

УДК: 611.013.11:619

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.1.350

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ СПЕРМАТОЗОИДОВ БАРАНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА SPERM BLUE И ОКРАШИВАНИЯ ПО РОМАНОВСКОМУ-ГИМЗЕ

Корочкина Е.А.* – д. ветеринар. наук, доц. кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID 0000-0002-7011-4594); Финагеев Е.Ю. – канд. ветеринар. наук, асс. кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий; Главацкая Д.Е. – студ.; Пушкина В. С. – студ.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

*e.kora@mail.ru

Ключевые слова: сперматозоиды барана, морфологическая оценка, набор Sperm Blue, окрашивание по Романовскому-Гимзе

Key words: ram spermatozoa, morphological assessment, Sperm Blue kit, Romanovsky-Giemsa staining

Финансирование: «Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00157, <https://rscf.ru/project/23-26-00157/>

Поступила: 15.02.2024

Принята к публикации: 25.03.2024

Опубликована онлайн: 02.04.2024



РЕФЕРАТ. Целью настоящего исследования являются апробация и сравнительная оценка методов морфологического исследования сперматозоидов баранов с использованием набора дифференцированного окрашивания Sperm Blue и окрашивания по Романовскому-Гимзе. Было проведено взятие и исследование спермы баранов породы Дорпер. Для проведения морфологической оценки сперматозоидов, полученные образцы (n=10) разводили в соотношении 1:100 (фосфатным буферным солевым раствором PBS). Для морфологической оценки сперматозоидов использовали два метода: набор дифференцированного окрашивания Sperm Blue (Microptic, экспозиция мазка в фиксаторе - 10 минут, в основном красителе - 18 минут) и окрашивание по Романовскому-Гимзе (экспозиция мазка в фиксаторе - 10 минут, в основном красителе - 20 минут). После рутинного окрашивания промывали мазки дистиллированной водой, высушивали и проводили микроскопию (увеличение с использованием объектива 100x10, иммерсионное масло) с последующим ручным методом подсчета количества морфологических форм сперматозоидов (200 сперматозоидов в каждом образце). Согласно результатам сравнительного анализа окрашенных мазков, окрашивание красителем Sperm Blue позволяет провести детальное морфологическое исследование и определить тератозооспермические характеристики сперматозоидов. При окрашивании по Романовскому-Гимзе нормальные сперматозоиды были четко видны, вместе с тем плохо визуализировалась акросома. Стоит отметить, что подсчет процента нормальных сперматозоидов вручную с использованием обоих красителей привел к одинаковому десятичному результату. Была обнаружена статистически незначимая разница в дефектах головки и хвоста между использованными красителями

($p = 0,41$ и $p = 0,77$ соответственно): при окрашивании по Романовскому-Гимзе (7,8% и 34,1%) были обнаружены данные дефекты чаще, чем Sperm Blue (6,3% и 32,9%). Учитывая полученные результаты, актуальным является использование красителя Sperm Blue в ветеринарной андрологии, в частности для оценки морфологии сперматозоидов разных видов животных с дальнейшей разработкой соответствующих протоколов в аспекте длительности экспозиции самих мазков в основном красителе.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Многочисленными исследованиями доказано, что показателем воспроизводства является фертильность как самок, так и самцов-производителей [3,5]. Оплодотворяющая способность сперматозоидов – явление многофакторное, морфологическая структура в котором занимает ключевую позицию. Так, Chenoweth P. J. (2005). в своей работе отмечает, что акросомальные дефекты, дефекты головок и дефекты хвостов сперматозоидов способствуют безрезультативному оплодотворению [6]. Кроме того, исследованиями Peña Martínez A. I. (2004). Доказана взаимосвязь низкого содержания цитоплазматических капель в хвостах сперматозоидов и ухудшения плодовитости самцов [9]. В ветеринарной практике наиболее часто используемым инструментом анализа подвижности и морфологии сперматозоидов является ручная оценка [8]. Этот классический подход требует времени и ограничен опытом практикующего специалиста. На сегодняшний день основными универсальными красителями, имеющими широкое распространение в ветеринарной андрологии, являются набор быстрого дифференцированного окрашивания Diff-Quick [4,7], а также окрашивание по Романовскому-Гимзе [1]. В медицине также достаточно широко используется набор дифференцированного окрашивания сперматозоидов Sperm Blue [10]. В связи с этим, целью настоящего исследования является апробация и сравнительная оценка методов морфологического исследования сперматозоидов баранов с использованием набора дифференцированного окрашивания Sperm Blue и окрашивания по Романовскому-Гимзе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследование было проведено в научно-образовательной лаборатории по

трансплантации эмбрионов животных на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины». Было проведено взятие и исследование спермы баранов породы Дорпер. Отбор проб был произведен с помощью искусственной вагины модели IMV (Франция) согласно ГОСТ32222–2013 [2]. Для проведения морфологической оценки сперматозоидов, полученные образцы ($n=10$) разводили в соотношении 1:100 (фосфатным буферным солевым раствором PBS). Изготовление мазка проводили по стандартной методике [1]. Мазки, окрашенные красителями Sperm Blue (Microptic) и по Романовскому-Гимзе отражены на рисунке 1.

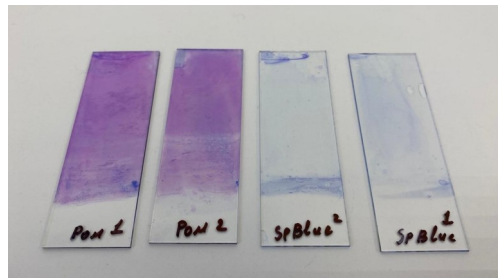


Рисунок 1 – Окрашенные мазки (красители Sperm Blue (Microptic)) и по Романовскому-Гимзе).

Для морфологической оценки сперматозоидов использовали два метода: набор дифференцированного окрашивания Sperm Blue и окрашивание по Романовскому-Гимзе. Краситель Sperm Blue (Microptic) разработан для дифференцированного окрашивания всех компонентов сперматозоида (акросомы, головки, шейки и хвоста) в разные интенсивности синего цвета. Набор включает: 1 – фиксатор; 2 – основной краситель (Sperm Blue); экспозиция мазка в фиксаторе составляет 10 минут, в основном красителе – 18 ми-

нут. При окрашивании по Романовскому-Гимзе проводили фиксацию мазков с дальнейшим погружением в краситель азур-эозин (ТУ 9398-003-29508133-2011) в течение 20 минут. После рутинного окрашивания промывали мазки дистиллированной водой, высушивали и проводили микроскопию (увеличение с использованием объектива 100x10, иммерсионное масло) с последующим ручным методом подсчета количества морфологических форм сперматозоидов (200 сперматозоидов в каждом образце).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

При проведении исследований, оба красителя были успешно применены для ручного анализа морфологии сперматозоидов баранов.

Визуализация полученных мазков показана на рисунке 2 и 3.

Результаты сравнительной морфологической оценки сперматозоидов отражены на рисунках 4 и 5.

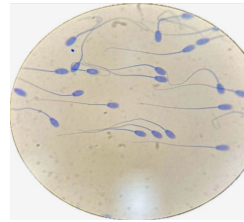


Рисунок 2 – Окрашивание красителем Sperm Blue.



Рисунок 3 – Окрашивание по Романовскому-Гимзе.

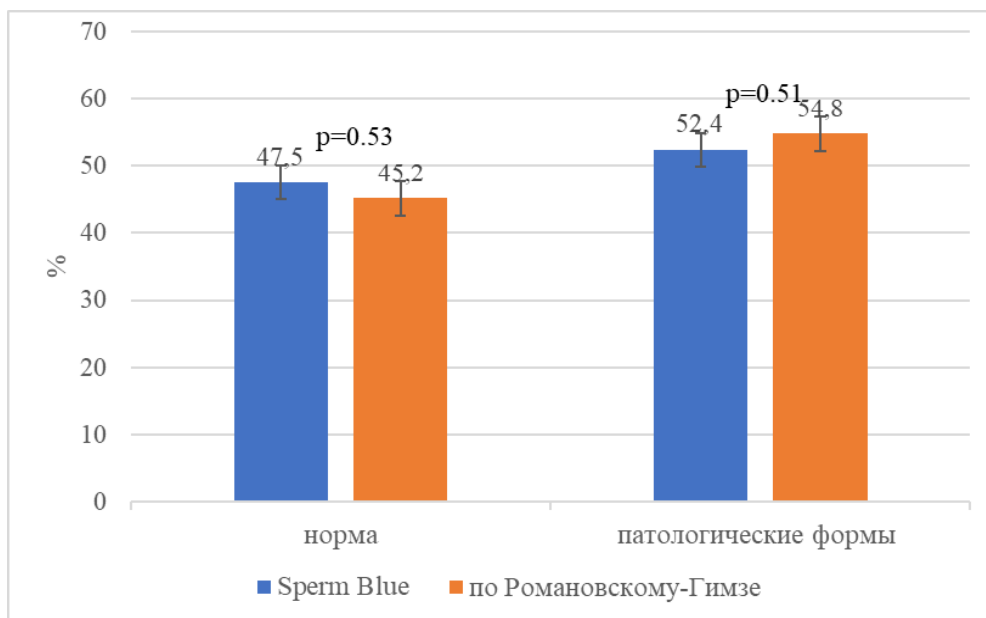


Рисунок 4 – Результаты сравнительной морфологической оценки сперматозоидов (n=10).

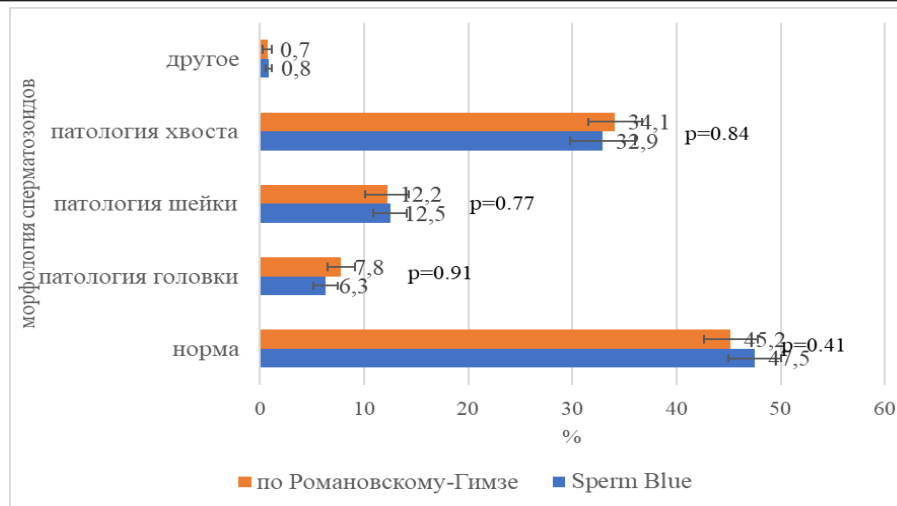


Рисунок 5 – Сравнительная оценка морфологической структуры сперматозоидов баранов (n=10) с использованием красителей Sperm Blue и по Романовскому-Гимзе.

Согласно данным рисунка 4, оба красителя позволяют определить количество морфологически нормальных и патологических форм сперматозоидов. При этом количество нормальных сперматозоидов было больше при анализе мазков, окрашенных красителем Sperm Blue, разница значений не явилась статистически значимой.

Согласно данным рисунка 5, окрашивание красителем Sperm Blue позволяет провести детальное морфологическое исследование и определить тератозооспермические характеристики сперматозоидов. При окрашивании по Романовскому-Гимзе нормальные сперматозоиды были четко видны, вместе с тем плохо визуализировалась акросома. Стоит отметить, что подсчет процента нормальных сперматозоидов вручную с использованием обоих красителей привел к одинаковому десятичному результату. Была обнаружена статистически незначимая разница в дефектах головки и хвоста между использованными красителями ($p = 0,41$ и $p = 0,77$ соответственно): при окрашивании по Романовскому-Гимзе (7,8% и 34,1%) были обнаружены данные дефекты чаще, чем Sperm Blue (6,3% и 32,9%).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, набор дифференцированного окрашивания Sperm Blue позволяет провести морфологическую оценку сперматозоидов баранов с полной дифференцировкой тератозооспермических характеристик. При этом длительность экспозиции мазка в основном красителе, равная 18 минутам (для баранов), позволяет дифференцировать акросому сперматозоидов. Окрашивание мазка по Романовскому-Гимзе позволяет провести рутинный морфологический анализ, без детальной оценки целостности акросомы сперматозоидов. В связи с этим, актуальным является использование красителя Sperm Blue в ветеринарной андрологии, в частности для оценки морфологии сперматозоидов разных видов животных с дальнейшей разработкой соответствующих протоколов в аспекте длительности экспозиции самих мазков в основном красителе.

COMPARISON OF STAINING TECHNIQUES ON THE MANUAL RAM SPERM MORPHOLOGY ANALYSIS BY SPERM BLUE AND ROMANOVSKY-GIMZE

Korochkina E. A.* - PhD. In Veterinary

science, Associate Professor, Department of Genetic and Reproductive Technologies (ORCID 0000-0002-7011-4594); **Finageev E. Y.** – PhD. In Veterinary sciences, Assistant, Department of Genetic and Reproductive Technologies; **Glavatskaya D. E.** – student; **Pushkina V. S.** – student.

St. Petersburg state university of veterinary medicine

*e.kora@mail.ru

Financing: The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation № 23-26-00157, <https://rscf.ru/project/23-26-00157/>

ABSTRACT

The purpose of this study is to test and comparatively evaluate the method of morphological examination of ram sperm using a differentiated staining Sperm Blue and Romanovsky-Giemsa staining. The sperm of Dorper rams was collected and examined. The obtained samples (n=10) were diluted in a ratio of 1:100 (PBS solution) to conduct a morphological assessment of sperm. Two methods were used for the morphological assessment of spermatozoa: a set of differentiated staining Sperm Blue (Microptic, exposure of the smear in the fixative - 10 minutes, in the main dye - 18 minutes) and Romanovsky-Giemsa staining (exposure of the smear in the fixative - 10 minutes, in the main dye - 20 minutes). After routine staining, the smears were washed with distilled water, dried, and microscopy was performed (magnification using a 100x10 immersion objective, oil immersion), followed by a manual method of counting the number of morphological forms of sperm. According to the results of a comparative analysis of stained smears, staining with Sperm Blue allows for a detailed morphological study and differentiation of teratozoospermic characteristics. When stained with Romanovsky-Giemsa, normal spermatozoa were clearly visible, but the acrosome was poorly visualized. Manual calculation of the percentage of normal sperm using both dyes resulted in the same decimal result. A statistically insignifi-

cant difference in head and tail defects was found between the dyes used ($p = 0.41$ and $p = 0.77$, respectively): Romanovsky-Giemsa staining (7.8% and 34.1%) detected these defects more often than Sperm Blue (6.3% and 32.9%). Considering the results obtained, the use of the Sperm Blue dyes in veterinary andrology is relevant, in particular for assessment the morphology of sperm of different animal species with the further development of appropriate protocols in terms of the duration of exposure of the smears themselves to the main dye.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Баженова, Н. Б. Оценка качественных показателей спермы животных: учебно-методическое пособие / Н. Б. Баженова, К. В. Племяшов, Е. А. Корочкина. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – 25 с. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54902245>
2. ГОСТ 32222–2013. Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб. – Введен 2015-01-27. – М.: Стандартинформ, 2018. – 10 с.
3. Корочкина, Е. А. Репродуктивная способность самцов в условиях стресса и методы ее коррекции: Учебно-методическое пособие / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, В. В. Никитин. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство "ЛЕМА", 2023. – 31 с. – ISBN 978-5-00105-861-8.
4. Корочкина, Е. А. Оценка морфологии сперматозоидов баранов с помощью набора быстрого дифференцированного окрашивания Диахим-Дифф-Квик / Е. А. Корочкина, Е. Ю. Финагеев, М. М. Ивановская // Ветеринария. – 2023. – № 7. – С. 38-42. – DOI 10.30896/0042-4846.2023.26.7.38-42. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54146135>
5. Способы подготовки самцов-пробников и использование их в репродуктивной биотехнологии: Учебно-методическое пособие для вузов / К. В. Племяшов, Е. Ю. Финагеев, Е. А. Корочкина [и др.]. – Санкт-Петербург: Изда-

тельство Лань, 2023. – 52 с. – (Высшее образование). – ISBN 978-5-507-46892-8.

6. Chenoweth, P. J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64(3), 457–468. 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.05.005

7. Farias L.B. Comparison of Diff-Quick and Spermac Staining Methods for Sperm Morphology Evaluation / L.B. Farias, da Cunha Barreto-Vianna AR, de Mello MD, Dos Santos AL, da Fonte Ramos C, Fontoura P. J *Reprod Infertil*. 2023 Jul-Sep;24(3):166-170. doi: 10.18502/jri.v24i3.13272. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37663429/>

8. Kolster, K. A. (2018). Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. *Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice*, 48(4), 533–545. 10.1016/j.cvsm.2018.02.003. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29678334/>

9. Peña Martínez, A. I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 209–224. 10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.04.024. Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000788>

10. Van der Horst G. SpermBlue: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis / G. Van der Horst, L. Maree Biotech // *Histochem*. 2009 Dec;84(6):299-308.

REFERENCES

1. Bazhenova, N. B. Assessment of quality indicators of animal sperm: educational manual / N. B. Bazhenova, K. V. Plemyashov, E. A. Korochkina. – St. Petersburg: St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, 2023. – 25 p. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54902245>

2. GOST 32222–2013. Means of reproduction. Sperm. Sampling methods. – Veden January 27, 2015 – M.: Standartinform, 2018. – 10 p.

3. Korochkina, E. A. Reproductive ability of males under stress and methods for its correction: educational manual / E. A. Koroch-

kina, E. Yu. Finageev, V. V. Nikitin. – St. Petersburg: LEMA Publishing House LLC, 2023. – 31 p. – ISBN 978-5-00105-861-8. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54758856>

4. Korochkina, E. A. Assessment of ram sperm morphology using a rapid differential staining kit Dia-Diff-Quick / E. A. Korochkina, E. Yu. Finageev, M. M. Ivanovskaya // *Veterinary Medicine*. – 2023. – No. 7. – P. 38-42. – DOI 10.30896/0042-4846.2023.26.7.38-42. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54146135>

5. Methods for preparing sample males and their use in reproductive biotechnology: Educational and methodological manual for universities / K. V. Plemyashov, E. Yu. Finageev, E. A. Korochkina [etc.]. – St. Petersburg: Lan Publishing House, 2023. – 52 p. - (Higher education). – ISBN 978-5-507-46892-8. – EDN. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=58196592>

6. Chenoweth, P. J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64(3), 457–468. 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.05.005

7. Farias L.B. Comparison of Diff-Quick and Spermac Staining Methods for Sperm Morphology Evaluation / L.B. Farias, da Cunha Barreto-Vianna AR, de Mello MD, Dos Santos AL, da Fonte Ramos C, Fontoura P. J *Reprod Infertil*. 2023 Jul-Sep;24(3):166-170. doi: 10.18502/jri.v24i3.13272.

8. Kolster, K. A. (2018). Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. *Veterinary Clinics of North America—Small Animal Practice*, 48(4), 533–545. 10.1016/j.cvsm.2018.02.003. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29678334/>

9. Peña Martínez, A. I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 209–224. 10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.04.024.

10. Van der Horst G. SpermBlue: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis / G. Van der Horst, L. Maree Biotech // *Histochem*. 2009 Dec;84(6):299-308.