

Борис Викторович Гаврилов<sup>1✉</sup>, Иван Владимирович Коваль<sup>2</sup>,  
Максим Витальевич Богатырь<sup>3</sup>, Анастасия Александровна Целикова<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия

<sup>1</sup>gawrilovboris@yandex.ru

<sup>2</sup>iv.koval1@yandex.ru

<sup>3</sup>maximbogaty1@gmail.com

<sup>4</sup>anastasiatcelikova1@gmail.com

## ПРИМЕНЕНИЕ СЕКСИРОВАННОЙ СПЕРМЫ В МОЛОЧНОМ СКОТОВОДСТВЕ

*Состояние и уровень воспроизводства, в том числе и крупного рогатого скота, в современных изменяющихся условиях указывает на необходимость пересмотра основных направлений в работе по искусственному осеменению. Возникшие проблемы из-за снижения интеграции зарубежных технологий в наше животноводство, искусственного ограничения доступа к инновационным технологиям диктуют необходимость к внимательной оценке имеющихся проблем, поиску возможностей их решения. Необходимо восстановление и создание собственной производственной базы с внедрением имеющихся наработок, освоением зарубежного опыта в сфере искусственного осеменения для получения потомства с определенным заданным полом. В решении встающих проблем необходим комплексный подход. Это не только обеспечение полноценным кормлением, моционом выращиваемых телок с подведением их к анатомо-физиологическим параметрам для осеменения в 13–14 месяцев, но и разработка более совершенной – ускоренной технологии разделения X- и Y-сперматозоидов с минимальным отрицательным воздействием, снижающим показатели качества. Важно понимание свойств получаемой различными технологическими способами сексированной спермы, также возникает необходимость в методиках ее оценки на разных этапах в процессе разделения и эффективности осеменения с учетом влияния различных внешних производственных негативных факторов при использовании. Рассмотрены возможные методики оценки и разделения жизнеспособных спермиев от непригодных к использованию, до подготовки и после проведения разделения. Отражены возможные направления развития технологии с учетом имеющихся научных отечественных и зарубежных разработок. Приведена доступная информация по технологическим этапам уже применяемого процесса сексирования спермы сельскохозяйственных животных и ее производственной оценки. Выделены особенности использования такой спермы для получения высокой оплодотворяемости животных в условиях промышленного животноводства.*

**Ключевые слова:** воспроизводство, инновационные технологии, сексированная сперма, искусственное осеменение

**Для цитирования:** Применение сексированной спермы в молочном скотоводстве / Б.В. Гаврилов [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2023. № 10. С. 187–193. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-10-187-193.

Boris Viktorovich Gavrilov<sup>1✉</sup>, Ivan Vladimirovich Koval<sup>2</sup>, Maxim Vitalievich Bogatyr<sup>3</sup>,  
Anastasia Aleksandrovna Tselikova<sup>4</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russia

<sup>1</sup>gawrilovboris@yandex.ru

<sup>2</sup>iv.koval1@yandex.ru

<sup>3</sup>maximbogaty1@gmail.com

<sup>4</sup>anastasiatcelikova1@gmail.com

## APPLICATION OF SEXED SEMEN IN DAIRY CATTLE

*The state and level of reproduction, including cattle, in modern changing conditions indicates the need to revise the main directions in the work on artificial insemination. The problems that have arisen due to the reduced integration of foreign technologies into our livestock farming and the artificial restriction of access to innovative technologies dictate the need for a careful assessment of existing problems and the search for opportunities to solve them. It is necessary to restore and create our own production base with the introduction of existing developments and the development of foreign experience in the field of artificial insemination to obtain offspring with a certain given sex. An integrated approach is needed to solve emerging problems. This is not only the provision of adequate feeding and exercise for reared heifers, bringing them to the anatomical and physiological parameters for insemination at 13–14 months, but also the development of a more advanced - accelerated technology for separating X- and Y-sperm with minimal negative effects that reduce quality indicators. It is important to understand the properties of sexed sperm obtained by various technological methods; there is also a need for methods for assessing it at different stages in the separation process and the effectiveness of insemination, taking into account the influence of various external negative production factors during use. Possible methods for assessing and separating viable sperm from those unsuitable for use, before preparation and after separation, are considered. Possible directions for the development of technology are reflected, taking into account existing scientific domestic and foreign developments. Available information is provided on the technological stages of the already used process of sexing the sperm of farm animals and its production evaluation. The features of using such sperm to obtain high fertility of animals in industrial animal husbandry are highlighted.*

**Keywords:** reproduction, innovative technologies, sexed sperm, artificial insemination

**For citation:** Application of sexed semen in dairy cattle / B.V. Gavrilov [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2023;(10): 187–193. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-10-187-193.

**Введение.** От состояния дел по воспроизводству в молочном скотоводстве зависит выполнение основных задач по обеспечению населения такими основными продуктами питания, как молоко и мясо. Существенное увеличение поголовья скота, совершенствование его племенных качеств – это основополагающие задачи применяемых в животноводстве программ. Без современных технологий успешное их решение невозможно [1]. Очевидно, что для развития отечественного животноводства необходим сильный импульс. Инновационной технологией в животноводстве является осеменение сексированной спермой. В молочном животноводстве это направленное получение телочек, в мясном – получение бычков. Мировая наука и зарубежные практики добились получения запланированного пола. В мире существует всего 11 лабораторий, занимающихся этими вопросами и реализующих свою продукцию по всему миру [2].

В настоящее время главной проблемой при внедрении репродуктивных технологий у нас в животноводстве является в первую очередь отсутствие предприятий по производству сексиро-

ванной спермы, которые могли бы разрабатывать рекомендации по ее применению, контролировали бы процесс получения высоких показателей плодотворного осеменения, с выходом потомства заданного пола.

Применение технологии разделения по полу позволяет получать определенные преимущества в сравнении с обычным осеменением. Размеры новорожденной телочки меньше, чем бычка, у животного отел и восстановление после родов происходят легче, выше сохранность новорожденных и матерей, возрастают процент плодотворного осеменения и продуктивность. В расчете на одно животное (первотелка) прирост продукции увеличивается на 3–5 %, сервис-период сокращается больше чем на 30 дней, еще уменьшаются и трудозатраты. Получение достаточного количества телочек снижает затраты на закупку животных для восполнения поголовья, появляется возможность реализации излишков. Генетический контроль наследуемых признаков позволяет наращивать показатели по продуктивности, качеству, устойчивости к заболеваниям [2]. Увеличение количества телок за счет использования сексированной спермы эко-

номически обоснованно в молочном скотоводстве, что определяет актуальность развития этого направления.

**Цель исследования** – выявить проблемы в применении технологии разделения по полу спермы отечественными производителями для получения планируемого роста производительности животноводства.

**Материалы и методы.** Собраны и обобщены доступные материалы отечественных и зарубежных ученых, их результаты и наблюдения при производстве и использовании сексированной спермы.

**Результаты и их обсуждение.** Решение вопроса разделения спермиев по полу технологически возможно в двух направлениях: химически и технически. Методики разделения базируются на физико-химических, биологических свойствах спермы: на разнице размера, массы, скорости движения, количества определенных генов. Набор предлагаемых способов разделения X- и Y-сперматозоидов достаточно широк: осаждением, центрифугированием в градиенте плотности, электрофорезом, обработкой специфическими антителами и т. д. [3].

Не стоит сбрасывать со счетов использование химического разделения, хотя зарубежные авторы считают это неперспективным, когда в разбавители или в семенную жидкость включают вещества, ослабляющие подвижность избирательно мужских или женских спермиев. В таких опытах достигалось увеличение рождаемости до 60–70 % по заданному полу [4]. Целесообразно рассмотрение применения химических методов в комбинации с техническими.

Среди перспективных можно выделить способы: одновременного приложения силы выталкивания сперматозоидов, которые затем разделяются в различных участках среды; пропускание сперматозоидов через фильтры из шариков двух диаметров: крупные – для X-хромосомных сперматозоидов, мелкие – для несущих Y-хромосому; придание спермиям различной скорости – отклик на градиент плотности, температуры; использование скорости продвижения через колонку с замедляющей средой; использование разной скорости X- и Y-сперматозоидов (сперматозоид с Y-хромосомой легче, а потому чуть быстрее); по силе флуоресцентного свечения; инактивации ненужных прижиганием лазер-

ным лучом в узком потоке при окрашивании флуорохромом; применение препаратов резиквимода и имиквимода, блокирующих гены, кодирующие толл-подобные рецепторы TLR8, TLR7 на X-сперматозоидах, вызывая снижение либо активацию расщепления глюкозы (увеличивает мужское потомство); кодировка белка Cas9 и гидовую РНК работает против генов на Y-хромосоме (увеличивает женское потомство) [5].

При разделении X- и Y-сперматозоидов необходимо понимать, что на них воздействуют различные физические, химические, биологические факторы: разбавление, окрашивание, лазерное излучение, центробежное давление, не свойственные при естественном осеменении, которые приводят к некомпенсируемым изменениям, понижающим качественные показатели.

В предлагаемых к использованию способах можно выделить следующие недостатки: способы разделения сперматозоидов не позволяют получить 100 % степень чистоты, отрицательные воздействия сказываются на всех сперматозоидах, сложность устройств и многоступенчатость процессов разделения потоков клеток, трудноосуществимое окрашивание без повреждения ДНК и снижения оплодотворяющей способности, высокий коэффициент преломления окрашенного ядра, требующий его усиления, снижение жизнеспособности сперматозоидов под ультрафиолетовым облучением при выявлении флуоресценции и целый ряд других.

Через дистрибьюторов сексированную сперму голштинской, айрширской, джерсейской, лимузин, шведской, датской красной и других пород по всему миру и в Россию поставляют пять зарубежных компаний: «Семекс Альянс» – Канада, «ABS GlobalInc», «Си-Ар-Ай», «Альта Дженетикс Раша» – США, «ВикингГенетикс» – Дания, работающих с американской фирмой Sexing Technologies, которой принадлежит патент на технологии производства сексированной спермы [3]. Компания допускает использование только своего оборудования, только своими специалистами и дочерними предприятиями с целью монопольного владения и недопущения раскрытия технологий [6].

Развитие направления пошло в 70-х гг. в результате получения на практике убедительных результатов в области проточной цитометрии в лаборатории Лоуренса. Технологии разделения

получили возможность точного анализа количества ДНК с дифференциацией X- и Y-сперматозоидов – мужской спермий содержит приблизительно на 4 % меньше ДНК, чем женский [1]. Среди пород имеются вариации в разнице массы: джерсей – 4,22 %; ангусы – 4,07; голштины – 4,01 %.

Приобретая продукцию, нужно понимать, что соотношение в дозе и качество самих получаемых разделенных X- и Y-спермиев влияют на плодотворное осеменение. Так, CRI («Си-Ар-Ай») реализовывало два торговых продукта с наличием в дозе 75 и 90 % полноценных X-сперматозоидов: Джен-Чойс-75 и Джен-Чойс-90, дававших разный выход телочек и бычков; отмечаются случаи и подмены продукции недобросовестными дилерами [5].

Фирмой Sexing Technologies предложен усовершенствованный метод Sexed ULTRA™, позволяющий производить и использовать дозы с концентрацией 2,1 млн и с повышенной до 4,1 млн активных клеток (Sexed ULTRA 2M; Sexed ULTRA 4M), для сравнения в обычной дозе – 25 млн и минимально допускаемая к осеменению 10–15 млн. По утверждению авторов, при проведении эксперимента с концентрацией 4 млн оплодотворяемость сексированной спермой практически равнялась по результативности обычному осеменению, а при 2 млн наблюдалось снижение на 20–25 % [2].

Из-за сложности процесса производство предполагает выпуск одного, чаще X-пола, другой пол утилизируется, в редких случаях производят и Y-продукцию. Производство сексированной спермы включает более 20 различных процессов и этапов.

Начинают процесс с объединения дуплетно полученных эякулятов производителя, проводят санитарный и биологический контроль, удаляют лишнюю плазму, доводя до нужной концентрации, разбавляя специальными разбавителями, с добавлением антибиотика и других компонентов в зависимости от применяемых методов подготовки, разделяют, фасуют и замораживают.

Проведение подготовки эякулята направлено на улучшение качественных показателей спермы производителя, дает гарантию, что только здоровые сперматозоиды будут использоваться во время разделения, это возможно сделать с

применением целого ряда различных медицинских методик [7].

*Электростатический метод* – липопротеиновая оболочка зрелых сперматозоидов имеет отрицательный заряд, обладает электрокинетическим потенциалом в пределах 16–20 mV, молодые, незрелые и старые спермии имеют заряд несколько ниже. Электростатически заряжая положительным зарядом стенки стеклянной трубки при протекании спермы, производят отделение качественных сперматозоидов.

*Метод микроэлектрофореза* – буфером для электрофореза заполняют камеру, подают электрический ток, напряжение от 6 до 14 мА. К аноду смещаются нормальные сперматозоиды с отрицательным зарядом, а к катоду – с положительным. При этом присутствует повреждающее воздействие электрического тока и гипотонического давления буфера для электрофореза [8].

*Метод калибровки плотности* – достигается полное отделение мертвых патологических форм сперматозоидов и лейкоцитов. В пробирке формируют несколько слоев жидкостей различной плотности, верхний – сперма. Центрифугируют, вследствие чего полноценные сперматозоиды опускаются в нижний слой, ненужные остаются в первых двух.

*Магнитоактивированная клеточная сортировка* – выявление ранних маркеров апоптоза (активная каспаза 3-го типа). При фрагментации ДНК на поверхности цитоплазматической мембраны выделяется фосфолипид фосфатидилсерин – используют специальные маркеры. Связанные сперматозоиды задерживает магнитное поле. Для быков применяют наночастицы двух типов, которые связывают с гликанами мембраны: первый тип с антителами к убиквитину и второй – покрытые лектином PNA [8].

За рубежом разделение спермиев проводят методом проточной цитометрии. Он требует проведения окрашивания с помощью флуоресцентной витальной нетоксичной краски Hoechst 33342, которая избирательно связывается с Аденин / Тимин базовой парой. Процесс окрашивания длится 35–40 мин при температуре 30 °С. Применяют для спермиев и краситель Dansyl Lysine, а для выделения мертвых сперматозоидов добавляют иодид пропидия (PI), 7-аминоактиномицин (7-AAD), 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) [9].

Само разделение идет под специальным давлением, температуру в сперме понижают до 18 °С, устройством создается направленная ориентация клеток в потоке, на которые воздействуют твердотельным лазером. Специальный вибратор образует в растворе микрокапельки, в каждой капле дисперсного раствора содержится один сперматозоид, они заряжаются в зависимости от величины светоизлучения положительно X или отрицательно Y. За секунду проходит от 40 до 80 тыс. сперматозоидов. Поток разделяют магнитным полем, используют двойные ортогональные детекторы, специальные программы и цифровые устройства для поляризованных X- и Y-сперматозоидов [10]. Компании-XY (XY Inc.) принадлежало право на применение Клеточного сортера MoFlo-SX, он способен ориентировать спермии при помощи специальных сопел.

При распознавании используется программное обеспечение, дифференцирующее спермии по показателям: MAD, LIN и STR, где MAD – среднее угловое смещение, угол поворота головки сперматозоида относительно траектории, LIN – процент линейности криволинейной дорожки, STR – процент прямой траектории. Другие показатели для спермы, такие как VCL, VSL, VAP, WOB, ALH, BCF, VCL, мало информативны, их в этом процессе отбора не учитывают. Выделяемая четвертая часть от количества спермиев эякулята X-хромосомная, также четвертая Y-хромосомная, остальная идет как поврежденная, или не распознанная со слабым окрашиванием [3].

Для увеличения концентрации сперматозоиды далее центрифугируют и разбавляют средой для хранения и заморозки, содержащей криопротекторы. Вначале охлаждают до 5 °С, затем фасуют и замораживают в программируемом замораживателе в соломинках объемом 0,25 мл с нанесением кода 529 (для обычной спермы используют код 29). Оценку качества заморозки проводят инкубацией образца в течение 3 ч при температуре 35 °С, включающую определение показателей концентрации, подвижности, бактериальной чистоты, сохранности акросом [1].

В хозяйствах, в отличие от обычного 2-кратного осеменения, цервикально с ректальной фиксацией шейки матки сексированной спермой осеменяют однократно, здесь в большей степе-

ни играет роль себестоимость одной дозы, она превышает несексированную в 4–5 раз (до 2 000 руб. и более) [3]. Вначале, при внедрении технологий, и отчасти сейчас некоторые специалисты рекомендуют использовать сексированную сперму только на телках. Проверка практикой показала, что и при осеменении коров с обязательным контролем восстановления после родов результаты получают не хуже. С учетом того, что в летний период уровень оплодотворяемости животных снижается в среднем в 2,5 раза, пропорционально силе теплового перегрева, не рекомендуют применять осеменение сексированной спермой, переходят на обычное [6]. Также при работе с сексированной спермой не рекомендуются гормональные обработки (синхронизация, стимуляция), при их применении отмечено снижение приживляемости зигот. Перед осеменением проводят размораживание соломинки в водяной бане при температуре 35 °С в течение 45 с, от размораживания до введения животному интервал времени не более 10 мин.

Выход телят на 100 коров при использовании X-спермы в хозяйствах Краснодарского края достигает по двум осеменениям 30–45 телочек, что в 1,5 раза ниже, чем неразделенной по полу, тем не менее для молочного животноводства это экономически выгодно. Доля использования сексированного семени составляет около 25 % [10].

**Заключение.** Отечественное животноводство нуждается в создании собственных лабораторий, способных заниматься разработкой, проверкой и внедрением технологий по разделению сперматозоидов по полу, разработкой рекомендаций применения в условиях хозяйств. Необходима проработка всех этапов разделения, проведение стандартизации методов, процессов, оборудования и контроля при производстве и применении сексированной спермы. Использование сексированной спермы – инновационный высокоэффективный механизм, который позволит молочным хозяйствам получать стабильную экономическую выгоду. Дальнейшее развитие эффективного молочного животноводства невозможно без использования сексированного семени.

## Список источников

1. Опыт и перспективы использования сексированного семени для увеличения поголовья молочных коров на Кубани / В.В. Усенко [и др.] // Научный журнал КубГАУ. 2014. № 101 (07).
2. Никулин Д.М. Сексированное семя: эффективность применения в молочном животноводстве // Нивы Зауралья. 2014. № 11 (122). С. 78–79.
3. Ерохин А.С., Дунин М.И. Методы регуляции пола у животных / ВНИИплем. М., 2009. 64 с.
4. Пат. RU 2297198С2 С2. Способ разделения клеток спермы, несущих X-хромосому, и клеток спермы, несущих Y-хромосому / Кеннет М. Эванс, Ван Мунстер Эрик Б. № 2002132899113; заявл. 10.12.2004, опубл. 20.04.2007, Бюл. № 11.
5. Takashi U., Natsumi T., Masayuki Sh. Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm. *Journal PLOS Biology*, 2019 Aug 13;17(8).
6. Леонардо Ф.С. Брито. Прогресс в производстве сексированного семени «Сексинг Технолоджиз Дженетикс». URL: <https://www.mkg-nn.ru/index.php/upravlenie-stadom/2-uncategorised/130-progress-v-proizvodstve-seksirovannogo-semeni-seksing-tek-nolodzhiz-dzhenetiks>.
7. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge / Philip J. Chan [et al.] // *Fertility and Sterility: Techniques and instrumentation*. 2006. Vol. 85, № 2. P. 481–486.
8. Назаренко Р.В., Здановский В.М. Методы селекции сперматозоидов для процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в программах экстракорпорального оплодотворения (обзор литературы) // *Проблемы репродукции*. 2019. Т. 25, № 2. С. 83–89.
9. Ormerod M.G., Tribukait B., Giaretti W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology // *Analytical Cellular Pathology*. (Hindawi Publishing Corporation). 1998. V. 17. № 2. P. 103–110.
10. Эффективность осеменения телок сексированным семенем / М.И. Дунин [и др.] // *Молочное и мясное скотоводство*. 2011. № 3. С. 9–11.

## References

1. Opyt i perspektivy ispol'zovaniya seksirovannogo semeni dlya uvelicheniya pogolov'ya molochnyh korov na Kubani / V.V. Usenko [i dr.] // *Nauchnyj zhurnal KubGAU*. 2014. № 101 (07).
2. Nikulin D.M. Seksirovannoe semya: `effektivnost' primeneniya v molochnom zhivotnovodstve // *Nivy Zaural'ya*. 2014. № 11 (122). S. 78–79.
3. Erohin A.S., Dunin M.I. Metody regulyatsii pola u zhivotnyh / *VNIIPlem. M.*, 2009. 64 s.
4. Pat. RU 2297198C2 S2. Sposob razdeleniya kletok spermy, nesuschih X-hromosomu, i kletok spermy, nesuschih Y-hromosomu / Kennet M. `Evans, Van Munster `Erik B. № 2002132899113; zayavl. 10.12.2004, opubl. 20.04.2007, Byul. № 11.
5. Takashi U., Natsumi T., Masayuki Sh. Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm. *Journal PLOS Biology*, 2019 Aug 13;17(8).
6. Leonardo F.S. Brito. Progress v proizvodstve seksirovannogo semeni «Seksing Tehnologzhiz Dzhenetiks». URL: <https://www.mkg-nn.ru/index.php/upravlenie-stadom/2-uncategorised/130-progress-v-proizvodstve-seksirovannogo-semeni-seksing-tek-nolodzhiz-dzhenetiks>.
7. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge / Philip J. Chan [et al.] // *Fertility and Sterility: Techniques and instrumentation*. 2006. Vol. 85, № 2. P. 481–486.
8. Nazarenko R.V., Zdanovskij V.M. Metody selekcii spermatozoidov dlya procedury intracitoplazmaticheskoy in`ekcii spermatozoida v programmah `ekstrakorporal'nogo oplodotvorenija (obzor literatury) // *Problemy reprodukcii*. 2019. T. 25, № 2. S. 83–89.
9. Ormerod M.G., Tribukait B., Giaretti W. Consensus report of the task force on standardisa-

tion of DNA flow cytometry in clinical pathology // Analytical Cellular Pathology. (Hindawi Publishing Corporation). 1998. V. 17. № 2. P. 103–110.

10. `Effektivnost' osemneniya telok seksirovanym semenem / *M.I. Dunin* [i dr.] // *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo*. 2011. № 3. S. 9–11.

Статья принята к публикации 24.05.2023 / The article accepted for publication 24.05.2023.

Информация об авторах:

**Борис Викторович Гаврилов**<sup>1</sup>, доцент кафедры анатомии, ветеринарного акушерства и хирургии, кандидат ветеринарных наук, доцент

**Иван Владимирович Коваль**<sup>2</sup>, старший преподаватель кафедры анатомии, ветеринарного акушерства и хирургии

**Максим Витальевич Богатырь**<sup>3</sup>, студент

**Анастасия Александровна Целикова**<sup>4</sup>, студентка

Information about the authors:

**Boris Viktorovich Gavrillov**<sup>1</sup>, Associate Professor at the Department of Anatomy, Veterinary Obstetrics and Surgery, Candidate of Veterinary Sciences, Docent

**Ivan Vladimirovich Koval**<sup>2</sup>, Senior Lecturer at the Department of Anatomy, Veterinary Obstetrics and Surgery

**Maxim Vitalievich Bogatyr**<sup>3</sup>, student

**Anastasia Aleksandrovna Tselikova**<sup>4</sup>, student

