концентрации, мембраны клеток, митохондрии, быки, жеребцы.

Несмотря на широкое применение криоконсервированной спермы при разведении разных видов сельскохозяйственных животных, гибель до 40-50 % половых клеток после замораживания остается проблемой для практики искусственного осеменения, поэтому поиск способов сделать сперматозоиды устойчивее к повреждающему действию низких температур все еще актуален (1-5).

Неспецифическое повышение устойчивости клеток под воздействием химических веществ разной природы в подпороговых дозах и в концентрациях, на несколько порядков ниже субтоксических, описано давно. В отечественной литературе к ранним публикациям по этой теме относятся исследования, подтвердившие увеличение времени переживания сперматозоидов под влиянием подпороговых доз ряда агентов — наркотиков, мочевины, ингибиторов обмена и др. (6-11). Позднее были обнару-

жены вещества, обладающие способностью вызывать повышение резистентности клеток в концентрациях на несколько порядков ниже субтоксических. Так, показано, что бензимидазол и его производное дибазол в концентрациях  $10^{-3}$ - $10^{-11}$  М способствует росту устойчивости клеток и тканей к повреждающему воздействию низких и высоких температур (12-14).

В последние 20 лет внимание исследователей привлекает феномен эффективности сверхмалых доз (СМД,  $10^{-12}$ - $10^{-15}$  М) веществ в отношении биологических объектов. В первую очередь, причина в том, что многие соединения в СМД могут вызывать ответные реакции, сопоставимые и даже более значительные, чем при существенно более высоких концентрациях (15, 16). Попытки объяснить механизм биологического действия физических и химических факторов в СМД (17-21) к настоящему времени не привели к единому мнению. Тем не менее, СМД в ряде случаев нашли успешное применение в медицине (22-24) и ветеринарии (25, 26).

Нами впервые изучено влияние производных бензимидазола на устойчивость сперматозоидов быков и жеребцов к повреждающему действию низких и ультранизких температур при криоконсервации и показано, что наибольшую активность и сохранность отмечали при введении в среду для замораживания спермы 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в сверхнизкой концентрации  $10^{-13}$ - $10^{-15}$  М.

Цель работы — исследование влияния низких и сверхнизких концентраций производных бензимидазола на живучесть сперматозоидов при разбавлении, замораживании и оттаивании, их устойчивость при холодовом шоке и в средах с разной осмолярностью.

*Методика.* Производные бензимидазола были синтезированы на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. Используемые концентрации анализируемых веществ в разбавителе —  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-15}$  М.

В опытах использовали сперму быков ( $n = 11$ ) черно-пестрой породы Ленинградского типа (ФГУП «Невское», Ленинградская обл.) и лошадей ( $n = 10$ ) тракененской, ганноверской, арабской и голштинской пород (ООО «Ковбой», фермерское хозяйство Маланичевых и частные владельцы, Ленинградская обл.). Сперма быков имела начальную подвижность 5-6 баллов (по этому показателю образцы не были допущены к замораживанию для производственных целей; при измерении скорости дыхания использовали образцы с большей подвижностью), жеребцов — 7-8 баллов. Для сравнения вариантов опыта каждый эякулят делили на равные части.

При определении устойчивости сперматозоидов быков к изменению осмотического давления и холодовому шоку в качестве разбавителя применяли водный раствор лактозы. Контролем был раствор с осмолярностью 336 мосм/л, содержащий 11,5 г лактозы на 100 мл воды; для повышения или снижения осмолярности в ряду 246, 276, 306, 336 и 366 мосм/л это количество лактозы увеличивали или уменьшали (на каждые 30 мосм/л — по 1,02 г). Процедура замораживания образцов соответствовала межгосударственному стандарту ГОСТ 26030-2015 (27). Холодовой шок сперматозоидов быков вызывали снижением температуры разбавленной спермы от 20 до 4 °С в течение 2 мин.

Сперму жеребцов разбавляли в среде Kenney (49 г D-глюкозы, 24 г сухого молока, 40 мг гентамицина, 1 л дистиллированной воды) в объемном соотношении 1:3, затем центрифугировали 8 мин при 600 г. Осадок сперматозоидов суспендировали в среде Kenney и разбавляли до плотности 100 млн кл/мл, сперму расфасовывали в соломинки по 0,5 мл, охлаждали

при 4 °С 90 мин и замораживали в парах жидкого азота 12 мин при температуре 110 °С, после чего опускали в жидкий азот. Оттаивали сперму жеребцов при 37 °С 1-2 мин.

Объем, количество и подвижность сперматозоидов (полное отсутствие — 0 баллов, 100 % — 10 баллов) оценивали общепринятыми методами, морфологию и состояние акросомного чехлика — при фазово-контрастной световой микроскопии. Время переживания спермы быков выражали в часах до сохранности 10 % подвижных клеток и до полной потери подвижности.

Дыхательную активность клеток определяли согласно описанию (28) на полярографе LP 7 (Чехия) с платиновым электродом Кларка. Инкубационной средой служила 6 % глюкоза, в которую последовательно добавляли (в расчете на конечную концентрацию) сперму (50-100 млн сперматозоидов на 1 мл), сукцинат калия в качестве субстрата ( $1,0 \times 10^{-3}$ - $2,5 \times 10^{-3}$  М), классический разобщитель дыхания и фосфорилирования протонофор 2,4-динитрофенол (ДНФ,  $2,5 \times 10^{-5}$  М).

Поврежденность плазматических мембран сперматозоидов жеребцов оценивали с помощью красителя Sperm VitalStain («Nidac International AB», Швеция). Окрашивание проводили в пробирках типа Eppendorf (50 мкл спермы смешивали с 50 мкл красителя) и делали мазки на предметных стеклах. Препараты просматривали при увлечении  $\times 100$  (объектив) с масляной иммерсией, подсчитывая не менее 200 клеток в каждом образце (белые клетки — неповрежденные, красные или розовые — сперматозоиды с поврежденными мембранами).

Для микроскопирования использовали визуализирующую систему Axio Imager («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия).

Данные обрабатывали в программах SigmaPlot 12.5 («Systat Software Inc.», США) и Microsoft Excel. Выполняли общий статистический анализ и оценку средней разницы между выборками с попарно связанными вариантами. Различия считали статистически значимыми при  $P < 0,05$ . В таблицах приведены значения средних ( $\bar{X}$ ) и стандартной ошибки среднего ( $\bar{x}$ ).

*Результаты.* Один из возможных подходов к практическому решению проблемы сохранности криоконсервированных сперматозоидов — изыскание способов повышения их устойчивости к повреждающему эффекту низких температур. К настоящему времени накоплено достаточно данных о влиянии охлаждения на клетки (29, 30), которые позволяют сделать определенные выводы о механизмах повреждения и подходах к предотвращению этих повреждений. Можно выделить два типа повреждений клеточных структур, возникающих при действии холода: связанные с охлаждением до начала замерзания и возникающие в результате кристаллообразования при замораживании. Среди факторов, влияющих на выживаемость клеток и тканей при криоконсервации, выделяют холодовой шок (31) и изменения осмотического давления при разбавлении, замораживании и оттаивании спермы.

При сравнении времени переживания сперматозоидов быков при температуре 20 °С в присутствии в среде для разбавления трех производных бензимидазола в концентрациях  $10^{-3}$ - $10^{-15}$  М было установлено, что живучесть сперматозоидов быков при хранении в лактозо-цитратной среде повышалась. Наибольший положительный эффект дали этил-1-бензимидазол-2-ил-сульфанил в концентрации  $10^{-5}$  М (превышение на 46 %), 2-этилсульфанилбензимидазол-1-ил в концентрации  $10^{-11}$  М (на 59 %) и 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота в концентрациях  $10^{-11}$  М,  $10^{-13}$  М и

$10^{-15}$  М (на 88-90 %).

Сравнение действия наиболее эффективных концентраций изученных производных при повышенной плюсовой температуре (40 °С) (табл. 1) показало, что наибольшую активность и живучесть сперматозоидов быков после замораживания-оттаивания обеспечивало присутствие в среде для разбавления спермы 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в сверхнизких концентрациях  $10^{-13}$ - $10^{-15}$  М, при которых на один сперматозоид приходилось всего 4-6 молекул исследуемого вещества. В этом варианте доля выживших сперматозоидов (активность) была на 8-13 % достоверно больше ( $P < 0,01$ ), чем в контроле. Время переживания до сохранения подвижности 10 % сперматозоидов увеличивалось на 73 %, до полного прекращения подвижности — превышало контроль на 85-90 %.

**1. Переживаемость бычьих сперматозоидов при 40 °С после замораживания и оттаивания в среде с производными бензимидазола в сверхмалых концентрациях ( $n = 7$ ,  $X \pm \bar{x}$ )**

Вариант	Активность после размораживания, балл	Время переживания, ч	
		до 1 балла (10 %)	до 0 баллов
Контроль	2,6±0,28	1,5±0,18	2,0±0,19
Производное бензимидазола, М:			
этил-1-бензимидазол-2-ил-сульфанил, $10^{-5}$	3,2±0,01	2,3±0,22*	2,9±0,21**
2-этилсульфанилбензимидазол-1-ил, $10^{-11}$	3,0±0,23	2,0±0,23	3,2±0,18**
2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота, $10^{-11}$	3,2±0,38**	2,0±0,21	2,9±0,24**
2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота, $10^{-13}$	3,9±0,26***	2,6±0,21***	3,7±0,21***
2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота, $10^{-15}$	3,4±0,07***	2,6±0,09***	3,8±0,15***

Примечание. Использована сперма быков с исходной активностью 5-6 баллов.  
\*, \*\*, \*\*\* Различия с контролем статистически значимы соответственно при  $P < 0,01$ .

Аналогичные результаты получили при замораживании и оттаивании спермы жеребцов в среде с 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислотой в концентрации  $10^{-13}$  М: число подвижных неповрежденных клеток оказалось больше на  $15,2 \pm 3,49$  млн/мл ( $P < 0,01$ ), чем в среде без добавки, выживаемость сперматозоидов после замораживания-оттаивания повысилась на 8,1 % ( $P < 0,01$ ), сохранность акросом — на  $1,9 \pm 0,63$  % ( $P < 0,05$ ).

**2. Сохранность бычьих сперматозоидов под влиянием 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты ( $10^{-13}$  М) при температуре 40 °С в среде с разной осмолярностью ( $n = 11$ ,  $X \pm \bar{x}$ )**

Осмолярность среды, мосм/л	Подвижных клеток, %					
	после разбавления		через 1 ч при 40 °С		через 2 ч при 40 °С	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
366	28±4,8 <sup>a</sup>	42±5,8 <sup>a</sup>	10±0,9 <sup>e</sup>	14±1,6 <sup>e</sup>	0	0
336	60±3,2 <sup>A</sup>	60±3,2 <sup>B</sup>	29±3,7 <sup>d</sup>	41±3,3 <sup>d</sup>	11±2,4	26 <sup>i</sup> ±3,0
306	24±2,4 <sup>b</sup>	40±4,4 <sup>b</sup>	11±1,6 <sup>e</sup>	19±2,7 <sup>e</sup>	0	6±1,6
276	15±2,2 <sup>c</sup>	31±4,0 <sup>c</sup>	0	12±1,5	0	0
246	4±2,4 <sup>*</sup>	20±3,2 <sup>*</sup>	0	6±1,8	0	0

Примечание. Использована сперма быков с исходной активностью 5-6 баллов.

\* Различия в вариантах aa, bb, cc, dd, ee, ii, Aa, Ab, Bb и Ba статистически значимы при  $P < 0,01$ , в gg — при  $P < 0,05$ .

2-Бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота в той же концентрации  $10^{-13}$  М положительно влияла и на устойчивость бычьих сперматозоидов при изменении осмолярности среды для разбавления (табл. 2). Сразу после разбавления при комнатной температуре (20 °С) в изотонической для бычьих сперматозоидов осмолярности (336 мосм/л) 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота не влияла на активность клеток по сравнению с контрольной. Однако через 1 и 2 ч после хранения (при 40 °С) в присутствии добавки подвижность сперматозоидов в изотонической среде оказалась выше соответственно на 12 и 15 % ( $P < 0,01$ ), чем в контроле. При

уменьшении или увеличении осмолярности среды относительно изотонической на 30 мосм/л доля подвижных клеток в сперме снижалась сразу при разбавлении (см. табл. 2), однако в среде с 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислотой ( $10^{-13}$  М) — только на 18-20 %, тогда как в контроле — на 32-36 %. В гипоосмотических условиях через 1 ч в контроле наблюдали полную гибель сперматозоидов, а в опыте 6-12 % клеток сохраняли подвижность. В гиперосмотических условиях (366 мосм/л) через 1 ч доля подвижных сперматозоидов в опыте была достоверно выше по сравнению с контролем — на 14 % ( $P < 0,05$ ).

Фазово-контрастная микроскопия не выявила морфологических различий в структуре акросомы и жгутика сперматозоидов между опытным и контрольным вариантами сразу после разбавления спермы, тогда как разная осмолярность среды приводила к изменению сохранности и живучести сперматозоидов (см. табл. 2). После холодового шока в контрольной среде 40 % сперматозоидов утратили двигательную активность, в то время как в варианте с  $10^{-13}$  М 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислотой подвижность сперматозоидов уменьшилась на 26 %. Можно предположить, что наблюдаемое повышение устойчивости клеток к осмотическим воздействиям и холодовому шоку связано с защитным эффектом, который оказывают исследованные производные бензимидазола на мембранные структуры сперматозоидов.

Как известно, подвижность и время переживания сперматозоидов зависят от работы системы энергообеспечения — дыхания и фосфорилирования и напрямую связаны с функциональным состоянием митохондрий. Мембраны митохондрий наиболее чувствительны к действию повреждающих факторов (28). Сукцинат усиливает клеточное дыхание, проникая только через поврежденную плазматическую мембрану, а динитрофенол служит разобщителем тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (28). В наших опытах (табл. 3) стимуляция дыхания бычьих сперматозоидов сукцинатом после замораживания и оттаивания в присутствии 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты ( $10^{-13}$  М) была ниже, а ДНФ — выше, чем в контроле, что указывает на лучшую сохранность функции энергетического аппарата при использовании добавки. Этим подтверждается предположение, что сверхмалые концентрации (дозы) исследованных производных бензимидазола способствуют повышению устойчивости мембранных структур сперматозоидов к действию сверхнизкой температуры.

### 3. Изменение скорости дыхания у бычьих сперматозоидов под влиянием 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты ( $10^{-13}$ М) при замораживании и оттаивании ( $\bar{X} \pm \bar{x}$ )

Сперма	Активность, балл	Дыхание, нмоль $O_2$ /мин		
		скорость	стимуляция	
			сукцинатом К	ДНФ
Свежеразбавленная	7,0-8,0	130,0 $\pm$ 1,56	1,06 $\pm$ 0,012	2,20 $\pm$ 0,050
После замораживания и оттаивания:				
контроль	4,0-5,0	77,0 $\pm$ 3,82	2,03 $\pm$ 0,187	1,57 $\pm$ 0,029
опыт	4,5-6,0	88,0 $\pm$ 5,03	1,47 $\pm$ 0,730*	1,84 $\pm$ 0,021*

Примечание. ДНФ — 2,4-динитрофенол.

\* Различия с контролем статистически значимы при  $P < 0,01$ .

Известно, что при охлаждении и замораживании сперматозоидов происходит выход ионов  $K^+$  в среду, что отрицательно сказывается на живучести клеток (31). Производные бензимидазола служат ингибиторами  $H^+/K^+$ -АТФазы плазматической мембраны и предотвращают избыточный выход  $K^+$ . По-видимому, взаимодействуя с рецептором на внешней мембране сперматозоида, производные бензимидазола вызывают каскадную пе-

рестройку мембранных структур клетки. Одновременно изменяется вязкость воды вследствие возникновения водородных связей между молекулами с образованием кластеров. В результате может повышаться устойчивость мембранных структур к повреждающему действию колебаний осмотического давления, происходящих при замораживании и оттаивании. Кроме того, возможно, при замерзании воды изменяется характер кристаллообразования в сторону уменьшения размера кристаллов, что снижает их повреждающее влияние. Отсутствие выраженного действия изученных веществ в промежуточных концентрациях согласуется с классической теорией свободных рецепторов R.P. Stephenson (32-34), согласно которой максимальный эффект достигается при связывании лиганда только с небольшой частью рецепторов.

Итак, при введении 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в сверхнизкой концентрации  $10^{-13}$ - $10^{-15}$  М в среду для замораживания спермы быков и жеребцов отмечали наибольшую активность и сохранность сперматозоидов (по времени переживания и доле сохраняющих подвижность клеток) после замораживания и оттаивания, холодового шока при изменении осмолярности и повышенной температуре (40 °С). Динитрофенол практически одинаково усиливал клеточное дыхание в опыте и в контроле, тогда как сукцинат, который проникает через поврежденные мембраны, оказывал меньшее стимулирующее влияние в присутствии 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты. Наблюдаемый эффект предположительно связан с защитным действием 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты на плазматическую мембрану и мембранные структуры митохондрий сперматозоидов вследствие взаимодействия молекулы исследуемого вещества с рецептором на внешней мембране, а также с возможным влиянием 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты на состояние молекул воды, ассоциированных с мембранными белками.

*<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных,  
196625 Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское ш., 55-а,  
e-mail: nikitkinae@mail.ru, shapievism@bk.ru, kirill060674@mail.ru;  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский аграрный университет,  
196601 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, Петербургское ш., 2,  
e-mail: seshar@gmail.com*

*Поступила в редакцию  
30 декабря 2016 года*

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 2, pp. 298-305*

## ULTRA-LOW CONCENTRATIONS OF BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES CAN INCREASE BULL AND HORSE SEMEN RESISTANCE AT CRYOPRESERVATION AND UNDER THE INFLUENCE OF DAMAGING FACTORS

*E.V. Nikitkina<sup>1</sup>, I.Sh. Shapiev<sup>1</sup>, K.V. Plemyashov<sup>1</sup>, S.A. Kharitonov<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Federal Agency of Scientific Organizations, 55-a, Moskovskoe sh., pos. Tayrlevo, St. Petersburg, 196625 Russia, e-mail nikitkinae@mail.ru (corresponding author), shapievism@bk.ru, kirill060674@mail.ru;*

*<sup>2</sup>St. Petersburg Agrarian University, 2, Peterburgskoe sh., St. Petersburg, 196601 Russia, e-mail seshar@gmail.com (corresponding author)*

*ORCID: Nikitkina E.V. [orcid.org/0000-0002-8496-5277](https://orcid.org/0000-0002-8496-5277)*

*The authors declare no conflict of interests*

*Received December 30, 2016*

*doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.298eng*

### Abstract

One of the possible ways to improve sperm cryopreservation is to find how to increase the resistance to damaging effects of low temperatures. Here we summarize our findings on the

bull and stallion semen cryoresistance as influenced by ultra-low concentrations of biologically active substances, the ethyl-1-benzimidazol-2-yl-sulfanyl, 2-ethylsulfanyl-benzimidazol-1-yl and 2-benzimidazol-1-yl-acetic acid. It was found that these substances increased survivability of bull semen during storage in lactose-citrate semen extender. The best motility and vitality of sperm after freezing and thawing was observed when sperm was diluted by extender with added 2-benzimidazol-1-yl-acetic acid in the ultra-low concentrations of  $10^{-13}$  to  $10^{-15}$  M. The viability of sperm to 10 % motility was 73 % higher as compared to control. Similarly, freezing equine sperm in extender supplemented with 2-benzimidazol-1-yl-acetic acid at  $10^{-13}$  M was more effective: the semen survival after freezing and thawing was 8.1 % ( $P < 0.01$ ) higher than that in the control, and the intactness of acrosome was  $1.9 \pm 0.63$  % higher ( $P < 0.05$ ). 2-Benzimidazol-1-yl-acetic acids also improved semen vitality at 40 °C when different osmolarity and after cold shock. It can be assumed that the observed phenomenon is likely due to the protective effect of 2-benzimidazole-1-yl-1-acetic acid to plasma membrane and the mitochondria membrane structure of spermatozoa. Study of respiration in bovine sperm after freezing and thawing confirmed this assumption. Indeed, dinitrophenol almost equally increased cell respiration despite the presence or absence of 2-benzimidazole-1-yl-1-acetic acid in the semen extender while succinate, which penetrates through the damaged membranes, had less stimulating effect when 2-benzimidazole-1-yl-1-acetic acid added. The studies suggested the hypothesis that benzimidazole, a biologically active substance, at ultra-low concentrations can bind to a receptor on the sperm outer membrane resulting in the cell membrane restructuring. At the same time, the changes in viscosity of water associated with the membrane proteins may occur due to hydrogen bonds between water molecules and acid residues of benzimidazole molecules. As a result stability of the membrane structures to damaging effect of varying osmotic pressure increases. Possibly crystal formation of water associated with the cell membranes is decreasing during freezing that also reduces the damaging effect.

Keywords: sperm, freezing, benzimidazole, ultralow concentrations, cell membrane, mitochondria, bulls, stallions.

## REFERENCES

1. Naumenkova V.A., Bragina E.E., Nikitkina E.V. Resistance of stallion's sperm to freezing due to introduction of SKQ1 antioxidant to the medium. *Agricultural Biology*, 2012, 2: 64-68 (doi: 10.15389/agrobiology.2012.2.64eng) (in Engl.).
2. Dzhamaldinov A.Ch., Narizhny A.G., Kreindlina N.I., Kuripko A.N. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2012, 8: 69-70 (in Russ.).
3. Epushina T.M. *Veterinarnaya patologiya*, 2009, 2: 32-33 (in Russ.).
4. Chaveiro A., Liu J., Mullen S., Woelders H., Critser J.K. Determination of bull sperm membrane permeability to water and cryoprotectants using a concentration-dependent self-quenching fluorophore. *Cryobiology*, 2004, 48: 72-80.
5. Chaveiro A., Machado L., Frijters A., Engel B., Woelders H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, 2006, 65(9): 1875-1890 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.10.017).
6. Aleksandrov V.Ya. *Tsitologiya*, 1965, 7(4): 10-15 (in Russ.).
7. Kurbatov A.D., Platov E.M., Korban N.V., Moroz L.G., Nauk V.A. *Kriokonservatsiya spermy sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh* [Farm animal semen cryoconservation]. Leningrad, 1988 (in Russ.).
8. Amirat-Briand L., Bencharif D., Vera-Munoz O., Bel Hadj Ali H., Destrumelle S., Desherces S., Schmidt E., Anton M., Tainturier D. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. *Theriogenology*, 2009, 71(8): 1209-1214 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.002).
9. El-Sheshtawy R.I., El-Nattat W.S., Sabra H.A. Effect of addition of catalase with or without L-tryptophan on cryopreservation of bull extended semen and conception rate. *Global Veterinaria*, 2013, 11(3): 280-284 (doi: 10.5829/idosi/gv.2013.11.3.7612).
10. Muino R., Pena A.I., Rodriguez A., Tamargo C., Hidalgo C.O. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*, 2009, 72(6): 860-868 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.06.009).
11. Serhat Büyükleblebici, Pürhan Barbaros Tuncerb, Mustafa Numan Bucak, Ayse Ekend, Serpil Sariözkan, Umüt Tasdemir, Burcu Ünlü Endirlik. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Anim. Reprod. Sci.*, 2014, 150(3-4): 77-83 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.09.006).
12. Sidorov O.A. *Materialy nauchnogo soveshchaniya po voprosam farmakologicheskoi regulyatsii kletochnoi rezistentnosti* [Proc. of Workshop on pharmacological regulation of cell resistance].

- Leningrad, 1963: 18-20 (in Russ.).
13. Andreeva E.N. V sbornike: *Sintez belka i rezistentnost' kletok* [In: Protein synthesis and cell resistance]. Leningrad, 1971: 36-40 (in Russ.).
  14. Rusin V.Ya. Vliyanie dibazola na ustoichivost' kletok k povrezhdeniyu. V sb.: *Sintez belka i rezistentnost' kletok* [In: Protein synthesis and cell resistance]. Leningrad, 1971: 58-61 (in Russ.).
  15. Burlakova E.B. *Vesti RAN*, 1994, 64(5): 425 (in Russ.).
  16. Cheretaev I.V., Korenyuk I.I., Gamma T.V., Khusainov D.R. *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya Biologiya, khimiya*, 2014, 27/66(4): 93-99 (in Russ.).
  17. Burlakova E.B. *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 1999, 43(5): 3-11 (in Russ.).
  18. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Mal'tsev D.I., Kulikova O.G., Rybakova E.Yu., Bogdanov V.V., Yamskov I.A. *Materialy VI Mezhdunarodnogo kongressa «Slabye i sverkhslabye polya i izlucheniya v biologii i meditsine»* [Proc. VI International Congress «Low and superlow fields and radiations in biology and medicine»]. St. Petersburg, 2012: 98. Available <http://www.biophys.ru/arch-ive/congress2012/proc-p98-d.pdf>. No date (in Russ.).
  19. Boldyreva L.B., Boldyreva E.M. The model of superfluid physical vacuum as a basis for explanation of efficacy of highly diluted homeopathic remedies. *Journal of Homeopathy & Ayurvedic Medicine*, 2012, 1(2): 2-6 (doi: 10.4172/2167-1206.1000109).
  20. Denisov Yu.D. To question on the proof parareceptor mechanism of action of ultra-low doses xenobiotics. *EurAsian Journal of BioMedicine*, 2011(4): 17-20.
  21. Koreniuk I.I., Gamma T.V., Katiushyna O.V., Epishkin I.V., Khusainov D.R., Shylina V.V., Cheretaev I.V., Kolotilova O.I. Effect of concentration ultralow 1,5-benzodiazepinona-2 on the pain threshold in rats intoxicated with their organism cadmium chloride. *European Journal of Natural History*, 2013, 1: 16.
  22. Ezz H.A.A., Elkala R.S. Ultra-low-dose naloxone added to fentanyl and lidocaine for peribulbar anesthesia: A randomized controlled trial. *Egyptian Journal of Anaesthesia*, 2015, 3: 161-165.
  23. Yovell Y., Bar G., Mashiah M., Baruch Y., Briskman I., Asherov J., Lotan A., Rigbi A., Panksepp J. Ultra-low dose buprenorphine as a time-limited treatment for severe suicidal ideation: a randomized controlled trial. *The Am. J. Psychiat.*, 2016, 173(5): 491-498 (doi: 10.1176/appi.ajp.2015.15040535).
  24. Doutremepuich S., Aguejouf O., Belon P. Effects of ultra-low-dose aspirin on embolization in a model of laser-induced thrombus formation. *Semin. Thromb. Hemost.*, 1996, 22(S1): 67-70.
  25. Doutremepuich C., Aguejouf O., Desplat V., Eizayaga F.X. Paradoxical thrombotic effects of aspirin: experimental study on 1000 animals. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, 2010, 10(2):103-110 (doi: 10.2174/187152910791292510).
  26. Slavetskaya M.B., Kapai N.A. *Sverkhmalye dozy biologicheskii aktivnykh veshchestv kak osnova lekarstvennykh preparatov* [Ultra-low doses of bioactive substances as medicines]. Moscow, 2011 (in Russ.).
  27. *Sperma bykov zamorozhennaya. GOST 26030-2015* [Frozen semen of bull series. State Standard GOST 26030-2015]. Moscow, 2015 (in Russ.).
  28. Moroz L.G., Shapiey I.Sh., Korban N.V. *Sposob otsenki kachestva spermy sel'skokhozyaistvennykh zivotnykh. A.S. 938990 (RF). Vserossiiskii NII genetiki i razvedeniya sel'skokhozyaistvennykh zivotnykh (RF) № 293645. Zayavl. 09.06.1980* [Method to estimate farm animal semen quality. A.C. 938990 (RF). All-Russian Institute of Farm Animal Genetics and Breeding (RF) № 293645. Published June 30, 1982, Bul. № 24 (in Russ.).
  29. Belous A.M., Bondarenko V.A., Gulevskii A.K. *Kriobiologiya*, 1987, 2: 3-10 (in Russ.).
  30. Wolfw J., Bryant G. *Cryobiology and anhydrobiology of cells*. Sydney, 2004.
  31. Kononov V.P., Mambetaliev M.S., Turbin V.F. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, 1993, 4: 47-52 (in Russ.).
  32. Stephenson R.P. A modification of receptor theory. *Brit. J. Pharmacol.*, 1956, 11: 379-393.
  33. Zaitsev S.V., Efanov A.M., Sazanov L.A. *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 1999, 5(43): 28-33 (in Russ.).
  34. Torchinskii A.A., Zhernovkov V.E. *Materialy I Ezhegodnoi molodezhnoi konferentsii IBKHF RAN «Biokhimicheskaya fizika»* [Proc. I Annual Conf. of Young Scientists of IBCP RAS «Biochemical Physics»]. Moscow, 2001: 12-30 (in Russ.).