

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ *IN VITRO*

В. П. СИМОНЕНКО, А. И. ГАНДЖА, Л. Л. ЛЕТКЕВИЧ,
И. В. КИРИЛЛОВА, Е. Д. РАКОВИЧ, О. П. КУРАК,
Н. В. ЖУРИНА, М. А. КОВАЛЬЧУК

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»,
г. Жодино, Республика Беларусь, 222160

(Поступила в редакцию 16.01.2021)

Изучены биологические показатели спермиев быков-производителей при капацитации вне организма: концентрация спермиев (млрд/мл), общая подвижность спермиев (%), подвижность прямолинейно-поступательная (%), DCL – расстояние кривой пути (мкм), DAP – расстояние среднего пути (мкм), DSL – расстояние прямой пути (мкм), VCL – криволинейная скорость (мкм/сек), VAP – средняя скорость по траектории (мкм/сек), VSL – прямолинейная скорость (мкм/сек), LIN – линейность (%), STR – прямолинейность (%), WOB – колебание (%), BCF – частота биения головки (биений/сек), ALH – амплитуда бокового смещения головки (мкм).

Анализ биологических параметров спермы проводили с помощью системы Sperm Vision™ Professional, которая включает фазово-контрастный микроскоп с эргономичной рамой и основанием, программное обеспечение, цифровую камеру, ПК укомплектованный принадлежностями. Исследовали каплю спермы: 1) после процедуры флотации; 2) после капацитации с гепарином; 3) после созревания в среде оплодотворения; 4) после оплодотворения.

В процессе подготовки спермы к оплодотворению отмечалась четкая тенденция снижения в среднем общей подвижности спермиев (на 14,2 %), подвижности спермиев с прямолинейно-поступательным движением (на 19,0 %), расстояния кривой пути (на 12,6 %), расстояния среднего пути (на 5,4 %), расстояния прямой пути (на 3,2 %), криволинейной скорости (на 26,0 %), средней скорости движения по траектории (на 11,7 %); прямолинейной скорости движения (на 7,9 %) и частоты биения головки (на 5,7 %). В тоже время увеличились показатели линейности (на 9,8 %), прямолинейности (на 6,2 %) и колебания (на 10,2 %), а значения амплитуды бокового смещения головки существенно не изменились.

Ключевые слова: сперма, ооцит, подвижность, скорость, траектория, амплитуда, эмбрион.

The biological parameters of the breeding bull sperm cells during in vitro capacitation were studied. The following parameters were calculated: sperm concentration (billion/ml), total motility of sperm (%), progressive motility (%), DCL – distance of the curve line (microns), DAP – distance of the average path (microns), DSL – distance of the straight line (microns), VCL – curvilinear velocity (microns/s), VAP – average path velocity (microns/s), VSL – straight line velocity (microns/s), LIN – linearity (%), STR – straightness (%), WOB – wobble (%), BCF – beat cross frequency (beats/s), ALH – amplitude of lateral head displacement (microns).

The analysis of the sperm biological parameters was carried out using the Sperm Vision™ Professional system, which includes a phase-contrast microscope with an ergonomic frame and base, software, a digital camera, and a PC equipped with accessories. A drop of semen was examined: 1) after the flotation procedure; 2) after capacitation with heparin; 3) after maturation in the fertilization medium; 4) after fertilization.

In the process of preparing sperm for fertilization, there was a clear tendency of reducing on average the total motility of sperm cells (by 14.2 %), the progressive motility of sperm cells (by 19.0 %), the distance of the curve line (by 12.6 %), the distance of the average path (by 5.4 %), the distance of the straight line (by 3.2 %), the curvilinear velocity (by 26.0 %), the average path velocity (by 11.7 %); the straight line velocity (by 7.9 %) and the beat cross frequency (by 5.7 %). At the same time, the indicators of linearity, straightness and wobble increased by 9.8 %, 6.2 %, and 10.2 %, respectively, while the values of the amplitude of lateral head displacement did not change significantly.

Key words: semen, oocyte, motility, velocity, trajectory, amplitude, embryo.

Введение. Для решения вопросов, связанных с репродуктивной биологией, требуется глубокое изучение генеративных клеток, в том числе и их ультраструктурных элементов и других биологических показателей.

В ветеринарии и животноводстве много лет известны следующие методы оценки качества спермы животных: изучение анатомического строения сперматозоидов, объема эякулята, цвета, запаха, консистенции; оценка подвижности, густоты, интенсивности дыхания, резистентности, скорости обесцвечивания и др. [1]. В животноводстве оценку спермы по подвижности проводят по десятибалльной системе. Наивысшую оценку – 10 баллов – дают сперме в том случае, если все спермии обладают поступательным движением; при оценке 9 баллов – 9 спермиев из 10 обладают прямолинейно-поступательным движением, при оценке 6 баллов – 6 из 10 и так далее. Активность выражают в баллах по шкале Персова, в которой за 5 баллов принимается быстрое поступательное движение всех спермиев; за 4 балла – быстрое поступательное движение большинства спермиев, но в поле зрения встречаются отдельные сперматозоиды, осуществляющие замедленное зигзагообразное, круговое или колебательное движение; за 3 балла принимается быстрое поступательное движение части спермиев, преобладает замедленное зигзагообразное, круговое или колебательное движение, имеются неподвижные спермии; 2 балла – быстрое поступательное движение редко, у части спермиев колебательное движение, около 75 % спермиев неподвижно; 1 балл – все спермии неподвижны. Концентрация спермы. Концентрация сперматозоидов в сперме легко оценивается различными методами, такими как подсчет под микроскопом, спектрофотометрией, проточной цитометрией и определение значений сперматокрита. Однако предлагаемые различные методы представляют некоторые неудобства: начиная от длительности метода, заканчивая дороговизной оборудования.

Интерес к оценке движения сперматозоидов и к попыткам понять, что оно может сообщить нам о биологии спермы и ее функциональной компетенции, появился шесть десятилетий назад в классических работах, опубликованных, Gray J., Rothschild L. и их коллегами [2–4]. Тем не менее изучение кинематики сперматозоидов у животных, основан-

ное на ручной оценке подвижности сперматозоидов, впервые появилось в работе группы профессора David G. [5] и в лаборатории Dott H. M. [6], которые разрабатывали способы использования микрофотографии и микрокинематографии для количественной оценки подвижности сперматозоидов. Overstreet J.W. и Katz D.F. [7, 8] расширили основную работу по микрокиносъемке спермы, они впервые использовали видеосъемку при анализе спермы под микроскопом, и эту методику быстро подхватили другие ученые.

Оценка подвижности сперматозоидов получила широкое распространение в технологии искусственного воспроизводства, поскольку такой метод позволяет установить качество получаемых половых продуктов, выявить аномалии и предотвратить неэффективность оплодотворения. Использование низкокачественного семени может привести к экономическим потерям в животноводстве [9–11].

Данная разработка будет способствовать объективной оценке репродуктивного потенциала быков-производителей и позволит прогнозировать результаты не только искусственного осеменения, предстоящего экстракорпорального оплодотворения, но и раннего эмбрионального развития, в чем и заключается новизна исследований.

Цель работы – изучить биологические показатели спермиев быков-производителей при капацитации вне организма.

Основная часть. Исследования выполнены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» в 2020 г.

Замороженную сперму быков-производителей РУСП «Минское племпредприятие» (Лексус 500578, Лайен 500346, Балеро 500608, Ранг 500494, Апполон 500444, Барри 500482) оттаивали на водяной бане. Оттаянную сперму либо извлекали из пайеты и проводили исследование, либо помещали в 1 мл среды для капацитации и оставляли на 1 час в CO₂-инкубаторе для проведения *swim up* процедуры, при которой наиболее активная часть сперматозоидов всплывает в верхние слои питательной среды. Данную фракцию сперматозоидов собирали, помещали в другую пробирку с питательной средой для капацитации сперматозоидов и дважды подвергали процедуре центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 минут. При втором отмывании в среду добавляли гепарин (150 ед./мл). Затем сперму дважды центрифугировали в среде для оплодотворения ооцитов, которая готовилась на основе среды Тироде. Ооциты трижды отмывали в среде для оплодотворения, помещали в лунку с этой же средой, после чего к ним добавляли сперму в концентрации 1 млн./мл. Совместное инкубирование продолжалось в течение 18–20 часов, после чего ооциты отмывались от среды для оплодотворения и помещались в среду для культивирования ранних зародышей на монослой кумулюсных клеток, где зародыши

созревают до преимплантационных стадий.

Анализ биологических параметров спермы проводили с помощью системы Sperm Vision™ Professional, которая включает фазово-контрастный микроскоп с эргономичной рамой и основанием, программное обеспечение, цифровую камеру, ПК укомплектованный принадлежностями.

Для этого каплю спермиев быков вносили в счетную камеру и накрывали покровным стеклом. Исследовали каплю спермы на следующих этапах: 1) после процедуры флотации; 2) после капацитации с гепарином; 3) после созревания в среде оплодотворения; 4) после оплодотворения. Измеряли: концентрацию спермиев (млрд/мл), общую подвижность спермиев (%), подвижность прямолинейно-поступательную (%), DCL – расстояние кривой пути (мкм), DAP – расстояние среднего пути (мкм), DSL – расстояние прямой пути (мкм), VCL – криволинейную скорость (мкм/сек), VAP – среднюю скорость по траектории (мкм/сек), VSL – прямолинейную скорость (мкм/сек), LIN – линейность (%), STR – прямолинейность (%), WOB – колебание (%), BCF – частоту биения головки (биений/сек), ALH – амплитуду бокового смещения головки (мкм).

Изучены биологические показатели спермиев быков, их величины в сравнительном аспекте представлены на рис. 1.

На следующем этапе исследований определены показатели биологической полноценности спермы быков на разных этапах ее подготовки к оплодотворению. Установлено, что концентрация спермиев после процедуры флотации во всех опытных образцах находилась в пределах от 0,00270 млрд/мл (Барри 500482) до 0,01290 млрд/мл (Апполон 500444). После прохождения созревания в среде для капацитации с гепарином и в среде для оплодотворения концентрация спермиев в образцах изменялась за счет слипания головок гамет, что свидетельствует о готовности спермиев к оплодотворению. Каких-либо достоверных изменений не установлено. Величина значений показателя после завершения процедуры капацитации составила от 0,0020 млрд/мл (Лайен 500346) до 0,0227 млрд/мл (Апполон 500444). После совместного культивирования сперматозоидов с яйцеклетками в течение 18 часов наблюдалось снижение числа клеток с признаками агглютинации и одновременно увеличение количества единичных клеток. Концентрация их составила от 0,0029 млрд/мл (Лайен 500346) до 0,0240 млрд/мл (Апполон 500444).

Проведен анализ подвижности спермиев. Установлено, что спермии быка Ранг 500494 обладают самой высокой как общей подвижностью (84,0 %), так и подвижностью с прямолинейно-поступательным движением (59,0 %) после прохождения процедуры флотации.

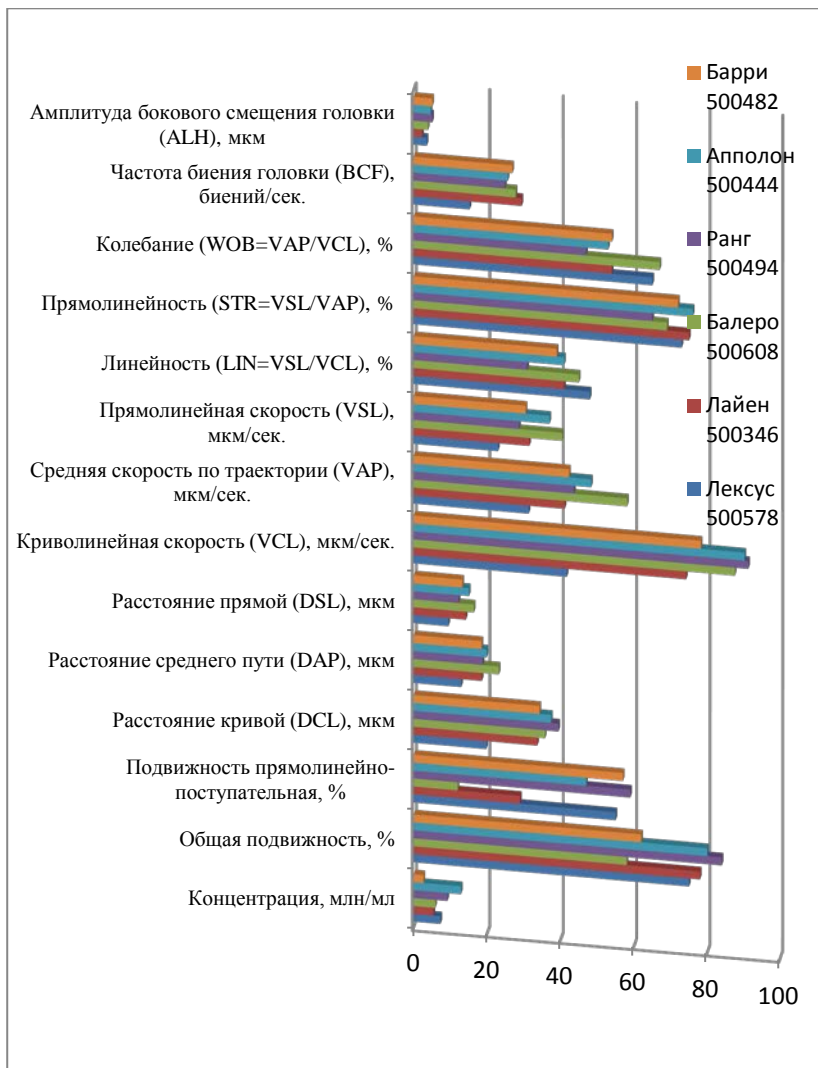


Рис. Показатели биологической полноценности спермы быков-производителей

В процессе созревания спермиев показатель общей подвижности снижался до 72,0 и 70,0 % соответственно на 2 и 3 этапе.

После завершения процесса оплодотворения этот показатель быка Ранг остался самым высоким, в отличие от остальных опытных образ-

цов, и составил 12 %. В то же время цифры подвижности спермиев быка Ранг 500494 с прямолинейно-поступательным движением были не самые лучшие (по сравнению с остальными образцами) на промежуточных этапах капацитации, однако их процент через 18 часов после оплодотворения остался самым высоким и составил 3 %. На всех этапах эксперимента во всех опытах отмечается четкая тенденция снижения общей подвижности спермиев, выраженной в процентах, а также подвижности спермиев с прямолинейно-поступательным движением. Так, за время капацитации наблюдалось снижение указанных показателей на 14,2 % и 19,0 % соответственно. Эта зависимость также связана с частичной агглютинацией головок спермиев в процессе подготовки к оплодотворению. Также, если перед оплодотворением общая подвижность спермиев быков находилась в пределах 47,0–78,0 %, подвижность спермиев с прямолинейно-поступательным движением на уровне 7,0–47,0 %, то после оплодотворения 6,0–12,0 % и 1,0–3,0 % соответственно.

Траекторию движения спермиев изучали путем измерения DCL – расстояния кривой пути, DAP – расстояния среднего пути, DSL – расстояние прямой пути. В ходе эксперимента отмечена четкая тенденция изменения данных показателей в сторону последовательного снижения от этапа к этапу. Если в начале эксперимента показатели DCL составляли 19,82–39,43 мкм, перед оплодотворением – 15,21–25,92 мкм, то после оплодотворения – 1,0–11,2 мкм. Показатели DAP выглядели аналогичным способом: 12,98–23,22 мкм; 10,1–14,81 мкм; 6,27–9,23 мкм соответственно. Показатели DSL продемонстрировали аналогичную зависимость: 9,47–16,41 мкм; 8,88–12,53 мкм; 1,21–3,33 мкм, соответственно. Таким образом, эти показатели перед оплодотворением оказались ниже, чем перед постановкой на капацитацию на 12,6 %, 5,4 и 3,2 % соответственно.

Изучение скорости движения сперматозоидов быков проводилось по следующим показателям: VCL – криволинейная скорость движения спермия, VAP – средняя скорость движения по траектории; VSL – прямолинейная скорость движения. Анализ числовых значений показал, что у быков Ранг 500494 и Апполон 500444 была самой высокой криволинейная скорость движения спермия (VCL) после процедуры флотации – 91,28 мкм/сек и 90,23 мкм/сек соответственно. После окончания процедуры капацитации у Ранга 500494 показатель остался на самом высоком уровне – 61,53 мкм/сек, а у Апполона 500444 составил 45,42 мкм/сек. Это оказалось значительно ниже, чем в остальных образцах. Необходимо отметить, что числовые значения средней скорости движения спермия по траектории (VAP) на всех этапах подготовки к оплодотворению демонстрировали устойчивое незначительное

снижение показателей в динамике от 31,36–58,15 до 26,19–6,81 мкм/сек. По истечении 18 часов после оплодотворения показатели VAP находились на достаточно приемлемом уровне в следующих пределах 17,2–19,53 мкм/сек. Следует отметить, что у быка Балеро 500608 наблюдалась самая высокая средняя скорость движения по траектории (VAP) – 58,15 мкм/сек, а также прямолинейная скорость (VSL) – 40,50 мкм/сек. VSL опытных образцов спермиев до капацитации составляла от 23,00 мкм/сек до 40,50 мкм/сек, на промежуточной стадии – от 18,75 мкм/сек до 36,37 мкм/сек, перед оплодотворением после завершения процедуры капацитации – от 22,73 мкм/сек до 29,37 мкм/сек. Завершение процесса оплодотворения вне организма позволило наблюдать снижение показателей в 2 раза при следующих значениях VSL: от 9,38 мкм/сек. до 14,14 мкм/сек.

Изучены параметры линейности (LIN), прямолинейности (STR) и колебания (WOB) в опытных образцах сперматозоидов быков. Установлено, что данные показатели на каждом последующем этапе подготовки к оплодотворению демонстрируют повышение биологической активности гамет, о чем свидетельствует повышение числовых значений. Так, перед капацитацией (LIN) составляла от 31,00 % до 48,00 %; (STR) – от 65,00 % до 76,00 %; (WOB) – от 47,00 % до 67,00 %, после гепарина – от 33,0 % до 52,0 %; от 66,0 % до 82,0 %; от 53,0 % до 68,0 %, соответственно; перед оплодотворением – от 39,0 % до 64,0 %; от 66,0 % до 88,0 %; от 59,0 % до 67, % соответственно. После окончания процедуры оплодотворения отмечено снижение показателей (LIN) в 2 раза, (STR) в 3–4 раза, (WOB) в 5–7 раз, что предсказуемо.

Анализ показателей WOB; BCF; ALH позволил установить незначительное увеличение колебания головки спермия на всех этапах капацитации во всех опытных образцах (за исключением спермы Балеро 500608 и Лексус 500578), показатели находились в пределах: до капацитации от 47,0 % до 67,0 % и после капацитации от 59,0 % до 76,0 %. Значения показателей частоты биения головки в аналогичные периоды исследований следующие: от 15,30 (биений/сек) до 29,43 (биений/сек) и от 11,43 (биений/сек) до 29,35 (биений/сек), соответственно. Амплитуда бокового смещения головки на всех этапах эксперимента существенно не отличалась и находилась в пределах значений 1,17–5,15 мкм.

Таким образом, определены показатели биологической полноценности спермы быков-производителей на разных этапах ее подготовки к оплодотворению, позволяющие в дальнейшем прогнозировать эффективность оплодотворяющей способности спермы быков вне организма.

Исследования по изучению зависимости между показателями биологической полноценности спермы на этапах подготовки и оплодотво-

ряемостью в условиях *in vitro* продолжают.

Заключение. В процессе подготовки спермы исследуемых быков к оплодотворению вне организма отмечалась четкая тенденция снижения в среднем общей подвижности спермиев (на 14,2 %), подвижности спермиев с прямолинейно-поступательным движением (на 19,0 %), расстояния кривой пути (на 12,6 %), расстояния среднего пути (на 5,4 %), расстояния прямой пути (на 3,2 %), криволинейной скорости (на 26,0 %), средней скорости движения по траектории (на 11,7 %); прямолинейной скорости движения (на 7,9 %) и частоты биения головки (на 5,7 %). В тоже время увеличились показатели линейности (на 9,8 %), прямолинейности (на 6,2 %) и колебания (на 10,2 %), а значения амплитуды бокового смещения головки существенно не изменились.

ЛИТЕРАТУРА

1. Комлык, И. П. Биотехника размножения. Рабочая тетрадь с методическими указаниями для лабораторно-практических занятий по курсу «Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных» / И. П. Комлык, В. Ю. Сиротинина. – Петрозаводск: ПГУ, 2002 – 43 с.
2. Gray J. Подвижность сперматозоидов быка. / J. Gray // J Exp Biol. – 1958. – Vol. 35. – P. 96–108.
3. Rikmenspoel R. Фотозлектрические и кинематографические исследования подвижности сперматозоидов быка / R. Rikmenspoel, G. van Herpen // Phys Med Biol. – 1957. – Vol.2. – P. 54–63.
4. Rothschild L. Новый метод измерения скорости сперматозоидов/ L.Rothschild // Nature. – 1953; Vol.171. – P. 512–513.
5. David G. Кинематика сперматозоидов человека. / G. David, C. Serres, P. Jouannet // Gamete Res. – 1981. – Vol. 4. – P.83–95.
6. Dott H. M. Методы измерения скорости передвижения сперматозоидов. / H. M. Dott, D. F. Katz // J Reprod Fertil. – 1975. – Vol. 45. – P. 263–272.
7. Overstreet, J. W. Простой недорогой способ объективной оценки характеристик движения сперматозоидов человека. / J. W. Overstreet [et al] // Fertil Steril. – 1979. – Vol. 31. – P. 162–172.
8. Katz D. F. Оценка подвижности сперматозоидов с помощью видеомикрографии / D. F. Katz, J. W. Overstreet // Fertil Steril. – 1981. – Vol.35. – P. 188–193.
9. Некрасов, А. А. Влияние биологической полноценности спермы быков-производителей канадской селекции на репродуктивные показатели коров отдельного стада / А. А. Некрасов, Н. А. Попов, Б. С. Иолчиев // Аграрная Россия. – 2017. – № 2. – С. 18–21.
10. Фертильность сперматозоидов и состояние хроматина: методы контроля (обзор) / В. А. Багиров [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 2. – С. 3–13.
11. Flowers W. L. Triennial Reproduction Symposium:sperm characteristics that limit success of fertilization // J. Anim. Sci. – 2013. – Vol. 91 (7). – P. 3022–3029.