

СУЧАСНІ МОЖЛИВОСТІ АНАЛІЗУ ЯКОСТІ СПЕРМИ І РОЗРАХУНКУ СПЕРМОДОЗ

І. М. Яремчук, М. М. Шаран

Інститут біології тварин НААН

Наведена інформація про мікроскопічне дослідження клітин сперми комп'ютеризованою системою під назвою CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Система проводить автоматичне визначення рухливості і концентрації еякуляту, має об'єктивну і оптимальну за часом можливість визначення якості сперми. Визначає необхідну кількість розріджувача та кількість спермодоз, які можна отримати з одного еякуляту.

Ключові слова: МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, РУХЛИВІСТЬ, КОНЦЕНТРАЦІЯ, СПЕРМІЇ, РОЗРІДЖУВАЧ, ЕЯКУЛЯТ

Сперматологія — біологічна наука XXI століття, яка значною мірою забезпечить подальший науково-технічний прогрес біотехнології і племінної справи в тваринництві. Сьогодні сперматологія — окрема галузь біологічної і біотехнологічної наук зі своїм оригінальним предметом і методами досліджень. Сперма є актуальним об'єктом досліджень, що має теоретичне і практичне значення як для біології, біотехнології, так і для еволюції життя щодо передачі інформації від покоління до покоління, забезпечення вічності життя [1, 2].

Слід особливо відзначити, що недостатньо оцінювати сперму за одним конкретним критерієм, бажано визначати якомога більше показників, оскільки, сперма — це складна, інтегрована і динамічна біологічна система. Розрідження сперми, незначна її доза для штучного осіменіння призводить до того, що у статеві шляхи самки попадає невелика кількість спермій. Це підвищує вимоги до якості спермодози, яка у кінцевому результаті визначає ступінь запліднення. Крім того, дуже важливо прогнозувати запліднюючу здатність, яка повинна бути основним критерієм при остаточному вирішенні про подальше застосування кожного конкретного еякуляту [3].

Аналіз сперми повинен бути точним, оскільки будь яке відхилення може впливати на кінцевий результат (маленькі помилки можуть призвести до серйозних наслідків). Результати традиційного аналізу характеризуються великою мінливістю, оскільки цей спосіб оцінки базується на загальному визначенні приблизного процентного значення, після якого майже ніколи не проводиться клітинний аналіз.

Застосовані в даний час у виробничих умовах мікроскопічні методи оцінки рухливості і виживання спермій є суб'єктивними і не завжди корелюють з запліднюючою здатністю сперми, яка прямо пов'язана з точністю комплексної оцінки та в значній мірі залежить від цілісності і стабільності цитоплазматичних мембран. При суб'єктивній оцінці зразка сперми фактично нема можливості зробити щось додатково для покращення точності аналізу. До того ж треба враховувати велику мінливість пов'язану з суб'єктивним фактором.

Розроблено багато методик визначення якісних характеристик для електронної, люмінесцентної, фазовоконтрасної і темнопольної мікроскопії. Необхідність об'єктивного визначення характеристик спермій зумовило створення різних методичних підходів і обладнання, які дозволяють визначати їх сумарну рухливість, та концентрацію, кількість активно рухомих і середню швидкість спермій. Серед них пріоритетно-досліджувальне значення мають комп'ютерні системи аналізу фертильності сперми [4, 5].

У класичному аналізі сперми для визначення якості еякуляту застосовують макроскопічний, мікроскопічний та по потребі фізико-хімічний метод.

Макроскопічний метод включає визначення об'єму, зовнішнього вигляду, запаху, наявності механічних домішок. Мікроскопічним методом визначають концентрацію, рухливість, аглютинацію, наявність інших клітин, морфологію.

Хіміко-фізичний метод вимагає визначення рН та осмолярності.

Усі ці критерії важливі для оцінки того, чи можна використовувати даний еякулят для заморожування та осіменіння. Проведення детального аналізу морфології сперми можливе лише при застосуванні фазовоконтрастного мікроскопа при 1000-кратному збільшенні з масляною імерсією. Ці дослідження вимагають затрат часу і досвіду спеціалістів. На сьогоднішній день пропонуються нові можливості визначення морфології спермій.

В останні роки з появою нових технологій особливо великого значення набуває мікроскопічне дослідження клітин сперми комп'ютеризованою системою під назвою CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Ця система має об'єктивну і оптимальну за часом можливість визначення якості сперми.

Поряд з визначенням рухливості і концентрації, як критерій оцінки для визначення здатності еякуляту до запліднення, застосовується перш за все морфологія клітин, оскільки рухливі спермії можуть бути морфологічно аномальними і не можуть запліднювати яйцеклітину [6, 7].

Морфологічні порушення клітин сперми можуть бути у верхній частині головки (цілісність акросоми), у головці або шийці. Як і до рухливості, так і до морфології спермій застосовано мінімальні вимоги, яким повинен відповідати еякулят з метою його використання (табл. 1).

Таблиця 1

Мінімальні вимоги до сперми

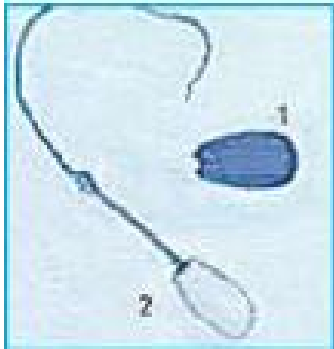
Морфологічні порушення спермій	%
Морфологічно аномальні спермії	≤ 25
Спермії із зміною головки	≤ 5
Спермії із зміною акросоми	≤ 10
Спермії із плазматичною краплею	≤ 15
Спермії із закрученими хвостами	≤ 15

Підвищення відсотка даних морфологічних порушень спермій вказують на зниження здатності сперми до запліднення.

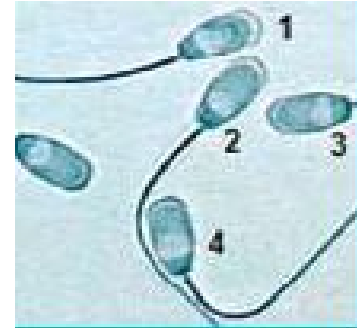
З допомогою системи CASA — Sperm Vision можна проводити морфологічну оцінку вже під час дослідження рухливості спермій. Ця система дозволяє визначати патологію хвоста спермія, ідентифікувати протоплазматичні краплі, морфологічно аномальні спермії. Проксимальні і дистальні краплі цитоплазми та петлі хвостів можуть бути визначені автоматично.

Дослідження морфології спермій проходить під час визначення рухливості і в кінцевому результаті дані поступають у розрахунок якості еякуляту. Це дозволяє значно зекономити час і покращити якість вироблених спермодоз. Дані аналізу можна архівувати і проводити ретроспективний моніторинг тварин.

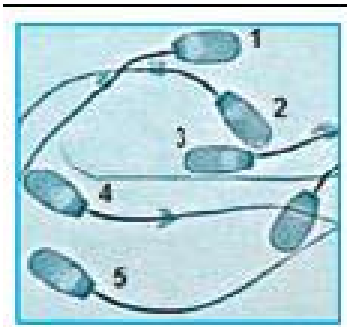
Приводимо приклади спермій з морфологічними порушеннями (рис. 1):



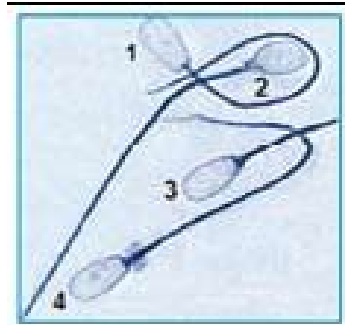
1 — відокремлена головка спермія — позначений як мертвий; 2 — нормальний спермії з дистальною цитоплазматичною каплею.



1–4 — спермії з аномальними (набряклими) акросомами



1–4 — спермії з дистальними цитоплазматичними краплями; 5 — нормальний спермії



1 — петлеподібний спермії; 2 — спермії із зміною головки; 3 — нормальний спермії; 4 — спермії з проксимальною цитоплазматичною краплею

Рис. 1. Морфологічні порушення сперміїв

Модуль Sperm Vision забезпечений функцією, яка значно полегшить повний аналіз морфології і зберігає в пам'яті результати. Для коректного проведення повного аналізу треба підрахувати в сукупності 100 клітин і визначити відсоток аномальних сперміїв. Sperm Vision зберігає в пам'яті всі фотографії сперміїв і таким чином оцінку сперми можна проводити у різні проміжки часу.

Програма Sperm Vision проводить графічне зображення результатів аналізу за допомогою кольорового зображення траєкторій руху клітин (рис. 2).

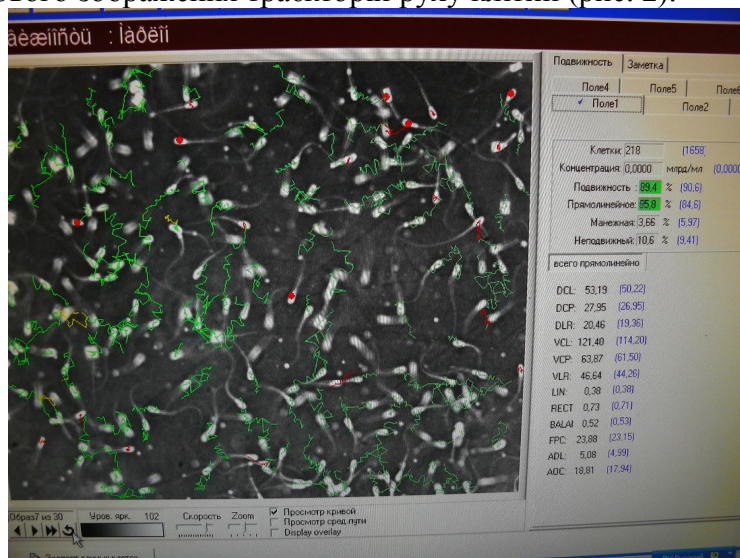


Рис. 2. Оцінка сперми бугаїв-плідників програмою Sperm Vision: червоний колір — нерухливі клітини; зелений колір — прогресивно рухливі клітини; синій колір — локально рухливі клітини; жовтий колір — гіперактивні клітини

Класифікація статевих клітин проводиться програмою Sperm Vision за наступними параметрами.

Нерухливі. Середня зміна напрямку менше ніж 5° . Це означає, що ступінь зміни напрямку головки спермія із 30 проаналізованих фотознімків становить менше 5° , незалежно від довжини пройденого шляху. Це дозволяє програмі розрізнити рухливі і нерухливі клітини, а також живі локально рухливі спермії (без прогресивного руху вперед) і повністю нерухливі.

Локально рухливі. Пройдений лінійний шлях становить менше 4,5 мікрометрів. Це означає, що головки оцінених сперміїв пройшли лінійний шлях менше ніж 4,5 мікрометрів.

З прогресивним прямолінійно поступальним рухом вперед. Середня зміна напрямку менше або дорівнює 5° і пройдений лінійний шлях становить менше або дорівнює 4,5 мікрометрів. Це означає, що кожен спермій, який не відноситься до нерухливих або локально рухливих клітин, класифікується як спермій, який здійснює прогресивний рух вперед.

Гіперактивні. Швидкість спермія при криволінійному русі більше, ніж 80 мкм/с. Лінійність менша ніж 0,65 і амплітуда бокового відхилення головки вища, ніж 6,5 мікрометрів. Гіперактивні клітини не рухаються лінійно, мають різну амплітуду відхилення і розвивають швидкість вищу за 80 мкм/с. Щоб класифікувати клітину як гіперактивну, її швидкість при криволінійному русі повинна бути вищою, ніж 80 мкм/с, і відхилення від лінійного шляху більшим ніж 35 % і відхилення головки на аналізуючи зразках більшим ніж 6,5 мікрометрів (1,5 від середньої ширини спермія).

Лінійні. Прямолінійність руху більше 0,5, відхилення від прямої більше 0,35. Це означає, що для класифікації клітини як лінійної необхідно, щоб траєкторія криволінійного руху не відхилялася від ефективного шляху більше, ніж на 50 і 35 % від лінійного шляху.

Нелінійні. Прямолінійність руху менше 0,5, відхилення від прямої менше 0,35. Це означає, що для класифікації клітини як нелінійної необхідно, щоб траєкторія пройденого клітиною криволінійного руху повинна відхилитися від ефективного шляху більше, ніж на 50 і на 35 % від прямої траєкторії шляху.

Криволінійні (кругові рухи). Середня віддаленість, розділена радіусом ≥ 3 і відхилення від прямої $< 0,5$. Це означає, що для віднесення клітини до такої, яка рухається по колу, радіус траєкторії пройденого нею шляху повинен становити мінімум 3 і траєкторія руху клітини повинна відхилитися більше, чим на 50 % від прямої траєкторії руху.

Критерії руху сперми

Програма Sperm Vision дає можливість проводити вимірювання наступних параметрів руху сперми:

- ЗА — загальна активність (%);
- ППР — прямолінійно поступальний рух (%);
- DCL — пройдена відстань криволінійного руху (мікрометрів);
- DAP — пройдена відстань по середній траєкторії руху (мікрометрів);
- DSL — пройдена відстань прямолінійного руху (мікрометрів);
- VCL — швидкість при криволінійному русі (мкм/с);
- VAP — швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху (мкм/с);
- VSL — швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (мкм/с);
- LIN — ступінь лінійності (VSL/VCL — %);
- STR — ступінь прямолінійності руху сперміїв (VSL /VAP — %);
- WOB — ступінь відхилення (VAP/VCL — %);
- BCF — частота коливального руху;

ALH — середнє бокове відхилення головки, амплітуда латерального зсуву головки спермія від середньої траєкторії руху (мікрометрів);

AOC — середня зміна напрямлення руху

R — радіус траєкторії руху.

Проведені дослідження сперми бугаїв-плідників на технологічному обладнанні німецької фірми Minitub, яке комплектоване комп'ютеризованою програмою Sperm Vision. Дослідження динамічних характеристик сперми кожного з плідників проводили за шістьма зразками (табл. 2).

Порівнюючи показники пройденої відстані за середньою траєкторією руху сперміїв (DAP) бугаїв-плідників, слід відзначити, що мінімальне значення складало 25,28 мікрометра, максимальне значення за цим показником — 35,51 мікрометра. Результати дослідження пройденої відстані сперміїв по прямій (DSL) засвідчили, що середнє значення цієї динамічної характеристики сперми у досліджуваних групах склало 22,69 мікрометра.

Характеризуючи такий динамічний показник як швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL), варто зазначити, що даний показник коливався від 45 до 60 мкм/с. Слід зазначити, що найнижчий показник виявляли у зразках з високим показником прямолінійно поступального руху.

При дослідженні такого показника як амплітуда латерального зсуву головки спермія від середньої траєкторії його руху (середнє відхилення головки) та частоти коливальних рухів сперміїв не було виявлено вірогідної різниці між показниками.

Ці показники дозволяють значно швидше провести аналіз еякуляту і покращити якість виготовлених спермодоз.

Висновки

1. Комп'ютеризована система CASA дозволяє миттєво фіксувати і аналізувати зразок сперми, за кілька секунд отримувати інформацію про концентрацію і активність сперміїв, автоматично проводити розрахунок об'єму розріджувача.

2. Лише вірогідне значення всіх аспектів якості дозволяє розрахувати точну кількість спермодоз, які можна отримати з одного еякуляту. Це не тільки відповідає прогресу тваринництва, але й докорінно впливає на рентабельність тваринницької продукції.

Перспективи подальших досліджень. Використання комп'ютеризованої системи CASA дозволить миттєво фіксувати і аналізувати зразки еякуляту та вивчати морфологію і кінетику сперміїв для оцінки якості сперми.

I. Yaremchuk, M. Sharan

MODERN OPPORTUNITIES OF SPERM QUALITY ANALYSIS AND SPERM DOSE CALCULATION

S u m m a r y

The information on microscopic examination of sperm cells with computerized system called CASA (Computer Assisted Semen Analysis) is given. The system carries out an automatic determination of motility and concentration of ejaculate, by objective determination of sperm quality. Determinates the required volume of sperm diluent and the number of sperm doses from given ejaculate.

И. М. Яремчук, М. Н. Шаран

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ И РАСЧЕТА СПЕРМОДОЗ

А н н о т а ц и я

Представлена информация о микроскопическом исследовании клеток спермы компьютеризированной системой под названием CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Система производит автоматическое определение подвижности и концентрации эякулята, имеет объективную и оптимальную по времени возможность определения качества спермы. Определяет необходимое количество разбавителя и количество спермодоз, которые можно получить из одного эякулята.

1. *Давиденко В. М.* Влияние технологической обработки спермы на состояние акросомного комплекса у спермиев баранов и быков / В. М. Давиденко, Н. П. Чунсина // НТБ УНИИЖ «Аскания Нова». — Херсон, 1980. — Вып. 1. — С. 52.

2. *Давиденко В. М.* Якісні показники сперми плідників різних порід у залежності від режиму заморожування : зб. «Розведення і штучне осіменіння великої рогатої худоби» / В. М. Давиденко, Н. П. Чунсина. — К. : Урожай, 1981. — Вип. 13. — С. 62–65.

3. *Осташко Ф. И.* Биотехнология воспроизводства крупного рогатого скота / Ф. И. Осташко. — К. : Аграрна наука, 1995. — 184 с.

4. *Боровиков В.* STATISTICA : Искусство анализа данных на компьютере / В. Боровиков. — СПб. : Питер, 2001. — 656 с.

5. Руководство по применению компьютерной цифровой технологии обработки снимков для быстрого и объективного анализа качества семенных клеток. — Германия : Минитюб, 2001. — 81 с.

6. *Aman R. P.* Reflections on CASA after 25 years / R. P. Aman, D. F. Ratz // J. Androl. — 2004. — 25 : 317–325.

7. *Ehlers J.* Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application / J. Ehlers, M. Behr, H. Bollwein et al. // Theriogenology. — 2011. — 76 : 488–454.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Остапів Д. Д.