

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

ПОКАЗАТЕЛИ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМЫ БЫКОВ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ПОДГОТОВКИ К ОПЛОДОТВОРЕНИЮ *IN VITRO*

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

Изучены показатели подвижности спермиев быков на всех этапах подготовки к оплодотворению *in vitro*. В процессе подготовки спермы к оплодотворению при прохождении через все этапы 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: ооцит, капацитация, подвижность, скорость, траектория, амплитуда, экстракорпоральное оплодотворение, капацитация, спермии.

A.I. GANDZHA, L.L. LETKEVICH, V.P. SIMONENKO, I.P. SHEIKO,
I.V. KIRILLOVA, E.D. RAKOVICH, O.P. KURAK, N.V. ZHURINA,
M.A. KOVALCHUK

INDICATORS OF BULLS' SEMEN MOTILITY AT DIFFERENT STAGES OF PREPARATION FOR *IN VITRO* FERTILIZATION

*Research and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

Indicators of bulls' semen motility were studied at all stages of preparation for *in vitro* fertilization. In the process of preparing semen for fertilization, when passing through all stages, there was a clear tendency for decrease in the average total motility of semen (by 14.2%), motility of sperm cells with rectilinear translational movement (by 19.0%), distance of the path curve (by 12.6%), distance of the average path (by 5.4%), distance of the straight path (by 3.2%), curvilinear speed (by 26.0%), the average speed of movement along the trajectory (by 11.7%); rectilinear movement speed (by 7.9%) and head oscillation frequency (by 5.7%). At the same time, indicators of linearity (by 9.8%), straightness (by 6.2%) and oscillations (by 10.2%) increased, and the values of the amplitude of the lateral head displacement did not change significantly.

Keywords: oocyte, capacity, motility, speed, trajectory, amplitude, *in vitro* fertilization, sperm cells.

Введение. Подвижность спермиев являются основным показателем для характеристики оплодотворяющей способности быка-производителя [1]. 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.

Первые работы по оценке движения сперматозоидов и попыток понять, что оно может сообщить нам нового о функциональной компетенции спермы, появились шесть десятилетий назад в классических работах, опубликованных, Gray J., Rothschild L. и их коллегами [2-4]. David G. [5] и Dott H.M. [6] впервые разработали 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.

Современные методы компьютерной диагностики качества спермы позволяют проводить точные исследования на высоком методическом уровне. В этой связи изучение показателей подвижности спермиев быков на всех этапах подготовки к оплодотворению *in vitro*, является актуальной задачей.

Была поставлена цель: изучить наряду с общей подвижностью спермиев быков скорость движения, подвижность прямолинейно-поступательную, траекторию движения, линейность и колебания.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» в 2020 году.

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 исследования, либо помещали в 1 мл среды для капацитации и оставляли на 1 час в СО₂-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 созревали 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).

Результаты эксперимента и их обсуждение. Результаты анализа показателей подвижности спермы быков-производителей на разных этапах подготовки к оплодотворению вне организма представлены в таблицах 1 и 2.

Перед изучением подвижности гамет исследовали концентрацию спермиев на всех этапах подготовки к оплодотворению. В ходе исследований 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

Таблица 1— Показатели подвижности спермы быков-производителей на разных этапах ее подготовки к оплодотворению вне организма

Показатели	Лексус 500578				Лайен 500346				Балеро 500608			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Общая подвижность, %	75,0	55,0	47,0	11,0	78,0	62,0	53,0	9,0	58,0	53,0	52,0	6,0
Подвижность прямолинейно- поступательная, %	55,0	21,0	7,0	2,0	29,0	24,0	22,0	1,0	12,0	11,0	11,0	1,0
Расстояние кривой, мкм	19,82	16,32	15,21	5,1	33,69	22,15	20,60	9,10	35,77	28,12	18,82	12,74
Расстояние среднего пути, мкм	12,98	11,62	10,10	6,27	18,61	14,69	12,75	8,46	23,22	15,45	11,54	9,23
Расстояние прямой, мкм	9,47	8,92	8,88	2,12	14,24	10,98	9,80	1,21	16,41	11,51	9,05	3,01
Криволинейная скорость, мкм/сек.	41,71	38,90	38,91	15,19	74,21	55,62	51,85	19,35	87,59	54,97	48,65	19,78
Средняя скорость по траектории, мкм/сек.	31,36	27,02	26,19	18,71	41,15	35,23	31,79	17,65	58,15	37,14	29,21	18,36
Прямолинейная скорость, мкм/сек.	23,00	24,41	23,25	10,11	31,52	18,75	24,76	9,38	40,50	31,85	22,73	12,30
Линейность, %	48,0	52,0	59,0	22,00	41,0	45,0	47,0	19,0	45,0	45,0	46,0	20,0
Прямолинейность, %	73,0	80,0	88,0	21,0	75,0	77,0	77,0	19,0	69,0	74,0	77,0	17,0
Колебание, %	65,0	67,0	67,0	11,0	54,0	59,0	61,0	9,0	67,0	62,0	60,0	8,0
Частота биения головки, биений/сек.	15,30	15,6	15,95	6,00	29,43	29,30	29,35	7,8	27,81	15,0	11,43	4,2
Амплитуда бокового смещения головки, мкм	3,61	3,29	3,18	1,52	2,38	2,72	2,86	1,5	3,96	3,89	4,03	1,82

Таблица 2 – Показатели подвижности спермы быков-производителей на разных этапах ее подготовки к оплодотворению вне организма

Показатели	Ранг 500494				Апполон 500444				Барри 500482			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Общая подвижность, %	84,0	72,	70,0	12,0	80,0	75,0	73,0	11,0	62,0	70,0	78,0	10,0
Подвижность прямолинейно-поступательная, %	59,0	29,0	23,0	3,0	47,0	41,0	47,0	1,0	57,0	33,0	34,0	1,0
Расстояние кривой, мкм	39,43	29,44	25,18	11,20	37,45	20,33	19,35	9,03	34,30	29,22	25,92	8,87
Расстояние среднего пути, мкм	18,85	17,93	14,81	8,24	19,94	16,89	14,81	7,36	18,51	15,55	15,54	8,33
Расстояние прямой, мкм	12,32	9,90	9,60	3,10	15,10	13,41	12,53	2,11	13,27	12,67	11,64	3,33
Криволинейная скорость, мкм/сек.	91,28	83,25	61,53	30,18	90,23	62,76	45,42	29,31	78,23	66,14	60,98	21,54
Средняя скорость по траектории, мкм/сек.	43,71	40,52	36,45	18,65	48,36	38,96	34,67	19,53	42,36	41,63	36,81	17,20
Прямолинейная скорость, мкм/сек.	28,76	25,00	24,27	11,93	37,00	36,37	29,37	13,58	30,53	28,44	27,86	14,14
Линейность, %	31,0	33,0	39,0	18,0	41,0	52,0	64,0	25,0	39,0	44,0	46,0	21,0
Прямолинейность, %	65,0	66,0	66,0	24,0	76,0	82,0	84,0	23,0	72,0	74,0	75,0	19,0
Колёбание, %	47,0	53,0	59,0	12,0	53,0	68,0	76,0	19,0	54,0	58,0	61,0	14,0
Частота биения головки, биений/сек.	24,92	23,12	22,37	6,9	25,65	24,45	23,29	5,6	26,89	23,48	20,44	5,1
Амплитуда бокового смещения головки, мкм	5,12	3,65	3,54	1,89	4,69	3,48	2,52	1,74	5,15	4,25	3,87	1,17

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. 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 образцов, 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 -36,81 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 67,0% 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.

Заключение. В процессе подготовки спермы к оплодотворению при прохождении через все этапы 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. Фотоэлектрические 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. 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.

Поступила 16.02.2021 г.