

Розділ 3

АКУШЕРСТВО, ГІНЕКОЛОГІЯ І

БІОТЕХНОЛОГІЯ РОЗМНОЖЕННЯ ТВАРИН

УДК 612.616:636.082.4.09

ІННОВАЦІЙНІ МЕТОДИ І АВТОМАТИЗОВАНО-ТЕХНІЧНІ ЗАСОБИ ОЦІНКИ ЯКОСТІ СПЕРМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ У ВЕТЕРИНАРНІЙ РЕПРОДУКТОЛОГІЇ

Кошевой В.І., студент

Науменко С.В., к. вет. н., доцент¹

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Анотація. Описані особливості використання та перспективи впровадження інформаційно-технічних приладів та комп'ютерних програм (систем) для оцінки якості сперми (запліднюючої здатності сперміїв), переваги їх використання перед загальноживаними методами. Доведені та обґрунтовані зручність, швидкість і точність у визначенні основних параметрів сперми з доповненням використовуючи інноваційні методики, зокрема критерії Крюгера, що значно розширило дані про стан відтворювальної здатності плідників, особливості їх сперматогенезу та можливість використання цих критеріїв для вирішення проблеми невідповідності оцінки якості сперми та рівня її фертильності.

Ключові слова: сперма, спермії, сперматогенез, спермограма, оцінка, якість, мобільний спермоскоп, комп'ютерні системи, критерії Крюгера.

Актуальність проблеми. Сперма на сучасному етапі розвитку науки є актуальним об'єктом досліджень, що має широке значення як для біології, біотехнології, так і для еволюції життя щодо передачі інформації від покоління до покоління, забезпечення вічності життя [1].

Загальновідомо, що оцінка сперми за одним конкретним критерієм є недостатньою, а бажано визначити якомога більше показників, оскільки, сперма є складною, інтегрованою і динамічною біологічною системою. Розрідження сперми, незначна її доза для штучного осіменіння призводить до того, що у статеві шляхи самки потрапляє невелика кількість сперміїв. Це підвищує вимоги до якості спермо дози, яка у кінцевому результаті визначає ступінь запліднення. Крім того, дуже важливим є прогнозування запліднюючої здатності, яка повинна бути основним критерієм при остаточному вирішенні про подальше використання кожного конкретного еякуляту [2, 3].

Головними вимогами для сперміїв є їх рухливість та здатність до запліднення яйцеклітини, а для цього необхідне визначення мітохондріальної активності (або ж наявності мітохондріальної недостатності) та стану генетичного коду (фрагментації ДНК). Особливу увагу зараз приділяють дії патогенів різного походження на сперматогенез в конкретних позиціях формування та розвитку сперміїв.

У гуманній медицині в останні роки широко розповсюджене дослідження сперми за критеріями Крюгера та спермограми за нормативами ВООЗ. У ветеринарній репродуктології застосуванням цих критеріїв бажано було б доповнити існуючі стандарти новими інформативними даними.

Зараз у виробничих умовах застосовуються мікроскопічні методи оцінки рухливості і виживання сперміїв, які 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.

¹ Науковий консультант – Кошевой В.П., докт. біол. наук, професор

На сьогодні дуже мало інформації про вплив патологій сперматогенезу на стан та запліднюючу здатність сперміїв. Необхідність об'єктивної оцінки стану сперміїв зумовила створення різних методичних підходів і обладнання, які дозволяють визначати їх сумарну рухливість та концентрацію, кількість активно рухомих і середню швидкість сперміїв. Серед них велике значення мають комп'ютерні програми (системи) аналізу фертильності сперми [4,5].

Завдання дослідження: дати порівняльну оцінку інноваційних та традиційних загальноприйнятих методів оцінки якості сперми з використанням інформаційно-технічних приладів та зробити висновок про ефективність, переваги і перспективи використання згаданих способів у практиці ветеринарної репродуктології.

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом для дослідження слугувала сперма плідників: бугаїв (n=5), кнурів (n=12), баранів (n=3), коней (n=4), кролів (n=12) та псів (n=16), що належали НПЦ Харківської ДЗВА, господарствам Харківської, Полтавської, Дніпропетровської та Херсонської областей, приватним особам. Використовували різні методи отримання сперми.

Дослідження сперми проводили у два етапи:

- первинне – використовуючи загальноприйняті методики визначення макро- (запах, колір, консистенція, об'єм еякуляту) та мікроскопічних (рухливість, концентрація, кількість сперміїв з морфологічними аномаліями) параметрів;

- вторинне – інноваційні методи з використанням інформаційно-технічних приладів – мобільний спермоскоп та диференційні комп'ютерні програми.

Результати дослідження. Мобільний спермоскоп – екранно-дистанційний прилад для оцінки якості сперми. Має вигляд шафи-столика з компактно вмонтованими складовими. Він – мобільний, тобто легко транспортується, або стаціонарний, досить простий та зручний у користуванні; відеосигнал на екрані має високу якість зображення, що дає змогу об'єктивно колегіально визначати якість сперми. Істотною перевагою даного приладу є можливість передачі відеосигналу на значній відстані. При виникненні суперечливих ситуацій – інформація може бути передана третім особам.

В практиці ветеринарної репродуктології розповсюджене значне вибраковування еякулятів, що не відповідають стандартам.

При первинному дослідженні були виявлені різні за якістю зразки сперми, серед них і ті, що частково або повністю не відповідають існуючим стандартам та повинні вибраковуватися.

За статистичними даними якість еякуляту та запліднююча здатність сперміїв не завжди прямо корелюють. Для вирішення цієї проблеми у гуманній медицині були розроблені методи з визначенням критеріїв Крюгера (Крюгера-Тайгенберга), мітохондріальної недостатності, змін генетичного коду. Саме вони дають можливість зробити висновок стосовно етіології зниження запліднюючої здатності (фертильності) сперміїв. Згадані показники можуть бути діагностичним тестом при визначенні патологій спермато- та андрогенезу.

Нормальні показники спермограми з морфологією за Крюгером відповідають таким нормативам:

- У зрілих сперміїв головка правильної овальної форми, акросома виділена, хвіст і шийка мають чіткі і правильні форми.

- Акросома має просвітлення, займає приблизно 50-70% від загальної площі головки.

- У деяких сперміїв спостерігається закруглення головки в частині акросоми, яка відмінно забарвлюється за допомогою азур-еозинів.

- Біля головки може визначатися (в ряді випадків) рудиментарна плазматична мембрана, яку видно в електронному мікроскопі.

- Головка спермія (має видові розбіжності) повинна мати довжину в 4-5,5 мкм, а ширина її повинна становити 2,5-3,5 мкм. Шийка не повинна мати патологій, її ширина мала, становить всього до 1 мкм, що являє собою 1,5 розмірів від довжини самої головки. У мембрані добре видно плазматичні краплі, розмір їх не повинен перевищувати 1/3 від розміру самої мембрани.

- Хвіст у спермія рівний, він не закручується, має однакову товщину по всій своїй довжині. У середній частині допускається невелике звуження. Нормальні спермії мають співвідношення довжини хвоста по відношенню до головки 1:9 або 1:10.

Проте провідне місце при дослідженні сперми займає виявлення сперміїв з відхиленнями (ушкодженнями, аномаліями).

Патологія голівки може бути різною – це зміни форми і розмірів, вона може бути грушоподібною, круглою, аморфною, маленькою або великою, конічною. В хроматині спостерігаються вакуолі, яких при нормі немає. Акросомальна область займає всього до 40%.

Якщо спермії мають патології розвитку (сперматогенезу) виявляються множинні головки, акросоми мають несиметричне, нехарактерне розташування, хроматин також розташований неправильно, він може мати кубічну форму або форму ядра.

Дефекти притаманні середній частині, шийці спермія варіабельні:

- наявність скрученої шийки;
- аномальне прикріплення середньої частини, значна асиметричність;
- витончення середньої частини;
- наявність потовщень в області середньої частини.

Серед патологій хвоста спермійв найчастіше виявляють:

- скручений хвіст;
- наявність зламаного хвоста;
- занадто короткий хвіст у спермія;
- наявність цитоплазматичної краплі, яка займає приблизно 1/3 від розміру голівки.

Критерії Крюгера, норми спермограми за даними ВООЗ стали засадами при розробці різних комп'ютерних програм (систем) оцінки якості сперми. Їх впровадження у ветеринарній репродуктології відкриває широкі перспективи перед практикою для більш швидкого і ефективного відтворення тварин та наукою, зокрема для з'ясування причин неплідності самок, зниження відтворної здатності самців і пошуку методів їх усунення та профілактики.

Комп'ютерні програми (системи) доступні для користувача в Україні широко представлені як вітчизняними (аналізатор основних показників фертильності сперми SFA-500, виробництва НВФ «Біола»), так і зарубіжними виробниками (мікровідеографічний комплекс для аналізу чоловічих гамет, виробництва компанії «Microptic» (Іспанія), аналізатор зображень (токсичності) AT-05 та програмне забезпечення для автоматизації отримання спермограм MMC Sperm, тощо). Має тенденцію до пошширення у практиці ветеринарної медицини і науковій сфері є програма Sperm Vision (CASA).

Для вторинного (поглибленого) дослідження сперми нами розроблена диференційна комп'ютерна програма, в алгоритмі якої закладені як основні параметри оцінки якості сперми (макро- і мікроскопічні), так і інноваційні методики (морфологія за критеріями Крюгера, визначення мітохондріальної недостатності та стану генетичного коду).

У досліджуваних зразках була виявлена певна кількість круглих (незрілих) клітин (від 0,93% у бугаїв до 8,46% у псів), клітин з морфологічними аномаліями та ушкоджених (близько 6,84-9,71%). Також відмічались порушення дисперсії хроматину і, як наслідок, ушкодження структури ДНК (у близько 5% спермійв).

Висновком такого дослідження є прогнозування потенціалу запліднюючої здатності: при сумі балів 50-80 – низький потенціал, при 81-100 – високий.

Узагальнюючи отриману інформацію та аналізуючи статистичні показники можна зробити висновок, що невідповідність оцінки якості спермопродукції рівню запліднюючої здатності сперми при осіменінні виникає саме через суб'єктивність отриманих даних дослідником та про необхідність застосування інформаційно-технічних приладів та комп'ютерних програм (систем).

Висновки

Інформаційно-технічні прилади та комп'ютерні програми (системи) для оцінки якості сперми, виведення та аналізу спермограм є високоефективними і зручними для використання і заслуговують на широке впровадження у практичну ветеринарну репродуктологію. Досліднику швидко і точно вдається отримати об'єктивні дані про потенціал запліднюючої здатності спермійв і стан відтворювальної здатності плідника.

Література

1. 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. Чунсіна. – К.: Урожай, 1981. – Вип. 13. – С. 62-65.
2. Кошевой В.П. Проблеми відтворення овець і кіз та шляхи їх вирішення: монографія / В.П. Кошевой, П.М. Складов, С.В. Науменко; за заг. ред. В.П. Кошевого. – Х.-Д.: Гамалія, 2011. – С. 9-135
3. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизводства крупного рогатого скота / Ф.И. Осташко. – К.: Аграрна наука, 1995. – 184 с.
4. Руководство по применению компьютерной цифровой технологии обработки снимков для быстрого и объективного анализа качества семенных клеток. – Германия: Минитюб, 2001. – 81 с.
5. Ehlers J. Standartization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application / J. Ehlers, M. Behr, H. Bollwein et al. // Theriogenology. – 2011. – №76. – P. 454-488.

**ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ И АВТОМАТИЗИРОВАННО-ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА ОЦЕНКИ
КАЧЕСТВА СПЕРМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРНОЙ
РЕПРОДУКТОЛОГИИ**

Кошевой В.И., студент, Науменко С.В., канд. вет. наук, доцент

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Аннотация. Описаны особенности использования и перспективы внедрения информационно-технических средств и компьютерных программ (систем) для оценки качества спермы (оплодотворяющей способности спермиев), преимущества их использования перед общеупотребительными методами. Доказаны и обоснованы удобство, скорость и точность в определении основных параметров качества спермы с дополнением, используя инновационные методики, в частности критерии Крюгера, что значительно расширило данные о состоянии воспроизводительной способности производителей, особенности их сперматогенеза и возможности использования этих критериев для решения проблемы несоответствия оценки качества спермы и уровня ее фертильности.

Ключевые слова: сперма, спермии, сперматогенез, спермограмма, оценка, качество, мобильный микроскоп, компьютерные системы, критерии Крюгера.

**INNOVATIVE METHODS AND AUTOMATED-TECHNICAL FACILITIES OF ESTIMATION QUALITY OF
SPERM AND PROSPECT OF THEIR USE ARE IN VETERINARY REPRODUCTOLOGY**

V. Koshevoy, S. Naumenko

Kharkiv State Zooveterinary Academy, c. Kharkiv

Summary. The features of the use and prospect of introduction of informatively-technical facilities and computer programs (systems) for the estimation of quality of sperm (to impregnating ability of sperm cells), advantages of their use before current methods are described. A comfort, speed and exactness, is well-proven and reasonable in determination of basic parameters of quality of sperm with addition, using innovative methodologies, in particular criteria of Kruger, that extended data about the state of reproductive ability of producers, features of their spermatogenesis and possibility of the use of these criteria for the decision of problem of disparity of estimation of quality of sperm and level of her fecundity considerably. Main requirements for sperm cells are their mobility and capacity for the impregnation of ovule, and for this purpose necessary determination of mitochondrial activity (or presence of mitochondrial insufficiency) and state of genetic code (fragmentations of DNA). The special attention is now spared by operating of pathogens of different origin on spermatogenesis in concrete positions of forming and development of sperm cells. In humane medicine in recent year widespread research of sperm on the criteria of Kruger and spermograms after the norms of WOHP. In veterinary reproductology it was desirable to complement existent standards application of these criteria by new informing data. At primary research the different in quality standards of sperm were reduced, among them and those, that partly or fully does not answer existent standards and must be deleted. From statistical data quality of sperm and impregnating ability of sperm cells not always correlate straight. For the decision of this problem in humane medicine there were the worked out methods with determination of criteria of Kruger, mitochondrial insufficiency, changes of genetic code. Exactly they give an opportunity to draw conclusion in relation to etiology of decline of impregnating ability (to fecundity) of sperm cells. The mentioned indexes can be a diagnostic test at determination of pathologies of spermatogenesis and androgenesis. For secondary (deep) research of sperm we are working out the differential computer program, in the algorithm of that stopped up both basic parameters estimations internal sperm (macro- and microscopic) and innovative methodologies (morphology on the criteria of Kruger, determination of mitochondrial insufficiency and state of genetic code). In the investigated standards the determined amount of round (immature) sperm (from 0,93% for bulls to 8,46% for dogs), sperm was reduced with morphological anomalies and damaged (about 6,84-9,71%). Violations of dispersion of chromoplasm and, as a result, damage of structure of DNA (in about 5% sperm cells) were also marked. The conclusion of such research is prognostication of potential of impregnating ability: at the sum of points 50-80 – is subzero potential, at 81-100 – high.

Key words: sperm, sperm cells, spermatogenesis, spermograms, estimation, quality, mobile microscope, computer systems, criteria of Kruger.