

С. 12-27.

9. Об утверждении зоотехнических правил по определению продуктивности племенных животных и определению племенной ценности животных : Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, № 81 от 30.11.2006. // Белзакон.NET [Электрон. ресурс]. – 2023. – Режим доступа: [https://belzakon.net/Законодательство/Постановление\\_Министерства\\_сельского\\_хозяйства\\_и\\_продовольствия\\_РБ/2006/73538](https://belzakon.net/Законодательство/Постановление_Министерства_сельского_хозяйства_и_продовольствия_РБ/2006/73538).

*Поступила 9.03.2023 г.*

УДК 636.2.082.31:591.391

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

## **КЛАССИФИКАЦИЯ СПЕРМИЕВ БЫКА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОЦЕДУРЫ ИКСИ**

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

Одна из распространённых причин снижения оплодотворяющей способности – неправильная морфология сперматозоидов. В связи с этим необходим строгий отбор сперматозоидов для оплодотворения по морфологическим показателям, который снижает частоту анеуплоидий по половым хромосомам. В статье представлены материалы исследований, в результате которых разработана классификация оценки прижизненной жизнеспособности спермиев быка, пригодных к ИКСИ, и выделены рекомендуемые параметры, включающие использование капацизированной вне организма спермы, оценённой в 0 баллов на присутствие посторонней микрофлоры, т. е. свободной от флоры или с единичными клетками в нескольких полях зрения, степенью подвижности и поступательным движением уровня А (активно подвижные с поступательным движением), без проксимальных и дистальных капель, без дефектов головки, тела и хвостика спермия и индексом тератозооспермии 1,0-1,3.

**Ключевые слова:** сперматозоид, капацигация, подвижность, скорость, траектория, амплитуда, индекс тератозооспермии.

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

## CLASSIFICATION OF BOVINE SPERMATOZOA DURING THE ICSI PROCEDURE

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

One of the common causes of decreased fertility is abnormal sperm morphology. Therefore, a rigorous selection of spermatozoa for fertilization according to morphological parameters is required to reduce the frequency of sex chromosome aneuploidies. The paper contains the materials of research, as a result of which a classification for assessing the intravital viability of bovine spermatozoa suitable for ICSI was developed, and recommended parameters were highlighted, including the use of sperm capacitated in vitro, rated at 0 points for the presence of foreign microflora, i.e. free from flora or with single cells in several fields of view, a degree of motility and translational movement of level A (actively motile with translational movement), without proximal and distal drops, without defects in the head, body and tail of the sperm, having a teratozoospermia index of 1.0-1.3.

**Keywords:** spermatozoon, capacitation, motility, speed, trajectory, amplitude, teratozoospermia index.

**Введение.** Изменённая морфология сперматозоидов препятствует правильному слиянию цитоплазмы яйцеклетки и сперматозоида либо ведёт к рецепторной дисфункции, а нарушения в организации ядер у морфологически аномальных сперматозоидов снижают их оплодотворяющую способность [1]. Установлено, что мужской геном экспрессируется у эмбрионов уже на стадии 4-8 бластомеров. На этой стадии развития эмбрион начинает развиваться согласно программе диплоидного генома и постепенно проявляются аномалии развития, обусловленные нарушениями в кариотипе сперматозоида [2]. Согласно приведённой концепции, необходим строгий отбор сперматозоидов для оплодотворения по морфологическим показателям. Такая методика уже развита в мировой клинической практике и получила название ИМСИ (усовершенствованная технология интрацитоплазматической инъекции – ИКСИ, основанная на микроинъекции тщательно отобранного морфологически нормального сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки). По литературным данным, использование метода ИМСИ снижает частоту анеуплоидий по половым хромосомам. Данная технология связана со значительно меньшим риском получения эмбрионов с хаотичным набором хромосом, что ведёт к уменьшению числа отмен переносов в циклах

вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [3].

Присутствие бактериальных штаммов приводит к увеличению доли аннексина (некротического маркера). Кроме того, в присутствии *S. haemolyticus*, *B. ureolyticus* или лейкоцитов наблюдалось значительное увеличение процентного содержания погибших сперматозоидов. Таким образом, в присутствии медиаторов воспаления наблюдается гибель сперматозоидов. Эти результаты показывают, что наличие таких диагнозов как бактериоспермия и лейкоспермия может выступать непосредственной причиной репродуктивной дисфункции или дополнительным негативным фактором, ухудшающим прогноз наступления беременности как естественным путём, так и с использованием ВРТ [4, 5].

В этой связи цель работы заключалась в разработке классификации сперматозоидов быка на предмет пригодности к ИКСИ.

**Материал и методика исследований.** Исследования проведены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» в 2022 году. Замороженную сперму быков-производителей голштинизированной породы оттаивали в водяной бане, подвергали исследованию, либо помещали в 1 мл среды для капацитации и оставляли на 1 час в CO<sub>2</sub>-инкубаторе для проведения *swim up* процедуры.

На предмет пророста питательной среды Тироде М изучали добавление 0,02 мл капацизированной свежеполученной или заморожено-оттаянной спермы быков. Степень пророста среды оценивали визуально под микроскопом при увеличении в 400 раз в баллах: 0 – отсутствие или наличие единичной флоры, 1 – до 50 % пророста среды в поле зрения, 2 – 50-100 % пророста среды в поле зрения на разных временных этапах опыта (в момент постановки на культивирование (0 ч), через 24, 48, 72, 96 и 120 часов).

Для определения количества морфологических аномалий спермиев быков до и после капацитации каплю спермы после специальной подготовки исследовали под микроскопом (увеличение в 400 раз), подсчитывали 200 клеток, учитывая отдельно нормальные и патологические клетки [6]. Определяли индекс тератозооспермии. Нормой считаются значения в интервале от 1,0 до 1,6.

Анализ биологических параметров жизнеспособности спермы проводили с помощью системы Sperm Vision™ Professional. Оценку проводили по следующим показателям: концентрация сперматозоидов; общая подвижность сперматозоидов, прямолинейно-поступательное движение; расстояние кривой пути; расстояние среднего пути; расстояние прямой пути; криволинейная скорость; средняя скорость по траектории; прямолинейная скорость; линейность; прямолинейность; колебание;

частота биения головки; амплитуда бокового смещения головки и изменение количества спермиев с различными аномалиями их развития: наличие проксимальных капель (аномалии головки спермия), наличие дистальных капель (аномалии тела спермия), наличие изогнутых либо изломанных хвостиков (аномалии хвостика спермии) [6, 7, 8, 9, 10].

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** При оценке качества спермиев на начальном этапе решающее значение имеет отсутствие патогенной и условно-патогенной микрофлоры в биологическом материале. Наличие данной микрофлоры оказывает негативное влияние не только на процесс оплодотворения при искусственном осеменении самок, но и на развитие зародышей. Однако в большинстве случаев это нивелируется защитными силами организма и, в частности, репродуктивной системой, что делает практически невозможной работу клеточных репродуктивных технологий вне организма. Использование спермы с наличием посторонней микрофлоры лишает возможности получения потомства от выдающихся животных. Дополнительное применение антибиотиков и фунгицидов, с одной стороны, нежелательно, так как несёт дополнительную токсическую нагрузку на гаметы и ранние зародыши, вплоть до появления мутаций. С другой стороны, как показала практика, с помощью данных средств всё равно не удаётся справиться с нежелательными микроорганизмами в питательных средах. Не помогает и многократное отмывание гамет культуральной средой. Этот приём лишь на короткое время помогает снизить концентрацию лишней флоры, которая затем даёт быстрый «взрывоопасный» рост в благоприятных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Кроме того, немаловажным является то, что для своего активного роста и развития микроорганизмы интенсивно используют питательные вещества среды, выделяя токсичные продукты жизнедеятельности, что также негативно сказывается на жизнеспособности гамет. Выход из этой ситуации остаётся один – это возможная прижизненная санация репродуктивной системы быков-производителей, которая проводится на племпредприятиях Республики Беларусь согласно ветеринарно-санитарным мероприятиям. Однако необходимо учитывать, что регламент этих мероприятий и контроль за ними распространяется на использование спермы для искусственного осеменения. Поэтому при работе с клеточными репродуктивными технологиями приходится работать с тем материалом, который имеем, а перед использованием заморожено-оттаянной спермы необходимо проводить её тестирование на присутствие микрофлоры. И не обязательно патогенная или условно-патогенная флора может вызвать «застаение» среды. Вполне безобидная флора для организма в благоприятных искусственно созданных условиях может создать катастрофические последствия для эксперимента и поставить под угрозу выполнение поставленных целей

и задач. Нами не ставилась задача идентификации присутствующих микроорганизмов в биологическом материале, с которым мы работаем. В этой связи мы не проводили посева на агар-агаре или бульоне, а использовали наши питательные среды для ЭКО, в которых очень хорошо, как оказалось, растут и размножаются нежелательные микроорганизмы (таблица 1). Степень пророста среды оценивали визуально под микроскопом при увеличении в 400 раз в баллах (0, 1, 2).

Таблица 1 – Пророст питательной среды Тироде М с добавлением 0,02 мл капцитированной спермы быка

Время культивирования, ч	Количество опытов		Пророст в баллах					
	свежеполученная, п	заморожено-оттаянная, п	0		1		2	
			свежеполученная, п-%	заморожено-оттаянная, п-%	свежеполученная, п-%	заморожено-оттаянная, п-%	свежеполученная, п-%	заморожено-оттаянная, п-%
0	10	101	10-100,0	88-87,1	-	13-12,9	-	-
24	10	101	8-80,0	40-39,6	2-20,0	41-40,6	-	20-19,8
48	10	101	6-60,0	35-34,7	4-40,0	38-37,6	-	28-27,7
72	10	101	3-30,0	36-35,6	7-70,0	33-32,7	-	32-31,7
96	10	101	2-20,0	29-28,7	6-60,0	30-29,7	2-20,0	42-41,6
120	10	101	2-20,0	26-25,7	4-40,0	24-23,8	4-40,0	51-50,5

Всего проведён анализ 111 опытов, один опыт – это один цикл культивирования биоматериала в замкнутом пространстве лунки или чашки Петри. Анализ проведённых исследований показал, что в момент постановки на культивирование 100,0 % свежеполученной капцитированной спермы оказалось чистой, в то время как заморожено-оттаянной – 87,1 %, что на 12,9 п. п. ниже. В 12,9 % экспериментов с заморожено-оттаянной спермой отмечено 50,0 % обсеменённости в поле зрения микроскопа. 100,0 % обсеменённости не наблюдалось ни в одном эксперименте. Через 24 часа культивирования картина стала меняться во всех опытных группах. Чистыми оказались 80,0 % образцов со свежеполученной и 39,6 % с заморожено-оттаянной спермой быков. У 20,0 % со свежей и у 40,6 % с оттаянной спермой наблюдался пророст на уровне 1 балла, а у 19,8 % с оттаянной – 2 баллов. Через 48 часов инкубации отсутствие пророста отмечено в 60,0 % сред со свежей и 34,7 % с деконсервированной спермой, 1 балл пророста – у 40,0 и 37,6 % образцов, 2 балла – у 0 и 27,7 % соответственно. 72 часа: 0 баллов пророс – 30,0 и 35,6 %, 1 балл – 70,0 и 32,7 %, 2 балла – 0 и 31,7 % соответственно. Через 96 часов: 0 баллов пророс – 20,0 и 28,7 %, 1 балл – 60,0 и 29,7 %, 2 балла – 20,0 и 41,6 % соответственно. Через 120 часов культивирования: 0 баллов пророс – 20,0 и 25,7 %, 1 балл – 40,0 и 23,8 %, 2 балла – 40,0 и 50,5 % соответственно. Проведение эксперимента в дальнейшем временном

отрезке более 120 часов не представляется целесообразным, хотя в практике экстракорпорального оплодотворения ооцитов коров наблюдались проросты в питательных средах и через 192 и через 216 часов эксперимента. Анализ представленных данных показывает, что, как правило, первые проросты появляются через 20-24 часа и в последующем они проявляются только более интенсивно. Образцы спермы с проростами использовать в технологии ИКСИ и других вспомогательных репродуктивных технологиях не рекомендуется, так как прогноз исхода их, как правило, отрицательный.

Таким образом, на начальном этапе исследований перед использованием в клеточных репродуктивных технологиях сперму быков-производителей необходимо обязательно тестировать на наличие посторонней микрофлоры, агрессивной в культуральных средах и токсичной для гамет. Использовать только сперму свободную от флоры или с единичными клетками в нескольких полях зрения.

Жизнеспособность спермиев в большей степени характеризуется их подвижностью, характером движения и возможностью сохранять подвижность во временном отрезке. На основе исследования функциональных показателей подвижности спермиев нами принята классификация четырёх уровней предварительной прижизненной оценки: А – активно подвижные с поступательным движением, В – малоподвижные с поступательным движением, С – малоподвижные с отсутствием поступательного движения, Д – неподвижные.

Проведён мониторинг 200 произвольно выбранных спермиев в каждом из четырёх образцов спермы быков на двух этапах подготовки к оплодотворению: после капацитации и после оплодотворения согласно четырём уровням подвижности. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты мониторинга спермы быков по подвижности

№ образца	Этап оценки спермиев	Уровни подвижности, n-%			
		А	В	С	Д
1	после капацитации	172-86,0	12-6,0	11-5,5	5-2,5
	после оплодотворения	41-20,5	59-29,5	48-24,0	52-26,0
2	после капацитации	168-84,0	10-5,0	18-9,0	4-2,0
	после оплодотворения	32-16,0	55-27,5	52-26,0	61-30,5
3	после капацитации	173-86,5	8-4,0	12-6,0	7-3,5
	после оплодотворения	38-19,0	43-21,5	38-19,0	81-40,5
4	после капацитации	171-85,5	10-5,0	6-3,0	13-6,5
	после оплодотворения	23-11,5	34-17,0	31-15,5	112-56,0

Как показали результаты исследований, после прохождения процедуры капацитации 84,0-86,0 % сперматозоидов активно и поступательно двигаются, количество малоподвижных спермиев с

поступательным движением составило 4,0-6,0 %, малоподвижных с отсутствием движения – 3,0-9,0 %, неподвижных – 2,0-6,5 %. После прохождения процедуры оплодотворения ситуация в опытных группах изменилась кардинально, что является закономерным процессом. Величины показателей составили: 11,5-20,5 %, 17,0-29,5, 15,5-26,0 и 26,0-56,0 % соответственно.

Как показывает анализ проведённых исследований, после завершения процедуры капацитации у 84,0-86,0 % спермиев наблюдается активная подвижность с выраженным поступательным движением, которая сохраняется у 11,0-20,5 % спермиев и спустя 18-20 часов. Таким образом, из данной популяции спермиев класса А имеется возможность неограниченного предварительного выбора гамет для клеточных репродуктивных технологий и ИКСИ в том числе.

На основании проведённых исследований нами разработана классификация жизнеспособности спермиев, пригодных к ИКСИ, включающая следующие показатели: присутствие посторонней микрофлоры в образце, подвижность и поступательное движение спермиев, присутствие проксимальных и дистальных капель, дефекты головки, тела и хвостика, индекс тератозооспермии (таблица 3).

Таблица 3 – Классификация жизнеспособности спермиев, пригодных к ИКСИ

Показатель	Параметры	Рекомендуемые параметры
Присутствие посторонней микрофлоры в образце	Баллы: 0, 1, 2 через 24-48 часов культивирования в среде Тироде	0
Подвижность и поступательное движение спермиев	Уровни: А, В, С, Д	А
Присутствие проксимальных и дистальных капель	+ или –	–
Дефекты головки, тела и хвостика	+ или –	–
Индекс тератозооспермии	1,0 – 1,6	1,0-1,3

**Заключение.** Разработана классификация жизнеспособности спермиев быка, пригодных к ИКСИ и выделены рекомендуемые параметры, включающие использование капацитированной вне организма спермы, оцененной в 0 баллов на присутствие посторонней микрофлоры, т. е. свободной от флоры или с единичными клетками в нескольких полях зрения, степенью подвижности и поступательным движением уровня А (активно подвижные с поступательным движением), без проксимальных и дистальных капель, без дефектов головки, тела и хвостика спермия и индексом тератозооспермии 1,0-1,3.

## Литература

1. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов / О. А. Воробьёва [и др.] // Проблемы репродукции. – 2005. – Т. 6. – С. 56–62.
2. Баранов, В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В. С. Баранов. – СПб., 2007. – 640 с.
3. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection results in improved clinical outcomes in couples with previous ICSI failures or male factor infertility: a meta-analysis / A. S. Setti [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2014. – Vol. 183. – P. 96-103. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2014.10.008
4. Can apoptosis and necrosis coexist in ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection? / M. Franzek [et al.] // 98 Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2015. – Vol. 32, № 5. – P. 771-779. DOI: 10.1007/s10815-015-0462-x
5. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных / А. П. Студенцов [и др.]. – Москва : КолосС, 2011. – 440 с.
6. Биологические показатели спермы быков-производителей in vitro / В. П. Симоненко [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. – Горки : БГСХА, 2021. – Вып. 24, ч. 1. – С. 70-77.
7. Ball, P. J. H. Reproduction in cattle / P. J. H. Ball, A. R. Peters. – 3th ed. – Oxford : Blackwell Publishing Ltd, 2004. – 250 p.
8. Показатели подвижности спермы быков на разных этапах подготовки к оплодотворению in vitro / А. И. Ганджа [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр., посвящ. памяти д-ра с.-х. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси Василия Михайловича Голушко. – Жодино, 2021. – Т. 56, ч. 1: Генетика, разведение, селекция, биотехнология размножения и воспроизводство. Технология кормов и кормления, продуктивность. – С. 21-28.
9. Показатели подвижности спермиев быков-производителей / А. И. Ганджа [и др.] // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сб. науч. ст. по материалам XXIV Междунар. науч.-практ. конф. к 70-летию образования университета, г. Гродно, 14 мая, 20 мая 2021 г. – Гродно : ГГАУ, 2021. – С. 103-104.
10. Фёдорова, И. Д. Принципы отбора сперматозоидов по морфологическим, биохимическим и физиологическим признакам для проведения внутрицитоплазматической инъекции сперматозоидов в ооцит / И. Д. Федорова, Е. М. Шильникова, А. М. Гзгзян // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. LXI, вып. 3. – С. 123-131.

*Поступила 11.01.2023 г.*

УДК 636.2.082.31:591.391

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

## **УСЛОВИЯ ПОДГОТОВКИ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИНТРАЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ИНЪЕКЦИИ**

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

В статье представлены данные работы, цель которой заключалась в