



ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТОКОЛОВ КОЛЛОИДНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ СПЕРМЫ БЫКОВ ДЛЯ IVF

Никитин Георгий Сергеевич, канд.ветеринар.наук, доц., orcid.org/0000-0002-2080-2970

Ачилов Вадим Вадимович, канд.ветеринар.наук, доц., orcid.org/0000-0003-2662-7250

Мирзакаева Ирина Ильдаровна, бакалавр биологии

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия

РЕФЕРАТ

В статье представлены данные эффективности использования различных протоколов подготовки спермы путем коллоидного центрифугирования (метод наслаивания градиента, или метод фракционирования в градиенте плотности) перед процедурами вспомогательных репродуктивных технологий, включая искусственное оплодотворение *in vitro*. Использование метода может повлиять на качество половых гамет и жизнеспособность эмбрионов, повысить процент успешной эмбриотрансплантации и способствовать появлению высокопродуктивного потомства.

В результате исследований определен наиболее оптимальный по морфофункциональным характеристикам протокол центрифугирования по методу наслаивания градиента с показателями первого и второго центрифугирования 700g – 20 мин и 100g – 10 мин соответственно. Средний показатель подвижных сперматозоидов составил $84,1 \pm 5,1\%$, прогрессивных сперматозоидов – $68,7 \pm 5,1\%$, скорость прямолинейно-поступательного движения составила 49,69 мкм/сек. Морфология и жизнеспособность соответствуют стандартам качества.

Ключевые слова: метод наслаивания градиента, метод фракционирования в градиенте плотности, метод коллоидного центрифугирования, сперма быка, подготовка спермы, оплодотворение *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Воспроизводство животных обуславливает развитие всех отраслей животноводства. В настоящее время в животноводстве крупного рогатого скота повсеместно используются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). С развитием репродуктивных биотехнологий возрастает роль искусственного оплодотворения *in vitro* (вне организма) для получения качественного и высокопродуктивного потомства. Оплодотворение *in vitro* часто используют для получения высокоценных племенных животных с целью увеличить выход потомства либо при наличии дефектных гамет [2, 3, 9].

Существует ряд методик, используемых для подготовки спермы к искусственному оплодотворению. Метод центрифугирования в градиенте плотности один из наиболее популярных; метод основан на прохождении спермы через дисперсионную среду, наслаенную в разной концентрации в конической пробирке – от более плотной на дне к менее плотной на поверхности. При центрифугировании в данной среде жизнеспособные и продуктивные сперматозоиды движутся против тока жидкости и скапливаются на дне пробирки, а неподвижную фракцию можно аспирировать из надосадочной жидкости [5, 7, 8, 9].

Несмотря на эффективность результатов и стремительное развитие отрасли искусственного оплодотворения, способы подготовки к процедуре и протоколы ее проведения разнятся, а усовершенствование методик продолжается. Часто протоколы процедуры подготовки гамет не стандар-

тизированы, к тому же она осложняется видовым и породным разнообразием, что требует различных подходов. Протоколы процедур должны соответствовать известным рекомендуемым методикам, а также учитывать особенности проведения анализа в каждой конкретной лаборатории.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании была использована криоконсервированная сперма с племенной станции в пайетах по 0,25 мл; семенной материал получен в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ. В исследовании принимало участие пять быков голштинской породы. Методы работы основаны на ГОСТ 32277 – 2013 «Средства воспроизводства. Сперма. Методы испытаний физических свойств и биологического, биохимического, морфологического анализов» и Руководству ВОЗ по исследованию и обработке эякулята (пятое издание). В ходе исследований проводилась оценка концентрации, подвижности, жизнеспособности, морфологии образцов спермы. Для этого помимо стандартных методов оценки качества было использовано ПО «Aргус-CASA» (Computer Assisted Semen Analysis) для компьютерной оценки качества спермы, что позволило ускорить процесс получения и обработки данных, увеличить их точность и достоверность [1, 4, 6, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки исходного качества спермы были исследованы свежемороженые спермодозы от всех быков. Оценка характеристик спермы производилась по стандартным методикам, в соот-

ветствии с ГОСТ 32277-2013. Подвижность образцов оценивалась визуально, производился расчет концентрации каждого образца по методике. Данные средних значений показателей представлены в Таблице 1.

Из данных таблицы видно, что все исследованные показатели соответствуют стандартам качества для криоконсервированной спермы. Подвижность всех образцов составила 60-70% (6-7 баллов), концентрация и выживаемость сперматозоидов в пробах соответствовала требованиям нормативных документов у всех быков. Полученные данные однородны, нет большого расхождения по показателям как в исследованных образцах от каждого быка, так и у быков между собой. Согласно анализу данных в ПО «IBM SPSS Statistics», результаты достоверны.

Одновременно со стандартными методами оценки качества спермы, проводилась оценка образцов с использованием программного обеспечения «Аргус-CASA». Образцы микрофотографировали в камере Маклера, изображение выводили на камеру. Результаты оценки через ПО «Аргус-CASA» были проанализированы и статистически обработаны; представлены в Таблице 2.

Полученные результаты были проанализированы, произведено сравнение оценки данных от стандартных методик с данными, полученными через программное обеспечение «Аргус-CASA» (Таблицы 1 и 2). На основании приведенных данных мы можем сделать вывод о целесообразности использования компьютерного анализа. Качество спермы исследуемых быков соответствует стандартам качества.

Методика центрифугирования в градиенте плотности отличается большой вариативностью режимов центрифугирования. На основании анализа литературы нами были отобраны протоколы действующих лабораторий и использовавшиеся в научных исследованиях. Характеристика режимов центрифугирования представлена в Таблице 3.

Проведя серию центрифугирований, мы оценили результат, используя программу «Аргус-CASA». Полученные массивы данных обрабатывали в Microsoft Office Excel и IBM SPSS Statistics. Результаты сравнения образцов на основе коммерческих сред представлены в Таблице 4.

На основании данных таблицы, мы можем сделать вывод, что режимы №1 и №3 наиболее сопоставимы по проценту прогрессивной спермы с показателями нативной, Образец №3 даже превышает ее. Образец №2 показал худшие результаты, процент прогрессивных сперматозоидов на нижней границе требований к качеству спермы.

Несмотря на то, что многие образцы после центрифугирования показали хорошую подвижность (№1, №3, №5), доля именно прогрессивных сперматозоидов была выше у образца №3 и №5. Наглядно это оценить можно из диаграммы Рис. 1.

Также сравнивали показатели скорости движения сперматозоидов, полученные при компьютерном анализе. Данные представлены на графике (Рис. 2). Обращая внимание на показатель прямолинейного движения (VSL), мы можем отметить, что большинство образцов после цен-

трифугирования (№3, №4, №5) показывали лучшие результаты по сравнению с нативным образцом: 38,64-52,13 против 37,10 мкм/сек. Из образцов с двойным центрифугированием наилучшие результаты по данному показателю у образца №3 – 49,69 мкм/с.

Показатели криволинейного движения (VCL) у отцентрифугированных образцов коррелируют со скоростью прямолинейного движения, что наглядно представлено на графике (Рис. 2). Это указывает на то, что даже при активации непрогрессивных сперматозоидов с усилением прямолинейно-поступательного движения, криволинейность их траектории не снизится.

Переживаемость (жизнеспособность) и морфология всех образцов до и после центрифугирования соответствовала нормативам качества для криоконсервированной спермы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективное воспроизводство поголовья – необходимый аспект развития любой отрасли животноводства. Использование вспомогательных репродуктивных технологий растет, а изобретаются и совершенствуются методы и подходы, направленные на повышение выхода продуктивного потомства. Искусственное оплодотворение – перспективное направление ВРТ, имеющее ряд особенностей в осуществлении процедуры. Так, гаметы нуждаются в специальной подготовке перед оплодотворением. В частности, стоит задача отбора фракции сперматозоидов и их активации.

В результате проведенных исследований подтверждена эффективность и целесообразность использования ПО «Аргус-CASA» при определении параметров подвижности спермы, которая находилась в пределе статистической достоверности.

В ходе собственных исследований определен наиболее оптимальный по морфофункциональным характеристикам режим центрифугирования по методу наслаивания градиента – режим №3 с показателями первого и второго центрифугирования 700g – 20 мин и 100g – 10 мин соответственно. Средний показатель подвижных сперматозоидов составил $84,1 \pm 5,1\%$, прогрессивных сперматозоидов – $68,7 \pm 5,1\%$, скорость прямолинейно-поступательного движения составила 49,69 мкм/сек. Морфология соответствует стандартам качества.

По сравнению с результатами, полученными из литературных источников, при проведении аналогичных методов подготовки спермы к искусственному оплодотворению исследователи отмечали более низкую эффективность методов, чем в проведенном нами исследовании. Стоит отметить изначально высокие показатели качества нативной спермы.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 32277 – 2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы испытаний физических свойств и биологического, биохимического, морфологического анализов. – М.: Издательство Стандартиформ, 2014. – 16с.
2. Андреев, Г.М. Основные причины нарушений воспроизводства крупного рогатого скота. Методы

Таблица 1.
Общие характеристики нативной спермы при оценке стандартными методиками

Бык	Подвижность, %	Оценка выживаемости (подвижность через 5 часов инкубации), %	Концентрация, млн/мл
1	60±5	40±5	210±10*
2	70±5	30±5	200±15*
3	50±5	30±5	180±30
4	60±15	50±5	200±10*
5	60±5	50±10	195±25
n = 50, (* при p≤0, 05)			

Таблица 2.
Общие характеристики нативной спермы при оценке через «Аргус-CASA»

Бык	Прогрессивные, %	Непрогрессивные, %	Прогрессивные + непрогрессивные, %	Неподвижные, %	Концентрация (млн/мл)
1	59,9±1,3*	11,3±1,3*	71,2±1,3*	28,8±1,3*	193±12*
2	64,3±2,2*	8,4±2,2*	72,7±2,2*	27,3±2,2*	207±22*
3	45,4±3,0*	12,1±3,0*	57,5±3,0*	42,5±3,0*	189±17*
4	52,3±1,7*	9,8±1,7*	62,1±1,7*	37,9±1,7*	211±25*
5	50,2±3,5	13,1±3,5	63,3±3,5	26,7±3,5	197±29
n=50, (* при p≤0, 05)					

Таблица 3.
Характеристика режимов центрифугирования

Номер режима	№1	№2	№3	№4	№5
Режим I и II центрифугирования	300g – 15 мин 200g – 5 мин	600g – 20 мин 200g – 20 мин	700g – 20 мин 100g – 10 мин	300g – 15 мин 300g – 5 мин	500g – 10 мин 200g – 10 мин

Таблица 4.
Сравнение общих характеристик образцов на основе коммерческих сред

Подвижность, %	№1	№2	№3	№4	№5	Нативная
прогрессивные	58,2±4,5*	41,8±3,9*	68,7±5,1*	46,9±9,4	58,9±6,2*	59,9±1,3*
непрогрессивные	23±4,5*	24±3,9*	15,4±5,1*	23,5±9,4	25,7±6,2*	11,4±1,3*
прогрессивные + непрогрессивные	81,2±4,5*	65,8±3,9*	84,1±5,1*	70,4±9,4	84,7±6,2*	71,2±1,3*
неподвижные	18,8±4,5*	34,2±3,9*	15,9±5,1*	29,6±9,4	15,4±6,2*	28,8±1,3*
концентрация (млн/мл) ¹	232,1	106,2	126,7	192,8	140,6	193
n = 10 (* при p≤0, 05)						

¹ концентрации являются условными, приведены для относительного сравнения образцов.

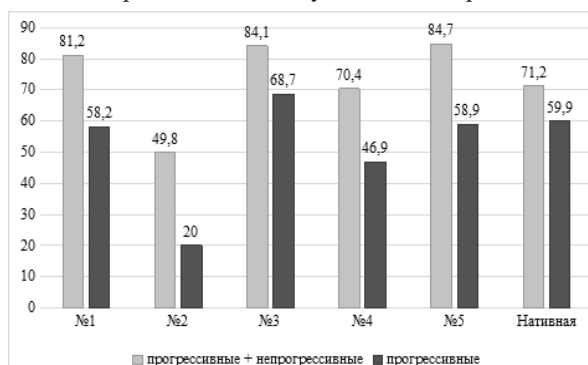


Рисунок 1. Сравнение фракции подвижных сперматозоидов с прогрессивными.

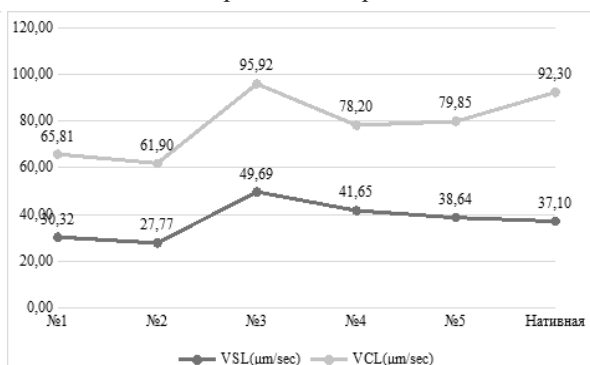


Рисунок 2. График сравнения характеристик подвижности.

дическое пособие / Г.М. Андреев, В.У. Давыдов, К.В. Племяшов. – СПб: Издательство ФГБОУ СПбГАВМ, 2004. – 13с.

3. Зиновьева, Н.А. Вспомогательные репродуктивные технологии: история становления и роль в развитии генетических технологий в скотовод-

стве (обзор) / Н.А. Зиновьева, С.В. Позябин, Р.Ю. Чинаров // С.-х. биол., Сельхозбиология. – 2020. – №2. – С. 225-242.

4. Никитин, Г.С. Использование корреляционно-го анализа для определения направления и количественного измерения связей в биометрии (на

примере зоогигиенической оценки скормливания различными кормами цыплят-бройлеров) / Г.С. Никитин, М.Г. Никитина // Практика использования естественнонаучных методов в прикладных социально-гуманитарных исследованиях. Сборник материалов методического семинара. – Тольятти.: Издательство Тольяттинский государственный университет. – 2014.

5. Никитин, Г.С. Современные подходы при получении и криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* / Г.С. Никитин // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – №3. – С. 192-205.

6. Солер, К. Новые методы анализа спермы с использованием системы CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) / К. Солер и др. // Сельскохозяй-

ственная биология. – 2017. – № 2. – С. 232-241.

7. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Научно-практическое издание. Пятое издание. – М.: Издательство «КАПИТАЛ ПРИНТ», 2012. – 292с.

8. Arias, M. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression / M.E. Arias, K.A.E. Briones, R. Felmer // Reproductive Biology. – 2017. – №2. – С. 126-132.

9. Tatsumi, K. New device for sperm preparation involving migration-gravity sedimentation without centrifugation compared with density-gradient centrifugation for normozoospermic intrauterine insemination / K. Tatsumi, T. Tatsumi, T. Uchida, K. Saito, H. Saito // F&S Reports. – 2020. – №2. – С. 106-112.

THE EFFICACY OF VARIOUS PROTOCOLS OF COLLOIDAL CENTRIFUGATION OF BOVINE SPERM FOR IVF

Georgy S. Nikitin, PhD of Veterinary Sciences, Docent, orcid.org/0000-0002-2080-2970

Vadim V. Achilov, PhD of Veterinary Sciences, Docent, orcid.org/0000-0003-2662-7250

Irina I. Mirzakaeva, Bachelor of Biology

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russia

The article presents data on the effectiveness of using various sperm preparation protocols by colloidal centrifugation (density gradient centrifugation method) before procedures of assisted reproductive technologies, including in vitro artificial insemination. The use of the method can affect the quality of sexual gametes and the viability of embryos, increase the percentage of successful embryotransplantation and contribute to the appearance of highly productive offspring.

As a result of the research, the most optimal protocol of centrifugation by the method of gradient layering with indicators of the first and second centrifugation 700g – 20 min and 100g – 10 min, respectively, was determined by morphofunctional characteristics. The average rate of motile spermatozoa was $84.1 \pm 5.1\%$, progressive spermatozoa – $68.7 \pm 5.1\%$, the rate of rectilinear translational motion was 49.69 microns/sec. Morphology and viability meet quality standards.

Key words: density gradient centrifugation method, bovine sperm, sperm preparation, in vitro fertilization.

REFERENCES

1. GOST 32277 – 2013. Means of reproduction. Sperm. Methods of testing physical properties and biological, biochemical, morphological analyses. – М.: Publishing House Standartinform, 2014. – 16p.

2. Andreev, G.M. The main causes of violations of reproduction of cattle. Methodical manual / G.M. Andreev, V.U. Davydov, K.V. Plemyashov. – St. Petersburg: Publishing house of FGBOU SPbGAVM, 2004. – 13p.

3. Zinovieva, N.A. Assisted reproductive technologies: the history of formation and the role in the development of genetic technologies in cattle breeding (review) / N.A. Zinovieva, S.V. Pozyabin, R.Yu. Chinarov // Agricultural biology, Agricultural biology. – 2020. – No. 2. – P. 225-242.

4. Nikitin, G.S. The use of correlation analysis to determine the direction and quantitative measurement of connections in biometrics (on the example of zoohygienic assessment of feeding broiler chickens with various feeds) / G.S. Nikitin, M.G. Nikitina // The practice of using natural science methods in applied socio-humanitarian research. Collection of materials of the methodological seminar. – Tolyatti.: Tolyatti State University Publishing

House. – 2014.

5. Nikitin, G.S. Modern approaches to obtaining and cryopreservation of cattle embryos in vitro / G.S. Nikitin // International Bulletin of Veterinary Medicine. – 2021. – No.3. – P. 192-205.

6. Soler, K. New methods of sperm analysis using the CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) system / K. Soler et al. // Agricultural Biology. – 2017. – No. 2. – P. 232-241.

7. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen FIFTH EDITION – М.: Publishing house "CAPITAL PRINT", 2012. – 292p.

8. Arias, M. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression / M.E. Arias, K.A.E. Briones, R. Felmer // Reproductive Biology. – 2017. – №2. – P. 126-132.

9. Tatsumi, K. New device for sperm preparation involving migration-gravity sedimentation without centrifugation compared with density-gradient centrifugation for normozoospermic intrauterine insemination / K. Tatsumi, T. Tatsumi, T. Uchida, K. Saito, H. Saito // F&S Reports. – 2020. – №2. – P. 106-112.