

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССА КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВОДОРОДОМ*

Марина Николаевна Иващенко^{1,2}, кандидат биологических наук

Анна Вячеславовна Дерюгина¹, доктор биологических наук

Андрей Александрович Белов^{1,2}, кандидат биологических наук

Михаил Иванович Латушко³, кандидат технических наук

Павел Сергеевич Игнатьев³, кандидат физико-математических наук

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

²ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный агротехнологический университет имени Л.Я. Флорентьева», г. Нижний Новгород, Россия

³Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод» имени Э.С. Яламова, г. Екатеринбург, Россия
E-mail: kafedra2577@mail.ru

Аннотация. Исследовано влияние молекулярного водорода на функциональные показатели сперматозоидов крупного рогатого скота (подвижность, содержание АТФ, окислительные процессы, жизнеспособность, морфология акросомы). Сперму быков черно-пестрой породы разбавляли стерильной средой BioXcell. Для анализа действия молекулярного водорода на сперматозоиды его добавляли в BioXcell. Показатели изучали в нативной сперме, разбавленной средой BioXcell, в сперме после глубокой заморозки, а также в сперме, подвергнутой глубокой заморозке и предварительной обработке молекулярным водородом. Добавление молекулярного водорода в среду для разбавления спермы способствовало росту подвижности клеток, усилению энергетического обмена и снижению оксидативного стресса в сперматозоидах. Доказана необходимость углубленного изучения влияния молекулярного водорода на качественные характеристики сперматозоидов крупного рогатого скота и уточнения на этой основе существующих технологических регламентов консервации семени.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, молекулярный водород, сперматозоиды, криоконсервация, АТФ, подвижность, окислительный стресс

IMPROVEMENT OF THE PROCESS OF CRYOPRESERVATION OF CATTLE SPERM WITH MOLECULAR HYDROGEN

M.N. Ivashchenko^{1,2}, *PhD in Biological Sciences*

A.V. Deryugina¹, *Grand PhD in Biological Sciences*

A.A. Belov^{1,2}, *PhD in Biological Sciences*

M.I. Latushko³, *PhD in Technical Sciences*

P.S. Ignatiev³, *PhD in Physical and Mathematical Sciences*

¹National Research Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod, Russia

²Nizhny Novgorod State Agrotechnological University named after L.I. Florentyev, Nizhny Novgorod, Russia

³Production Association "Ural Optical and Mechanical Plant" named after E.S. Yalamov, Yekaterinburg, Russia
E-mail: kafedra2577@mail.ru

Abstract. The effect of molecular hydrogen on the functional parameters of bovine sperm cells has been studied. The influence of molecular hydrogen on motility, ATP content, oxidative processes, viability and morphology of the acrosome in bull spermatozoa has been studied. The study was performed on sperm production of black-and-white cattle. The sperm was diluted with a sterile BioXcell medium (France). To analyze the effect of molecular hydrogen on bull spermatozoa, molecular hydrogen was added to the BioXcell medium. The analyzed parameters were studied in native sperm diluted with BioXcell medium, in sperm after deep freezing, as well as sperm subjected to deep freezing and pretreatment with molecular hydrogen. The addition of molecular hydrogen to the medium for diluting sperm contributed to an increase in cell mobility, increased energy metabolism and reduced oxidative stress of spermatozoa. The results obtained showed the need for an in-depth study of the effect of molecular hydrogen on the qualitative characteristics of sperm in cattle and, on this basis, to clarify the existing technological regulations for seed conservation.

Keywords: cattle, molecular hydrogen, spermatozoa, cryopreservation, ATP, mobility, oxidative stress

Криоконсервация продолжает оставаться одним из наиболее перспективных методов длительного хранения спермы генетически улучшенных и исчезающих видов животных. Данный метод способствует широкому распространению генетического разнообразия и вносит значительный вклад в развитие репродуктивных технологий. [9, 10, 15]

Однако криоконсервация негативно влияет на физиологические характеристики сперматозоидов. Процесс заморозки и оттаивания спермы приводит к повреждению клеток и снижению качества эякулята. Межвидовые различия в размере, форме и составе липидных и белковых компонентов мембраны сперматозоидов свидетельствуют о том, что существующие

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00205 / The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-26-00205.

шие методы недостаточно эффективны. Доказано, что сперматозоиды сельскохозяйственных животных наиболее чувствительны к криоконсервации. [12]

Технология криоконсервации спермы быков обеспечивает выживаемость приблизительно 40...50% сперматозоидов после размораживания. [3, 10] Есть данные о том, что окислительный стресс, возникающий в ходе замораживания и оттаивания спермиев – ведущий фактор в снижении их фертильности. Известно, что плазматическая мембрана половых клеток помогает взаимодействию между сперматозоидом и яйцеклеткой. Для крупного рогатого скота в мембране гамет характерно повышенное содержание ненасыщенных жирных кислот, по сравнению с насыщенными, что делает ее уязвимой к повреждениям и перекисному окислению липидов. В результате активации свободнорадикальных процессов изменяется конфигурация структурных компонентов мембран, что приводит к ухудшению качества размороженных сперматозоидов, снижению их жизнеспособности и подвижности после размораживания. [17] Для высокой фертильности сперматозоидов необходимым фактором считается и структурно-функциональная целостность акросомы. Активные формы кислорода могут повредить акросомный слой сперматозоидов, что ухудшает их способность проникать через блестящую оболочку яйцеклетки. [12]

Совершенствование протоколов криоконсервации спермы крупного рогатого скота позволило бы преодолеть множество проблем, связанных со снижением качества размороженной спермы.

Эффективный ингибитор свободнорадикальных процессов – молекулярный водород. Он обладает преимуществами перед другими антиоксидантами. Это обусловлено его селективным действием на активные формы кислорода, которые в низких концентрациях регулируют процессы апоптоза и дифференцировки клеток. Соответственно, необоснованное использование высоких доз антиоксидантов может нарушить вышеупомянутые процессы. Молекулярный водород, в отличие от других антиоксидантов, преодолевает клеточные мембраны и проникает в органоиды клетки. Ни в одном из исследований не сообщается о его токсических эффектах. [11, 13, 14, 19]

Цель работы – оптимизация процесса криоконсервации спермы быков путем введения в среду для ее разбавления молекулярного водорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили *in vitro* на кафедре физиологии, биохимии животных и акушерства Нижегородского государственного агротехнологического университета имени Л.Я. Флорентьева и в лаборатории ООО «Нижегородское» по племенной работе.

Объект изучения – сперма *черно-пестрых голшти-низированных* быков. Сбор спермы осуществляли в соответствии с национальными стандартами криоконсервации и применения генетического материала племенных производителей. [4] Использовали около 50 эякулятов быков в возрасте трех лет. Отбирали семя с подвижностью сперматозоидов более 7 баллов.

Для анализа воздействия молекулярного водорода на сперматозоиды эякулят смешивали со средой для разбавления спермы BioXcell. В качестве криопротектора в состав BioXcell добавляли молекулярный водород в концентрации 1,2 мг/л. Получали молекулярный водород с помощью установки Бозон-Н-Н₂/O₃.

Замораживали сперму в открытых гранулах по 0,2 мл в соответствии с ГОСТом 26030-2015 в течение 7,5 мин. до температуры минус 145°C, затем контейнеры с образцами помещали в жидкий азот (минус 196°C).

После криоконсервации сперматозоиды отделяли от семенной плазмы центрифугированием при 400 г в течение 10 мин., надосадочную жидкость сливали. Осадок суспендировали в 1 мл физиологического раствора. Лизис сперматозоидов проводили трехкратным замораживанием/оттаиванием. Затем образцы центрифугировали при 2500 г – 5 мин.

Каждый образец эякулята делили на три пробы: первая (контроль) – сперма нативная, разбавленная BioXcell; вторая – после глубокой заморозки, предварительно разбавленная BioXcell; третья – после глубокой заморозки, предварительно обработанная молекулярным водородом и разбавленная BioXcell.

В сперматозоидах оценивали АТФ по методу И.Л. Виногодовой с соавторами, концентрацию малонового

Влияние молекулярного водорода и криоконсервации на морфофункциональные показатели сперматозоидов быков, (M ± m)

Показатель	Нативные сперматозоиды, контроль	Сперматозоиды	
		после криоконсервации	воздействия молекулярным водородом и криоконсервации
Подвижность, %	82,51 ± 5,95	71,15 ± 4,34*	79,62 ± 3,60* ^Δ
Содержание АТФ, мкмоль/л	0,79 ± 0,09	0,28 ± 0,05*	0,47 ± 0,04* ^Δ
Присутствие акросомы	99,57 ± 4,53	89,57 ± 5,13*	94,23 ± 4,48
Нормальное положение акросомы	97,32 ± 3,41	91,24 ± 2,39*	94,54 ± 3,25
Нормальная форма акросомы	90,24 ± 2,24	81,36 ± 2,19*	86,44 ± 3,12
Компактное содержимое акросомы	85,33 ± 3,37	74,32 ± 3,37	75,44 ± 3,23
МДА, нМоль/мл	0,61 ± 0,32	0,85 ± 0,14*	0,56 ± 0,08* ^Δ
Содержание ДК, ед.опт.пл/мг	0,24 ± 0,04	0,40 ± 0,08*	0,19 ± 0,03 ^Δ
Содержание ТК, ед.опт.пл/мг	0,58 ± 0,24	0,88 ± 0,11*	0,27 ± 0,05* ^Δ
Содержание ОШ, ед. опт. пл/мг	50,17 ± 4,87	61,21 ± 2,46	50,50 ± 7,02
НOS-тест	93,9 ± 3,03	79,9 ± 5,32*	84,9 ± 2,88*

Примечание: * – статистически значимые различия по отношению к контролю, p ≤ 0,05; ^Δ – статистически значимые различия между группами после криоконсервации, p ≤ 0,05.

диальдегида (МДА), содержание диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов, оснований Шиффа. [1, 2, 7] Подвижность сперматозоидов определяли с помощью спермоанализатора SA-500 фирмы «Биола» (Россия).

Ультраструктуру сперматозоидов устанавливали электронно-микроскопическим исследованием. Эякулят фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида и 1% осмиевой кислотой, заливали в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы просматривали через электронный микроскоп Hitachi SU8220 (Япония), анализировали положения и формы акросомы.

Жизнеспособность сперматозоидов оценивали с помощью теста на гипосмотическое набухание (HOS-тест). Все формы набухания жгутика подсчитывали как живые сперматозоиды. Число набухших клеток на 100 исследуемых сперматозоидов выражали в процентах.

Результаты обрабатывали по параметрическому t-критерию Стьюдента, используя программу Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После замораживания и оттаивания подвижность сперматозоидов уменьшилась на 13,77%, по сравнению с контрольной группой клеток. После криоконсервации значительно увеличилось перекисное окисление липидов, что свидетельствует о развитии окислительного стресса (см. таблицу). Уровень малонового диальдегида в исследуемых образцах был выше на 30%, содержание диеновых и триеновых конъюгатов — 67 и 52% соответственно, по сравнению с нативными образцами ($p \leq 0,05$). После замораживания/оттаивания в сперматозоидах зафиксировано снижение уровня АТФ на 64,56%, по сравнению с контролем.

Микроскопическое исследование структуры акросомы после криоконсервации выявило изменение ее положения и формы, наблюдалось ее набухание. Жизнеспособность сперматозоидов, определенная с помощью HOS-теста, в результате замораживания и оттаивания уменьшилась на 14,91% относительно интактных клеток.

Подтверждено, что при замораживании спермы быков в сперматозоидах усиливаются процессы свободнорадикального окисления, снижается фертильность и интенсивность биохимических процессов, связанных с выработкой энергии.

Добавление молекулярного водорода в среду для разбавления спермы и последующая заморозка изменяли функциональный статус клеток после оттаивания, подвижность сперматозоидов увеличилась на 12%, концентрация АТФ — 67,86% относительно спермиев, не подвергшихся воздействию молекулярного водорода ($p \leq 0,05$).

После криоконсервации спермиев с молекулярным водородом отмечено выраженное изменение интенсивности свободнорадикальных процессов, снижение уровня МДА, ДК, ТК на 34,12%, 52,5, 69,32% соответственно, относительно группы клеток, которые подвергались криоконсервации в среде без молекулярного водорода.

Проведенные нами исследования доказывают, что молекулярный водород достоверно лучше ($p \leq 0,05$) защищает спермий от негативного воздействия ультранизких температур. Добавление молекулярного водорода в состав разбавителя спермы улучшает био-

логические показатели ее качества, фертильность, повышает энергетический метаболизм сперматозоидов.

При криоконсервации в сперматозоидах накапливаются супероксидные радикалы — предшественники высокоактивных гидроксильных радикалов, как наиболее реакционноспособных молекул из-за наличия неспаренного электрона. [5, 8] Образовавшиеся активные формы кислорода приводят к повреждению ДНК, белков, липидов, развитию окислительного стресса и снижению функциональных показателей спермиев.

Можно предположить, что положительное воздействие молекулярного водорода на функциональные характеристики сперматозоидов связано с его антиоксидантными свойствами. Доказано, что он предупреждает образование супероксидного анион-радикала, селективно восстанавливает гидроксильный радикал, стимулирует активность антиоксидантных ферментов, модулирует сигнальную трансдукцию в клетках. [6, 16, 18, 20–22]

Таким образом, добавление молекулярного водорода в среду для замораживания спермы быков повышает биологическую полноценность сперматозоидов. Необходимо продолжать изучение влияния молекулярного водорода на качественные характеристики сперматозоидов у крупного рогатого скота и уточнять существующие технологические регламенты консервации семени.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Виноградова И.Л. Метод одновременного определения 2,3 ДФГ и АТФ в эритроцитах // Лабораторное дело. 1980. № 7. С. 424–426.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
3. Дерюгина А.В., Ивашенко М.Н., Лодяной М.С. Оценка резистентности мембран сперматозоидов быков в процессе долгосрочного хранения // Естественные и технические науки. 2022. Т. 1 (164). С. 107–109.
4. Национальная технология замораживания и использования спермы племенных быков-производителей / под ред. А.И. Абилова, Н.М. Решетниковой. М.: 2008. 160 с.
5. Пискарев И.М., Иванова И.П., Самоделькин А.Г., Ивашенко М.Н. Инициирование и исследование свободно-радикальных процессов в биологических экспериментах. Нижний Новгород, 2016. 106 с.
6. Рахманин Ю.А., Егорова Н.А., Михайлова Р.И. Молекулярный водород: биологическое действие, возможности применения в здравоохранении (обзор) // Гигиена и санитария. 2019. Т. 98. № 4. С. 359–365.
7. Хышиктуев Б.С., Хышиктуева Н.А., Иванов В.Н. Методы определения продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха и их клиническое значение // Клиническая лабораторная диагностика. 1996. № 3. С. 13–15.
8. Aitken R., Gibb Z., Mitchell L. et al. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols // Biol Reprod. 2012. V. 87(5). PP. 110. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102020>
9. Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon // J. Androl. 2000. V. 21. PP. 1–7. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>

10. Bailey J., Morrier A., Cormier N. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species // *Can J. Anim Sci.* 2003. V. 83. PP. 393–401. <https://doi.org/10.4141/A03-024>
11. Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L. et al. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012. V. 3. CD007176.
12. Grötter L.G., Cattaneo L., Estela P. et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization // *Reprod Domest Anim.* 2019. V. 54. P. 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
13. Finkel T., Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // *Nature.* 2000. V. 408 (6809). PP. 239–247.
14. Kimura H. Hydrogen sulfide: from brain to gut // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. V. 12 (9). PP. 1111–1123.
15. Kumar A., Prasad J.K., Srivastava N., Ghosh S.K. Strategies to minimize various stress-related freeze-thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa // *Biopreserv Biobank.* 2019. V. 17. P. 603–612. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
16. Liu G.-D., Zhang H., Wang L. Molecular hydrogen regulates the expression of miR-9, miR-21 and miR-199 in LPS-activated retinal microglia cells // *Int. J. Ophthalmol.* 2013. V. 6. № 3. PP. 280–285.
17. McQueen D.B., Zhang J., Robins J.C. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis // *Fertil. Steril.* 2019. № 112. PP. 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.003>
18. Sato Y., Kajiyama S., Amano A. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-dependent SMP30/GNL knockout mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 375. № 3. PP. 346–350.
19. Smith R., Murphy M. Mitochondria-targeted antioxidants as therapies // *Discov. Med.* 2011. V. 11 (57). PP. 106–114.
20. Ohsawa I., Ishikawa M., Takahashi K. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals // *Nat. Med.* 2007. V. 13. № 6. PP. 688–694.
21. Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine // *Pharmacol. Ther.* 2014. V. 144. № 1. PP. 1–11.
22. Xie K., Yu Y., Pei Y., Hou L. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release // *Shock.* 2010. V. 34. № 1. PP. 90–97.
23. eneniya v zdravooхранenii (obzor) // *Gigiena i sanitariya.* 2019. T. 98. № 4. S. 359–365.
24. Hyshiktuev B.S., Hyshiktueva N.A., Ivanov V.N. Metody opredeleniya produktov perekisnogo okisleniya lipidov v kondensate vydyhaemogo vozduha i ih klinicheskoe znachenie // *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 1996. № 3. S. 13–15.
25. Aitken R., Gibb Z., Mitchell L. et al. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols // *Biol Reprod.* 2012. V. 87(5). PP. 110. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102020>
26. Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon // *J. Androl.* 2000. V. 21. PP. 1–7. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>
27. Bailey J., Morrier A., Cormier N. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species // *Can J. Anim Sci.* 2003. V. 83. PP. 393–401. <https://doi.org/10.4141/A03-024>
28. Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L. et al. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012. V. 3. CD007176.
29. Grötter L.G., Cattaneo L., Estela P. et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization // *Reprod Domest Anim.* 2019. V. 54. P. 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
30. Finkel T., Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // *Nature.* 2000. V. 408 (6809). PP. 239–247.
31. Kimura H. Hydrogen sulfide: from brain to gut // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. V. 12 (9). PP. 1111–1123.
32. Kumar A., Prasad J.K., Srivastava N., Ghosh S.K. Strategies to minimize various stress-related freeze-thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa // *Biopreserv Biobank.* 2019. V. 17. P. 603–612. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
33. Liu G.-D., Zhang H., Wang L. Molecular hydrogen regulates the expression of miR-9, miR-21 and miR-199 in LPS-activated retinal microglia cells // *Int. J. Ophthalmol.* 2013. V. 6. № 3. PP. 280–285.
34. McQueen D.B., Zhang J., Robins J.C. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis // *Fertil. Steril.* 2019. № 112. PP. 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.003>
35. Sato Y., Kajiyama S., Amano A. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-dependent SMP30/GNL knockout mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 375. № 3. PP. 346–350.
36. Smith R., Murphy M. Mitochondria-targeted antioxidants as therapies // *Discov. Med.* 2011. V. 11 (57). PP. 106–114.
37. Ohsawa I., Ishikawa M., Takahashi K. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals // *Nat. Med.* 2007. V. 13. № 6. PP. 688–694.
38. Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine // *Pharmacol. Ther.* 2014. V. 144. № 1. PP. 1–11.
39. Xie K., Yu Y., Pei Y., Hou L. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release // *Shock.* 2010. V. 34. № 1. PP. 90–97.

REFERENCES

1. Vinogradova I.L. Metod odnovenennogo opredeleniya 2,3 DFG i ATF v eritrocitah // *Laboratornoe delo.* 1980. № 7. S. 424–426.
2. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranah. M.: Nauka, 1972. 252 s.
3. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Lodyanov M.S. Ocenka rezistentnosti membran spermatozoidov bykov v processe dolgo-rochnogo hraneniya // *Estestvennye i tekhnicheskie nauki.* 2022. T. 1 (164). S. 107–109.
4. Nacional'naya tekhnologiya zamorazhivaniya i ispol'zovaniya spermy plemennyh bykov-proizvoditelej / pod red. A.I. Abilova, N.M. Reshetnikovoj. M.: 2008. 160 s.
5. Piskarev I.M., Ivanova I.P., Samodelkin A.G., Ivashchenko M.N. Inicirovanie i issledovanie svobodno-radikal'nyh processov v biologicheskikh eksperimentah. Nizhnij Novgorod, 2016. 106 s.
6. Rahmanin Yu.A., Egorova N.A., Mihajlova R.I. Molekulyarnyj vodorod: biologicheskoe dejstvie, vozmozhnosti prim-

Поступила в редакцию 03.12.2024
Принята к публикации 17.12.2024