

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ, НЕСУЩИХ X- ИЛИ Y-ХРОМОСОМУ, ДЛЯ ИХ РАЗДЕЛЕНИЯ НА КЛЕТКИ ОДНОГО ТИПА

Обзор

© 2023 Д.В. Поздышев^{1*}, Н.А. Комбарова², В.И. Муронец^{1,3}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: denispoz@gmail.com

² Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных, 142143 пос. Быково, Московская обл., Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.12.2022

После доработки 10.02.2023

Принята к публикации 20.02.2023

В обзоре собрана информация о биохимических особенностях сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, которые позволяют получить фракцию спермы с определённой половой хромосомой. Практически единственная используемая на сегодняшний день технология такого разделения (сексирования) основана на сортировке сперматозоидов по содержанию ДНК методом проточной цитофлуориметрии. Помимо прикладных аспектов, эта технология дала возможность проводить анализ свойств изолированных популяций сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому. В последние годы появился ряд работ, доказавший существование различий между этими популяциями на уровне транскриптома и протеома. Примечательно, что эти различия связаны главным образом с энергетическим метаболизмом и структурными белками жгутика. На различиях в подвижности между сперматозоидами с разными половыми хромосомами основаны новые методы обогащения спермы клетками с X- или Y-хромосомой. Сегодня сексирование спермы является важной составной частью протокола искусственного осеменения коров с использованием криоконсервированного семени, позволяющего увеличить долю потомства нужного пола. Кроме того, успехи в разделении X- и Y-сперматозоидов могут позволить применять этот подход в медицине в тех случаях, когда необходимо избежать опасных заболеваний, сцепленных с полом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: X/Y-сперматозоиды, подвижность сперматозоидов, сексирование.

DOI: 10.31857/S0320972523050081, **EDN:** AYEUEB

ВВЕДЕНИЕ

Искусственное воспроизведение потомства определённого пола у млекопитающих является интересной задачей, привлекавшей внимание исследователей на протяжении многих веков. Но только в последнее время появилась возможность влиять на этот процесс с помощью разделения сперматозоидов на популяции, несущие X- или Y-хромосому (сексирование). Хотя, в принципе, предопределить пол потомства можно и у человека, протоколов по сек-

сированию спермы человека не существует, во многом потому, что при медицинских показаниях отбор проводят на стадии преимплантационного тестирования эмбриона. При этом, как будет сказано ниже, эксперименты по разделению сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, проводятся достаточно эффективно, и эта процедура весьма востребована в животноводстве. Известно, что разные отрасли животноводства имеют разные предпочтения к полу потомства. Например, при разведении мясных пород крупного рогатого скота

Принятые сокращения: TLR7/8 – Toll-подобные рецепторы 7/8.

* Адресат для корреспонденции.

предпочтительно получать бычков, а молочных пород – тёлочек. Технологии сексирования способны значительно улучшить эффективность производства. На сегодняшний день искусственное осеменение в сочетании с технологией криоконсервации семени – это основной метод в разведении крупного рогатого скота в развитых странах. Для мелких жвачных животных, таких как овцы и козы, искусственное осеменение не так распространено, но протоколы вспомогательных репродуктивных технологий активно внедряются и для этих животных [1]. В таких условиях вопрос предопределения пола во многом сводится к вопросу обогащения инсеминационной дозы сперматозоидами, несущими предпочтительную половую хромосому. Наиболее изученным методом обогащения спермы одним типом гамет является проточная сортировка с флуоресцентным мечением ДНК (FACS) [2]. Указанная технология имеет ряд недостатков и ограничений, таких как высокая стоимость оборудования и обслуживания, относительно низкая скорость сортировки, плохая масштабируемость производства, пониженные показатели фертильности [3]. При этом точность сортировки таким методом достигает 90% [4], что делает его «золотым стандартом» в сексировании семени. Высокая чистота отбора клеток была получена благодаря использованию специальной запатентованной системы позиционирования сперматозоидов в потоке сортера. И хотя эта технология, основанная на разнице в содержании ДНК в X- и Y-сперматозоидах, активно улучшается, наличие патентных ограничений заставляет сосредоточить внимание многих исследовательских групп на других методах сексирования спермы. Кроме того, сортировка с проточной флуориметрией дала возможность проводить анализ транскриптомов и протеомов разделённых популяций спермы, что выявило новые различия между ними. В настоящее время опубликован ряд обзоров, охватывающих все существующие подходы к сексированию, например, работа Vishwanath et al. [5]. В данном обзоре подробно рассмотрены исследования, посвящённые только методам обогащения спермы гаметами с определённой половой хромосомой, основанным на особенностях их подвижности, а также биологические причины таких особенностей. Так как прикладной аспект данного вопроса сегодня актуален главным образом для крупного рогатого скота, экспериментальные данные по методам обогащения собраны главным образом для бычков, в то время как информация о фундаментальных

различиях X- и Y-сперматозоидов часто была получена на млекопитающих, представляющих более распространённые модельные системы.

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДА

Эволюция сперматозоида была направлена на возможность доставлять генетический материал к ооциту. Зрелый сперматозоид состоит из головки, несущей в себе гаплоидное ядро, и жгутика, предопределяющего его способность к перемещению [6]. Большая часть цитоплазмы элиминируется при его созревании, и сохраняются лишь некоторые из органелл. До слияния с ооцитом сперматозоид претерпевает ряд значительных изменений, при этом тип подвижности постоянно меняется. Мужские гаметы не обладают прогрессивной подвижностью сразу после отделения от клеток Сертоли в просвет семенного канальца и приобретают способность двигаться после прохождения придатка яичка [7]. После эякуляции жгутик становится активным в репродуктивных путях самки, однако на этом этапе механические характеристики биения жгутика непостоянны. В экспериментах *in vivo* при наблюдении активных сперматозоидов выделяют как минимум два типа биения жгутика с разной амплитудой [8]. *In vitro* можно отличить четыре типа биения: симметричное биение жгутика с маленькой амплитудой, асимметричное биение с большой амплитудой, промежуточный тип подвижности, а также биение среднего участка, приводящее к закручиванию жгутика [9]. Каждый тип подвижности жгутика определяет характерную траекторию движения сперматозоида, что связано с его локализацией и степенью капацитации [10]. Известно, что для успешного оплодотворения эта высокоспециализированная клетка быстро реагирует на изменения среды, обладает хемо-, термо- и реотаксисом [11]. На последнем этапе пути химический сигнал вокруг яйцеклетки усиливает движение сперматозоида, приводя его в состояние гиперактивации, что является необходимым условием для проникновения мужской гаметы в ооцит [12].

Достижение ооцита сперматозоидом определяется системой регуляции, обеспечивающей направление и адекватный паттерн подвижности, а также успешным снабжением клетки энергией. Регуляция траектории и подвижности происходит за счёт многокомпонентных

процессов, обзорно рассмотренных, например, в статье Vuklicka et al. [13]. Интересно, что даже внутри класса млекопитающих сигнальные пути, регулирующие подвижность, значительно отличаются [14]. Но среди универсальных регуляторных событий можно отметить Ca^{2+} -сигнал и сигнальные пути, ассоциированные с сАМР-зависимой протеинкиназой А [15]. В общем виде регуляция биения жгутика осуществляется передачей внешнего сигнала через элементы плазматической мембраны, такие, например, как ионные каналы CatSper или TRPV4, к регуляторным белковым комплексам цитоскелета. Как полагают, управление размером и формой изгиба жгутика определяется комплексом центральных пар микротрубочек и радиальных спиц его структурной основы – аксонемы, в то время как колебательное движение осуществляется за счёт периферических дуплетов микротрубочек [16].

Что касается энергетического метаболизма сперматозоида, то изгибание жгутика обеспечивается фосфорилированием внешних динеиновых ручек дуплетов микротрубочек, что сопровождается гидролизом АТФ. Это приводит к скольжению микротрубочек аксонемы и инициирует биение. Гликолиз, пентозофосфатный путь и окислительное фосфорилирование могут отвечать за накопление АТФ в сперматозоиде на разных этапах [17]. Митохондрии, в которых происходит окислительное фосфорилирование, находятся исключительно в среднем отделе жгутика, и не совсем ясно, как осуществляется доставка АТФ на всём его протяжении. На сегодняшний день полагают, что для млекопитающих АТФ, обеспечивающий биение жгутика, образуется преимущественно в ходе гликолиза [18]. Некоторые белки гликолиза входят в состав фиброзного слоя – особой структуры цитоскелета жгутика, которая позволяет вырабатывать АТФ непосредственно в основном отделе жгутика [19]. Речь идёт о спермоспецифических изоформах гексокиназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, фосфофруктокиназы и лактатдегидрогеназы [20], некоторые из которых обладают повышенной стабильностью в сравнении с соматическими паралогами [21]. Стоит отметить, что описаны также и факты против определяющей роли гликолиза в подвижности сперматозоидов – так, сперматозоиды многих видов могут оставаться подвижными в течение длительного периода времени в среде без субстратов гликолиза [22]. С учётом того, что на разных этапах источник АТФ может быть разным, вопрос вклада окислительного фосфорилирования и гликолиза в тече-

ние жизненного цикла сперматозоида остаётся открытым.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОТЛИЧИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ, НЕСУЩИХ X- ИЛИ Y-ХРОМОСОМУ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОДВИЖНОСТЬЮ

При наличии на пути сперматозоидов к ооциту большого количества потенциально селективирующих этапов первичное соотношение полов для быков статистически не отличается от соотношения 1 : 1 [23, 24]. Как показывают полевые исследования, вторичное соотношение полов также даёт близкую к равной вероятность рождения самцов и самок для основных сельскохозяйственных животных [25]. Примечательно, что при этом для сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, показаны биохимические отличия, потенциально ассоциированные с подвижностью. Учитывая схему сперматогенеза, эти отличия могут закладываться, начиная с этапа мейотического деления сперматоцитов, на котором появляются гаплоидные сперматиды [26]. Во время мейоза происходит транскрипционный сайленсинг половых хромосом, но после деления клетки их транскрипционная активность частично восстанавливается [27]. Несмотря на то, что сперматиды вплоть до завершения спермиогенеза созревают в составе синцитиев, где цитоплазма клеток активно обменивается белками и РНК в составе хроматоидных тел [28], для большого класса генов млекопитающих их мРНК накапливается преимущественно в клетках, в которых присутствует соответствующий аллель, и это касается в том числе генов половых хромосом [29]. Другими словами, разница в содержании ДНК для X- и Y-популяции сперматозоидов может приводить к фенотипическим отличиям этих групп. Информация об исследованиях таких отличий на уровне транскриптома и протеома для бычьей спермы собрана в табл. 1.

Разница между сперматозоидами, несущими X- или Y-хромосому, подтверждается в ряде исследований, в которых проводили дифференциальный анализ таких клеток, разделённых с помощью проточной цитофлуориметрии или методом секвенирования РНК одиночных клеток. Так, для сперматид было найдено 150 генов, транскрипция которых была ассоциирована с определённой половой хромосомой в клетке [29]. Среди них интересно отметить гены, кодирующие гомолог белка, взаимодействующего с фиброзным слоем (Fsp1),

Таблица 1. Биохимические различия между популяциями бычьих сперматозоидов, несущих X- и Y-хромосому

Основные методы исследования	Обнаруженные различия	Ссылка
Секвенирование РНК одиночных клеток	повышенное накопление мРНК 104 генов X-хромосомы и 46 генов Y-хромосомы в сперматидях с соответствующей половой хромосомой	[29]
Вычитающая подавляющая гибридизация, кДНК-чип, валидация результатов количественной ПЦР	31 ген с дифференциальной транскрипцией	[30]
Секвенирование РНК, валидация результатов количественной ПЦР с обратной транскрипцией	3 и 9 микроРНК накапливаются в больших количествах в X- и Y-сперматозоидах соответственно	[31]
Двумерный гель-электрофорез, масс-спектрометрия, валидация вестерн-блот анализом	42 белка имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[32]
Сверхэффективная жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией	17 белков имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[33]
Масс-спектрометрия	8 белков имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[34]
Иммунологический анализ кроличьей сыворотки против сексированной спермы	получены поликлональные антитела, обладающие специфичностью только к X- или Y-сперматозоидам, проведена иммунопреципитация антигена	[35]
Жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией, валидация вестерн-блот анализом	270 белков имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[36]
Биоинформатический анализ транскрипции половых хромосом, иммуноцитохимия	Толл-подобные рецепторы 7/8 представлены в больших количествах на X-сперматозоидах	[37]
Жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией	13 белков имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[38]
Иммунологический анализ мышинной сыворотки против сексированной спермы	получены моноклональные антитела, обладающие специфичностью только к Y-сперматозоидам	[39]
Иммунологический анализ козьей сыворотки против сексированной спермы	получены поликлональные антитела, обладающие специфичностью только к Y-сперматозоидам с белком SRY в качестве антигена	[40]
Жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией	54 белка имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[41]

одну из изоформ киназы пируватдегидрогеназы (Pdk3) и 6-фосфофрукто-2-киназы (Pfkfb1), транскрипция которых ассоциирована с X-хромосомой и которые потенциально могут быть связаны с подвижностью.

В работе, в которой проводилось сравнение транскрипционных профилей бычьих сперматозоидов, разделённых по полу, методом вычитающей гибридизации были идентифицированы гены с дифференциальной экспрессией в Y- или X-обогащённых популяциях

спермы [30]. В частности, X-сперматозоиды несли больше мРНК, кодирующих митохондриальные белки CYTB и ISCU. CYTB – это субъединица комплекса bc1, а ISCU – белок, взаимодействующий с Fe-S-кластерами, оба играют ключевую роль в окислительном фосфорилировании. Разница в экспрессии митохондриальных генов может быть ассоциирована с изменениями в характере подвижности, как было показано ранее на других экспериментальных моделях. Так, подвижность спер-

матозоида хряка менялась с прогрессивной на непрогрессивную при инкубации с D-хлорамфениколом, который ингибирует трансляцию митохондриальных генов [42]. Интересно, что в упомянутой работе среди РНК, для которых была показана разная представленность в Y- и X-сперматозоидах, найдено значительное число некодирующих РНК [30]. Важность некодирующих РНК в отличиях исследуемых групп клеток была подтверждена и в других исследованиях. Были идентифицированы 3 микроРНК, которые накапливаются преимущественно в мужских гаметах с X-хромосомой, а также 9 микроРНК, специфичных для мужских гамет с Y-хромосомой [31]. Интересно, что некоторые из таких микроРНК были среди наиболее представленных при сравнении некодирующего транскрипта высоко- и малоподвижных популяций бычьей спермы [43]. Приведённые выше факты говорят о потенциальном участии этого типа РНК в регуляции подвижности мужских половых клеток.

С тех пор, как была показана транскрипция генов половых хромосом в сперматиде, долгое время общепринятым считалось, что межклеточные мостики позволяют выравнивать количество синтезируемых белков в гаметах, несущих X- или Y-хромосому [44]. Однако с распространением FACS-технологии разделения спермы были получены доказательства существования белков, накапливаемых только в одном типе сексированных сперматозоидов. Целая группа работ представляет сравнение бычьих сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, на уровне протеома.

С помощью двумерного гель-электрофореза были найдены 42 белка с дифференциальной экспрессией в рассматриваемых группах сперматозоидов [32]. Среди находок было много белков энергетического метаболизма, таких как субъединица комплекса bc₁, субъединица β АТФ-синтазы, субъединица α изоцитратдегидрогеназы и другие. Также было обнаружено неравное количество белков цитоскелета; так, в сперматозоидах, несущих X-хромосому, было больше α- и β-тубулина. Сравнительный анализ сексированных фракций спермы быка методом сверхэффективной жидкостной хроматографии, совмещённой с масс-спектрометрией, также выявил дифференциальное накопление белков цитоскелета и ферментов гликолиза [33]. В частности, в X-сперматозоидах детектировали больше β-тубулина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, для которой ранее была показана связь с подвижностью [45]. В ещё одном исследовании протеома было найдено 8 белков с не-

равным распределением в X- и Y-обогащённой сперме [34]. Примечательно, что митохондриальные белки, такие как цитохром с-оксидаза и ацетил-CoA-карбоксилаза, также детектируются в большем количестве в мужских гаметах с X-хромосомой.

Сравнение протеомов X- и Y-сперматозоидов быков с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией показало, что 27 белков накапливались в большем количестве в X-сперме, 3 белка – в Y-сперме, в то время как 24 белка были обнаружены только в одном типе сперматозоидов [41]. Среди потенциально ассоциированных с подвижностью белков можно отметить фосфолипидмутазу и кальмодулин, которые детектируются только в гаметах с X-хромосомой. Для другого дифференциально экспрессируемого белка из данного списка – ARMC12 – также была показана связь с активностью биения жгутика [46].

Хотя некоторые из упомянутых омиксных данных требуют верификации, можно отметить значительные различия между X- и Y-сперматозоидами, которые связаны с организацией цитоскелета и энергетическим метаболизмом клеток, что, в свою очередь, может быть связано с особенностями подвижности.

Исторически большие надежды возлагались на иммунологические способы сексирования сперматозоидов. Методы, основанные на свойствах H-Y-антигена, были одними из первых попыток разделить по полу сперму млекопитающих, однако не доказали своей эффективности [47]. Недавно появился ряд работ, продолжающих это направление, которые посвящены поиску отличий в белках плазматической мембраны для X- и Y-сперматозоидов. Так, при сравнении сексированных фракций спермы быков восемь белков были обнаружены в больших количествах в сперматозоидах, несущих X-хромосому, и 23 белка – в клетках, несущих Y-хромосому [36]. Интересно, что среди белков, детектируемых только в одной популяции сперматозоидов, оказалась группа белков, относящихся к регуляции сигнального пути T-клеточных рецепторов. Это соотносится с исследованиями, в которых было показано, что Toll-подобные рецепторы 7/8 (TLR7/8) обнаруживаются преимущественно на X-сперматозоидах [37]. Более того, было показано, что активация этого рецептора приводит к классическому сигнальному каскаду – в клетке растёт число фосфорилированных форм киназы гликогенсинтазы 3 α/β и транскрипционного фактора NF-κB. Это ведёт к снижению митохондриального дыхания, количества АТФ и уменьшению подвижности сперматозоидов [48].

Ещё одно исследование разницы в составе белков плазматической мембраны сперматозоидов с разными половыми хромосомами выявило два белка, менее представленных в Y-сперме, а также 4 и 7 белков, детектируемых в клетках только с X- или только с Y-хромосомой соответственно [38]. Среди белков, специфичных для X-сперматозоидов, можно отметить кератин двух типов: кератин 19 (тип I) и кератин 5 (тип II). Кератины синтезируются в течение сперматогенеза и обнаруживаются в составе фиброзного слоя и наружных плотных фибрилл жгутика сперматозоида. На уровне белка в сперматозоидах быка ранее был обнаружен кератин 19 (тип I) [49], также в бычьих сперматозоидах показано наличие мРНК кератина 8 (тип II) [50]. О функции и регуляции этих белков известно немного. Что касается связи этих белков с подвижностью, то показано, что кератин 1 (тип II) накапливается в больших количествах в жгутиках сперматозоидов мужчин с астенозооспермией [51]. Также известно, что для мышей мутация гена, кодирующего кератин 9 (тип I), приводит к формированию сперматозоидов с дефектными жгутиками [52].

Для поиска отличий в белковом составе сперматозоидов с разными половыми хромосомами применялись также иммунологические подходы. Так, была получена сыворотка кролика с антителами против сексированной бычьей спермы двух типов. Результаты иммунофлуоресцентной окраски сперматозоидов с помощью полученных антител и проточной цитофлуориметрии подтвердили их специфичность по отношению к клеткам с определённым типом половой хромосомы [35]. Похожая стратегия поиска привела к изоляции антитела к Y-сперматозоиду из мышьяной сыворотки [39]. Интересно, что полученные антитела удалось использовать для сексирования бычьей спермы с помощью иммуномагнитной сепарации [53]. Также иммунологический подход позволил идентифицировать белок SR_Y в качестве специфичного маркера Y-несущих сперматозоидов [40].

Упомянутые в данном разделе отличия в протеоме сперматозоидов, несущих Y- или X-хромосому быков, найдены с использованием сортированной спермы. При этом стоит учитывать, что ряд изменений в белковом составе мог произойти вследствие самой проточной цитофлуориметрической сортировки. Эти изменения могут быть результатом необходимых для разделения процедур, таких как окраска ядер интеркалирующим красителем Хёхст 33342, воздействие лазера, смена буфера, или результатом отбора популяции сперматозоидов определённого состояния, например,

определённой стадии капацитации [54]. Показано, что сексированная указанным способом сперма имеет отличный по сравнению с несортированным образцом состав белков энергетического метаболизма, структурных белков жгутика, белков, вовлечённых в капацитацию и акросомную реакцию [55]. То есть некоторые из находок, описанных в таблице 1, могут относиться не к природе X- или Y-сперматозоидов, а, например, к артефактным особенностям сильно или слабо флуоресцирующей при окраске Хёхст 33342 популяции клеток.

РАЗМЕРЫ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СПЕРМАТОЗОИДОВ, НЕСУЩИХ X- И Y-ХРОМОСОМЫ

Цитофлуориметрический метод сортировки спермы основан на том, что X-сперматозоиды быков содержат в среднем на 3,9% больше ДНК, чем клетки, несущие Y-хромосому [56]. При этом информация о разнице в размере головки X- и Y-сперматозоида противоречива. Согласно одним исследованиям, объём головки X-сперматозоида быков также больше на 3,5–4% [57, 58], другие работы такой разницы не подтверждают [59]. Исследование с помощью атомно-силовой микроскопии, позволяющей получить информацию о трёхмерной структуре клеток и их поверхности по 23 параметрам, не выявило значимых отличий в размере сперматозоидов быков [60]. Похожая ситуация с вопросом о сравнении размеров сперматозоидов, несущих разные половые хромосомы, складывалась и для человека — при том, что долгое время считалось, что разница существует [61], последние работы на основе данных фазово-контрастной микроскопии этого не подтверждают [62].

В любом случае доказанная разница в содержании ДНК заставляет исследователей искать и другие особенности этих клеток, в том числе в характеристиках подвижности. Значимые отличия показаны только для их среднего углового перемещения и прямолинейности пути. Так, было показано, что траектория движения X-несущих сперматозоидов более линейная по сравнению с Y-несущими [63]. При исследовании подвижности сортированных сперматозоидов быков в объёме Y-сперматозоиды имели большую склонность к спиральным траекториям [64].

Общее количество прогрессивно-подвижных клеток в замороженной-оттаянной сортированной сперме быков, обогащённой Y- или X-несущими клетками, статистически неот-

лично [65], однако отобранная на сортере популяция Y-сперматозоидов дольше сохраняет подвижность в экспериментах *in vitro* [66], что может быть связано с упомянутыми ранее особенностями энергетического метаболизма. Интересно, что для интактной спермы соотношение сперматозоидов, несущих X- и Y-хромосому, не меняется в течение продолжительной инкубации при физиологических значениях pH, что было показано для хряка и для человека [67]. Это, как было отмечено ранее, говорит о том, что не все свойства отобранных с помощью проточной цитофлуорометрии популяций присущи всем сперматозоидам с X- или Y-хромосомой. Важно отметить, что в тестах на подвижность с хемотаксисом, индуцированным прогестероном, сортированная и несортированная популяция бычьих сперматозоидов ведёт себя одинаково [68].

Методы, основанные на подвижности сперматозоидов, первоначально использовались для очистки и селекции активно-подвижных кле-

ток. После публикации об обогащении человеческой спермы Y-несущими гаметами при центрифугировании в градиенте альбумина [69], результаты которой были оспорены позднее, началась эра исследований, посвящённых разработке протокола, позволяющего отделить X- и Y-сперматозоиды, используя особенности их подвижности. В следующем разделе приведены результаты экспериментов, опубликованные не более чем в последние 20 лет, и касающиеся указанных методов сексирования семени быков.

МЕТОДЫ СЕКСИРОВАНИЯ СПЕРМЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Классические методы, позволяющие разделить клетки с разной подвижностью, сводятся к разделению в градиенте плотности и разделению методом всплытия «swim-up». Существуют и другие методы, основанные на подвижности,

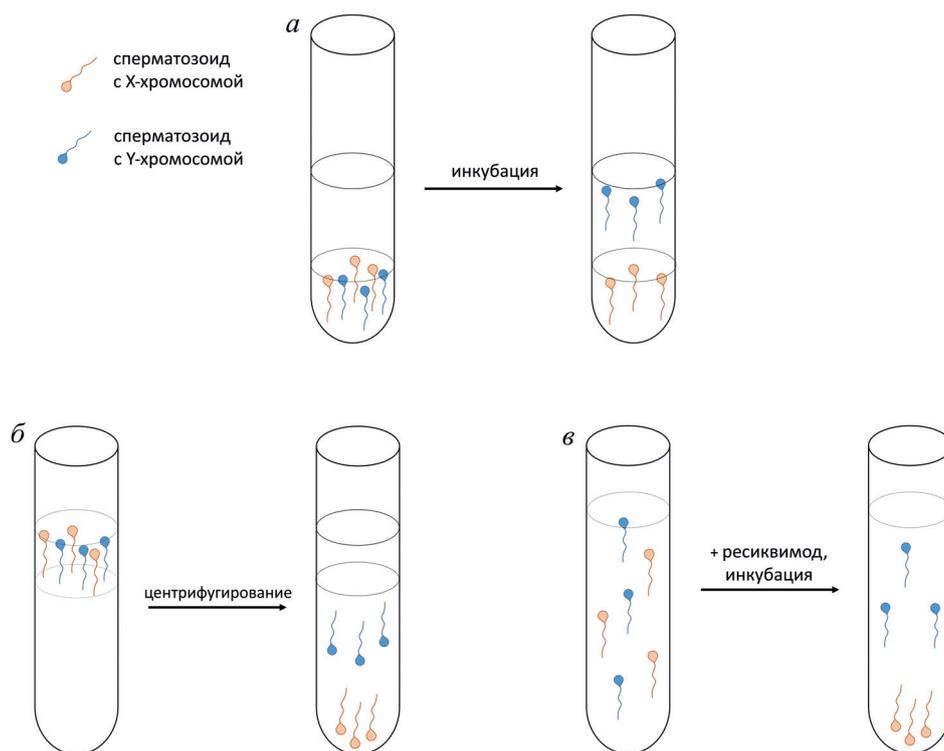


Схема основных методов разделения спермы на фракции, обогащённые сперматозоидами с X- или Y-хромосомой, основанные на особенностях подвижности этих клеток. а – Метод всплытия или swim-up метод. На сперму наслаивается специальная среда, в которую в течение инкубации выходят преимущественно Y-сперматозоиды. Большая часть X-сперматозоидов остаётся в нижнем слое. Метод может быть дополнен центрифугированием на начальном этапе для осаждения клеток на дно пробирки. б – Метод разделения в градиенте плотности. Сперма наслаивается на буфер с градиентом концентрации коллоидных частиц (например, Percoll) с повышением плотности ко дну пробирки. Центрифугирование приводит к миграции клеток с X-хромосомой в нижние слои, в то время как Y-сперматозоиды концентрируются в средних слоях. Метод может быть модифицирован повторным центрифугированием собранных фракций. в – Метод специфического подавления подвижности сперматозоидов с помощью активации рецептора TLR8. В буфер со спермой добавляют ресиквимод, активирующий TLR8 на поверхности X-сперматозоидов, что приводит к их обездвиживанию; после инкубации верхние слои обогащены Y-сперматозоидами. И нижняя, и верхняя фракция после отмывки пригодны к оплодотворению *in vitro*. Метод может быть дополнен swim-up процедурой после добавления ресиквимода

Таблица 2. Исследования, в ходе которых были описаны методы разделения спермы на фракции, обогащённые сперматозоидами с X- или Y-хромосомой, основанные на особенностях подвижности

Метод обогащения спермы сперматозоидами с X- или Y-хромосомой	Метод определения соотношения X : Y после процедуры обогащения	Соотношение X : Y после обогащения (максимальный результат)	Ссылка
Swim-up метод в колонках длиной 30 см	флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH) сперматозоидов и эмбрионов	38 : 62	[74]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll	пол потомства после искусственного осеменения и переноса эмбриона	71,4 : 28,6	[75]
Двойное центрифугирование в градиенте плотности Percoll	пол потомства после искусственного осеменения	66,7 : 33,3	[76]
Комбинация swim-up метода и центрифугирования в градиенте плотности Percoll	ПЦР эмбрионов	60,6 : 39,4	[77]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll	FISH сперматозоидов	55,7 : 44,3	[78]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll	ПЦР эмбрионов	63 : 37	[79]
Swim-up метод	ПЦР эмбрионов	41,6 : 58,4	[80]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll		63,4 : 36,6	
Двойной swim-up метод с добавлением гепарина	ПЦР сперматозоидов	67 : 33	[81]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll	ПЦР сперматозоидов и эмбрионов	62 : 38	[82]
Swim-up метод в колонках длиной 30 см	ПЦР сперматозоидов	Есть смещение в сравнении с контролем	[83]
Swim-up метод	пол потомства после искусственного осеменения	23 из 23 самцы	[84]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll		4 : 96	
Модифицированный swim-up метод (добавление ресиквимода)	ПЦР эмбрионов	7,1 : 92,9	[85]

среди которых можно выделить микрофлюидные технологии [70] и метод селекции на колонках из стекловолокна [71], стеклянных гранул или декстранового геля.

Разделение при центрифугировании в градиенте плотности осуществляется наслаиванием спермы на буфер с градиентом концентрации коллоидных частиц (например, Percoll) или какого-либо инертного растворимого вещества (например, сахарозы) в центрифужной пробирке (рис. 1, б). При центрифугировании лейкоциты, макромолекулы семенной жидко-

сти и нежелательные клеточные включения остаются в верхних слоях, а зрелые сперматозоиды с нормальной морфологией проходят в более плотные слои, причём более подвижные сперматозоиды способны ориентировать головку вдоль действия центрифужной силы и достигать дна пробирки. Существуют модификации метода, позволяющие масштабировать данную процедуру [72].

Метод всплытия или swim-up метод не обязательно включает в себя этап центрифугирования, что, как полагают, позволяет

избежать дополнительного повреждения клеток. Процедура осуществляется наслаиванием на сперму специальной среды, в которую в течение определённого времени (до 60 мин) выходят морфологически нормальные активно-подвижные сперматозоиды (рис. 1, а). Нежелательные клеточные включения в данном случае остаются в нижнем слое пробирки. Оптимизация времени процедуры и масштабирование метода возможно с помощью специальных устройств, например, описанных в работе Meitei et al. [73]. Возможны вариации метода, когда осадок сперматозоидов, полученный после центрифугирования в градиенте плотности, инкубируют в среде для всплытия, что позволяет увеличить чистоту и качество отобранной популяции.

В табл. 2 приведены результаты экспериментов, в которых указанными методами предприняты попытки обогатить сперму быков X- или Y-сперматозоидами. В таблице отдельно отмечены методы оценки результата отбора.

Центрифугирование в градиенте плотности увеличивает процент активно-подвижных сперматозоидов в образце, а также позволяет отобрать морфологически нормальные сперматозоиды, не повреждая геномную ДНК. Swim-up метод даёт более низкий выход, но считается более мягким методом обогащения. Указанные факторы делают эти методы привлекательными для сексирования, однако маленький размер выборки в приведённых в табл. 2 статьях, а также противоречивость некоторых данных в настоящий момент позволяет давать лишь очень осторожный прогноз для применения данных методов. Стоит также обратить внимание, что, помимо невысоких уровней обогащения образцов сперматозоидами, несущими определённую половую хромосому, некоторые авторы отмечают, что результаты обогащения сильно зависят от исходного образца.

Революционной для данной области выглядит технология, использующая разницу в количестве молекул рецептора TLR8 на поверхности X- или Y-сперматозоидов [85]. Было показано, что при добавлении его лиганда ресиквимода клетки, несущие X-хромосому, теряют подвижность, так как имеют значимо больше таких рецепторов на поверхности. Это позволяет отбирать обогащённую Y-сперматозоидами фракцию и после отмывки от лиганда проводить оплодотворение полученным образцом (рис. 1, в). Подвижность оставшейся в пробирке фракции, обогащённой X-сперматозоидами, также позволяет использовать

её для оплодотворения *in vitro*. Помимо мышей и быков, такая процедура описана для спермы козла, что может говорить об универсальном механизме регуляции подвижности через TLR8 [86]. Наличие переключателя, специфически снижающего активность жгутика сперматозоида с определённой половой хромосомой, может подарить второе дыхание классическим методам отбора, основанным на подвижности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За долгую историю разработки методов, основанных на разделении сперматозоидов по подвижности, так и не удалось получить надёжный протокол, дающий значительное обогащение образца клетками с определённой половой хромосомой. Это означает, что использование сексированной спермы в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий человека вряд ли возможно. При этом в животноводстве применение сексированной спермы также оправдано лишь при достижении определённого уровня обогащения.

Новые данные по дифференциальной протеомике X- и Y-сперматозоидов позволяют прогнозировать, что через избирательное влияние на подвижность этих клеток можно добиться значительного изменения соотношения X- и Y-сперматозоидов в процессированном образце, что может внести свой вклад в эффективность животноводства. Нельзя исключать, что успехи в разделении X- и Y-сперматозоидов позволят применять этот подход и в медицине как альтернативу преимплантационному тестированию в тех случаях, когда необходимо избежать генетических заболеваний, сцепленных с полом.

Вклад авторов. Д.В. Поздышев, В.И. Муронец – концепция и руководство работой; Д.В. Поздышев, В.И. Муронец – написание текста; Н.А. Комбарова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-80009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morrell, J. M. (2011) *Artificial Insemination: Current and Future Trends* (Manafi, M., ed) InTechOpen, London, doi: 10.5772/17943.
2. Johnson, L. A., Welch, G. R., and Rens, W. (1999) The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI, *J. Anim. Sci.*, **77**, 213-220, doi: 10.2527/1999.77suppl_2213x.
3. Reese, S., Pirez, M. C., Steele, H., and Kölle, S. (2021) The reproductive success of bovine sperm after sex-sorting: a meta-analysis, *Sci. Rep.*, **11**, 17366, doi: 10.1038/s41598-021-96834-2.
4. Seidel, G. E., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D., and Cran, D. G. (1999) Insemination of heifers with sexed sperm, *Theriogenology*, **52**, 1407-1420, doi: 10.1016/s0093-691x(99)00226-5.
5. Vishwanath, R., and Moreno, J. F. (2018) Review: Semen sexing - current state of the art with emphasis on bovine species, *Animal*, **12**, s85-s96, doi: 10.1017/S1751731118000496.
6. Gu, N.-H., Zhao, W.-L., Wang, G.-S., and Sun, F. (2019) Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **17**, 66, doi: 10.1186/s12958-019-0510-y.
7. Gervasi, M. G., and Visconti, P. E. (2017) Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation, *Andrology*, **5**, 204-218, doi: 10.1111/andr.12320.
8. Katz, D. F., and Vanagimachi, R. (1980) Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct, *Biol. Reprod.*, **22**, 759-764, doi: 10.1095/biolreprod22.4.759.
9. Achikanu, C., Correia, J., Guidobaldi, H. A., Giojalas, L. C., Barratt, C. L. R., Da Silva, S. M., and Publicover, S. (2019) Continuous behavioural "switching" in human spermatozoa and its regulation by Ca²⁺-mobilising stimuli, *Mol. Hum. Reprod.*, **25**, 423-432, doi: 10.1093/molehr/gaz034.
10. Fraser, L. R. (1977) Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation, *J. Exp. Zool.*, **202**, 439-444, doi: 10.1002/jez.1402020314.
11. Eisenbach, M., and Giojalas, L. C. (2006) Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 276-285, doi: 10.1038/nrm1893.
12. Morisawa, M., and Yoshida, M. (2005) Activation of motility and chemotaxis in the spermatozoa: from invertebrates to humans, *Reprod. Med. Biol.*, **4**, 101-114, doi: 10.1111/j.1447-0578.2005.00099.x.
13. Vyklicka, L., and Lishko, P. V. (2020) Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **63**, 154-161, doi: 10.1016/j.ceb.2020.01.015.
14. Kaupp, U. B., and Strünker, T. (2017) Signaling in sperm: more different than similar, *Trends Cell Biol.*, **27**, 101-109, doi: 10.1016/j.tcb.2016.10.002.
15. Marquez, B., and Suarez, S. S. (2004) Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation, *Biol. Reprod.*, **70**, 1626-1633, doi: 10.1095/biolreprod.103.026476.
16. Rudneva, S. A., and Chernykh, V. B. (2018) A mechanism of sperm cilia beating, *Androl. Genital Surg.*, **19**, 15-26, doi: 10.17650/2070-9781-2018-19-3-15-26.
17. Miki, K. (2007) Energy metabolism and sperm function, *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, **65**, 309-325.
18. Mukai, C., and Okuno, M. (2004) Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement, *Biol. Reprod.*, **71**, 540-547, doi: 10.1095/biolreprod.103.026054.
19. Muronetz, V. I., Kuravsky, M. L., Barinova, K. V., and Schmalhausen, E. V. (2015) Sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - an evolutionary acquisition of mammals, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1672-1689, doi: 10.1134/S0006297915130040.
20. Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Mohanty, G., and van der Linde, M. (2015) Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J. Androl.*, **17**, 230-235, doi: 10.4103/1008-682X.135123.
21. Elkina, Y. L., Kuravsky, M. L., El'darov, M. A., Stogov, S. V., Muronetz, V. I., and Schmalhausen, E. V. (2010) Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structural basis for enhanced stability, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 2207-2212, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.09.002.
22. Ford, W. C. (2006) Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum. Reprod. Update*, **12**, 269-274, doi: 10.1093/humupd/dmi053.
23. King, W. A., Yadav, B. R., Xu, K. P., Picard, L., Sirard, M. A., Verini Supplizi, A., et al. (1991) The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro, *Theriogenology*, **36**, 779-788, doi: 10.1016/0093-691x(91)90343-c.
24. Machado, G. M., Ferreira, A. R., Guardieiro, M. M., Bastos, M. R., Carvalho, J. O., Lucci, C. M., et al. (2013) Morphology, sex ratio and gene expression of Day 14 in vivo and in vitro bovine embryos, *Reprod. Fertil. Dev.*, **25**, 600, doi: 10.1071/RD11282.
25. Abecia, J.-A., Arrébola, F., and Palacios, C. (2017) Offspring sex ratio in sheep, cattle, goats and pigs: influence of season and lunar phase at conception, *Biol. Rhythm Res.*, **48**, 417-424, doi: 10.1080/09291016.2016.1268325.
26. Ellis, P. J. I., Yu, Y., and Zhang, S. (2011) Transcriptional dynamics of the sex chromosomes and the search for offspring sex-specific antigens in sperm, *Reproduction*, **142**, 609-619, doi: 10.1530/REP-11-0228.

27. Turner, J. M. A., Mahadevaiah, S. K., Ellis, P. J. I., Mitchell, M. J., and Burgoyne, P. S. (2006) Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids, *Dev. Cell*, **10**, 521-529, doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.009.
28. Ventelä, S., Toppari, J., and Parvinen, M. (2003) Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2768-2780, doi: 10.1091/mbc.e02-10-0647.
29. Bhutani, K., Stansifer, K., Ticaou, S., Bojic, L., Villani, A.-C., Slisz, J., et al. (2021) Widespread haploid-biased gene expression enables sperm-level natural selection, *Science*, **371**, eabb1723, doi: 10.1126/science.abb1723.
30. Chen, X., Yue, Y., He, Y., Zhu, H., Hao, H., Zhao, X., et al. (2014) Identification and characterization of genes differentially expressed in X and Y sperm using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray, *Mol. Reprod. Dev.*, **81**, 908-917, doi: 10.1002/mrd.22386.
31. Zhou, H., Liu, J., Sun, W., Ding, R., Li, X., Shanguan, A., et al. (2020) Differences in small noncoding RNAs profile between bull X and Y sperm, *PeerJ*, **8**, e9822, doi: 10.7717/peerj.9822.
32. Chen, X., Zhu, H., Wu, C., Han, W., Hao, H., Zhao, X., et al. (2012) Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa, *J. Proteomics*, **77**, 59-67, doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.004.
33. De Canio, M., Soggiu, A., Piras, C., Bonizzi, L., Galli, A., Urbani, A., et al. (2014) Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation, *Mol. Biosyst.*, **10**, 1264-1271, doi: 10.1039/c3mb70306a.
34. Scott, C., de Souza, F. F., Aristizabal, V. H. V., Hethrington, L., Krisp, C., Molloy, M., et al. (2018) Proteomic profile of sex-sorted bull sperm evaluated by SWATH-MS analysis, *Anim. Reprod. Sci.*, **198**, 121-128, doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.09.010.
35. Sang, L., Yang, W. C., Han, L., Liang, A. X., Hua, G. H., Xiong, J. J., et al. (2011) An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm, *J. Dairy Sci.*, **94**, 2060-2070, doi: 10.3168/jds.2010-3350.
36. Shen, D., Zhou, C., Cao, M., Cai, W., Yin, H., Jiang, L., et al. (2021) Differential membrane protein profile in bovine X- and Y-Sperm, *J. Proteome Res.*, **20**, 3031-3042, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00358.
37. Umehara, T., Tsujita, N., and Shimada, M. (2019) Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm, *PLoS Biol.*, **17**, e3000398, doi: 10.1371/journal.pbio.3000398.
38. Laxmivandana, R., Patole, C., Sharma, T. R., Sharma, K. K., and Naskar, S. (2021) Differential proteins associated with plasma membrane in X- and/or Y-chromosome bearing spermatozoa in indicus cattle, *Reprod. Dom. Anim.*, **56**, 928-935, doi: 10.1111/rda.13936.
39. Thaworn, W., Hongsibsong, S., Thongkham, M., Mekchay, S., Pattanawong, W., and Sringarm, K. (2022) Production of single-chain fragment variable (scFv) antibodies specific to plasma membrane epitopes on bull Y-bearing sperm, *Anim. Biotechnol.*, **33**, 508-518, doi: 10.1080/10495398.2020.1811294.
40. Soleymani, B., Parvaneh, S., and Mostafaei, A. (2019) Goat polyclonal antibody against the sex determining region Y to separate X- and Y-chromosome bearing spermatozoa, *Rep. Biochem. Mol. Biol.*, **8**, 326-334.
41. Sharma, V., Verma, A. K., Sharma, P., Pandey, D., and Sharma, M. (2022) Differential proteomic profile of X- and Y-sorted Sahiwal bull semen, *Res. Vet. Sci.*, **144**, 181-189, doi: 10.1016/j.rvsc.2021.11.013.
42. Zhu, Z., Umehara, T., Okazaki, T., Goto, M., Fujita, Y., Hoque, S. A. M., et al. (2019) Gene Expression and protein synthesis in mitochondria enhance the duration of high-speed linear motility in boar sperm, *Front. Physiol.*, **10**, 252, doi: 10.3389/fphys.2019.00252.
43. Capra, E., Turri, F., Lazzari, B., Cremonesi, P., Gliozzi, T. M., Fojadelli, I., et al. (2017) Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High- and Low-motile sperm populations, *BMC Genomics*, **18**, 14, doi: 10.1186/s12864-016-3394-7.
44. Hendriksen, P. J. M. (1999) Do X and Y spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology*, **52**, 1295-1307, doi: 10.1016/S0093-691X(99)00218-6.
45. Elkina, Y. L., Atroshchenko, M. M., Bragina, E. E., Muronetz, V. I., and Schmalhausen, E. V. (2011) Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases sperm motility, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 268-272, doi: 10.1134/s0006297911020143.
46. Shimada, K., Park, S., Miyata, H., Yu, Z., Morohoshi, A., Oura, S., et al. (2021) ARMC12 regulates spatiotemporal mitochondrial dynamics during spermiogenesis and is required for male fertility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2018355118, doi: 10.1073/pnas.2018355118.
47. Hoppe, P. C., and Koo, G. C. (1984) Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized *in vitro*, *J. Reprod. Immunol.*, **6**, 1-9, doi: 10.1016/0165-0378(84)90036-6.
48. Ren, F., Xi, H., Ren, Y., Li, Y., Wen, F., Xian, M., et al. (2021) TLR7/8 signalling affects X-sperm motility via the GSK3 α/β -hexokinase pathway for the efficient production of sexed dairy goat embryos, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, **12**, 89, doi: 10.1186/s40104-021-00613-y.
49. Hinsch, E., Boehm, J. G., Groeger, S., Mueller-Schloesser, F., and Hinsch, K. D. (2003) Identification

- of cytokeratins in bovine sperm outer dense fibre fractions, *Reprod. Domest. Anim.*, **38**, 155-160, doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00408.x.
50. Feugang, J. M., Rodriguez-Osorio, N., Kaya, A., Wang, H., Page, G., Ostermeier, G. C., et al. (2010) Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility, *Reprod. Biomed. Online*, **21**, 312-324, doi: 10.1016/j.rbmo.2010.06.022.
 51. Hashemitabar, M., Sabbagh, S., Orazizadeh, M., Ghadiri, A., and Bahmanzadeh, M. (2015) A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **32**, 853-863, doi: 10.1007/s10815-015-0465-7.
 52. Rivkin, E., Eddy, E. M., Willis, W. D., Goulding, E. H., Suganuma, R., Yanagimachi, R., et al. (2005) Sperm tail abnormalities in mutant mice with neor gene insertion into an intron of the keratin 9 gene, *Mol. Reprod. Dev.*, **72**, 259-271, doi: 10.1002/mrd.20335.
 53. Sringarm, K., Thongkham, M., Mekchay, S., Lumsangkul, C., Thaworn, W., Pattanawong, W., et al. (2022) High-efficiency bovine sperm sexing used magnetic-activated cell sorting by coupling scFv antibodies specific to Y-chromosome-bearing sperm on magnetic microbeads, *Biology (Basel)*, **11**, 715, doi: 10.3390/biology11050715.
 54. Bucci, D., Galeati, G., Tamanini, C., Vallorani, C., Rodriguez-Gil, J. E., and Spinaci, M. (2012) Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa, *Theriogenology*, **77**, 1206-1216, doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.028.
 55. Mostek, A., Janta, A., and Ciereszko, A. (2020) Proteomic comparison of non-sexed and sexed (X-bearing) cryopreserved bull semen, *Anim. Reprod. Sci.*, **221**, 106552, doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106552.
 56. Garner, D. L., and Seidel Jr., G. E. (2003) Past, present and future perspectives on sexing sperm, *Can. J. Anim. Sci.*, **83**, 375-384, doi: 10.4141/A03-022.
 57. Van Munster, E. B., Stap, J., Hoebe, R. A., te Meerman, G. J., and Aten, J. A. (1999) Difference in volume of X- and Y-chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content, *Cytometry*, **35**, 125-128, doi: 10.1002/(sici)1097-0320(19990201)35:2<125::aid-cyto3>3.0.co;2-h.
 58. Santolaria, P., Pauciuillo, A., Silvestre, M. A., Vicente-Fiel, S., Villanova, L., Pinton, A., et al. (2016) Computer-assisted sperm morphometry fluorescence-based analysis has potential to determine progeny sex, *Asian J. Androl.*, **18**, 858-862, doi: 10.4103/1008-682X.187578.
 59. Révay, T., Nagy, S., Kovács, A., Edvi, M. E., Hidas, A., Rens, W., et al. (2004) Head area measurements of dead, live, X- and Y-bearing bovine spermatozoa, *Reprod. Fertil. Dev.*, **16**, 681-687, doi: 10.1071/rd04013.
 60. Carvalho, J. O., Silva, L. P., Sartori, R., and Dode, M. A. N. (2013) Nanoscale differences in the shape and size of X and Y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscopy, *PLoS One*, **8**, e59387, doi: 10.1371/journal.pone.0059387.
 61. Cui, K. H., and Matthews, C. D. (1993) X larger than Y, *Nature*, **366**, 117-118, doi: 10.1038/366117b0.
 62. Zavaczki, Z., Celik-Ozenci, C., Ovari, L., Jakab, A., Sati, G. L., Ward, D. C., et al. (2006) Dimensional assessment of X-bearing and Y-bearing haploid and disomic human sperm with the use of fluorescence in situ hybridization and objective morphometry, *Fertil. Steril.*, **85**, 121-127, doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.07.1295.
 63. Penfold, L. M., Holt, C., Holt, W. V., Welch, G. R., Cran, D. G., and Johnson, L. A. (1998) Comparative motility of X and Y chromosome-bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting, *Mol. Reprod. Dev.*, **50**, 323-327, doi: 10.1002/(SICI)1098-795(199807)50:3<323::AID-MRD8>3.0.CO;2-L.
 64. Daloglu, M. U., Lin, F., Chong, B., Chien, D., Veli, M., Luo, W., et al. (2018) 3D imaging of sex-sorted bovine spermatozoon locomotion, head spin and flagellum beating, *Sci. Rep.*, **8**, 15650, doi: 10.1038/s41598-018-34040-3.
 65. Carvalho, J. O., Sartori, R., Machado, G. M., Mourão, G. B., and Dode, M. (2010) Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production, *Theriogenology*, **74**, 1521-1530, doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.030.
 66. Holden, S. A., Murphy, C., Moreno, J. F., Butler, S. T., Cromie, A. R., Lonergan, P., et al. (2017) *In vitro* characterisation of fresh and frozen sex-sorted bull spermatozoa, *Reprod. Fertil. Dev.*, **29**, 1415-1425, doi: 10.1071/RD16086.
 67. Park, Y. J., Kwon, K. J., Song, W. H., Pang, W. K., Ryu, D. Y., Saidur Rahman, M., and Pang, M. G. (2021) New technique of sex preselection for increasing female ratio in boar sperm model, *Reprod. Domest. Anim.*, **56**, 333-341, doi: 10.1111/rda.13870.
 68. Dominguez, E. M., Moreno-Irusta, A., Guidobaldi, H. A., Tribulo, H., and Giojalas, L. C. (2018) Improved bovine *in vitro* embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis, *Theriogenology*, **22**, 1-8, doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.08.023.
 69. Ericsson, R. J., Langevin, C. N., and Nishino, M. (1973) Isolation of fractions rich in human Y sperm, *Nature*, **246**, 421-424, doi: 10.1038/246421a0.
 70. Neculai-Valeanu, A.-S., and Ariton, A. M. (2021) Game-changing approaches in sperm sex-sorting: microfluidics and nanotechnology, *Animals*, **11**, 1182, doi: 10.3390/ani11041182.
 71. Arzondo, M. M., Caballero, J. N., Marín-Briggiler, C. I., Dalvit, G., Cetica, P. D., and Vazquez-Levin, M. H. (2012) Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: a rapid and effective method to obtain a high

- percentage of functional sperm, *Theriogenology*, **78**, 201-209, doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.001.
72. Thys, M., Vandaele, L., Morrell, J., Mestach, J., Van Soom, A., Hoogewijs, M., et al. (2009) *In vitro* fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by Single-layer (Glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation, *Reprod. Domest. Anim.*, **44**, 390-394, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01081.x.
 73. Meitei, H. Y., Uppangala, S., Sharan, K., Chandraguthi, S. G., Radhakrishnan, A., Kalthur, G., et al. (2021) A simple, centrifugation-free, sperm-sorting device eliminates the risks of centrifugation in the swim-up method while maintaining functional competence and DNA integrity of selected spermatozoa, *Reprod. Sci.*, **28**, 134-143, doi: 10.1007/s43032-020-00269-5.
 74. Azizzeddin, A., Ashkar, F., King, W., and Revay, T. (2014) Enrichment of Y-chromosome-bearing bull spermatozoa by swim-up through a column, *Reprod. Dom. Anim.*, **49**, 1-4, doi: 10.1111/rda.12252.
 75. Promthep, K., Satitmanwiwat, S., Kitiyanant, N., Tantiwattanakul, P., Jirajaroenrat, K., Sitthigripong, R., et al. (2016) Practical use of percoll density gradient centrifugation on sperm sex determination in commercial dairy farm in Thailand, *IJAR*, **50**, 310-313, doi: 10.18805/ijar.8427.
 76. Bhat, Y., and Sharma, M. (2020) X-sperm enrichment of bovine semen by Percoll density gradient method and its effect on semen quality, sex ratio and conception rate, *IJAR*, **54**, 1181-1187.
 77. Lucio, A. C., Resende, M. V., Dernowseck-Meirelles, J. A., Perini, A. P., Oliveira, L. Z., Miguel, M. C. V., et al. (2012) Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **64**, 525-532, doi: 10.1590/S0102-09352012000300001.
 78. Kobayashi, J., Oguro, H., Uchida, H., Kohsaka, T., Sasada, H., and Sato, E. (2004) Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence *in situ* hybridization, *J. Reprod. Dev.*, **50**, 463-469, doi: 10.1262/jrd.50.463.
 79. Machado, G. M., Carvalho, J. O., Filho, E. S., Caixeta, E. S., Franco, M. M., Rumpf, R., et al. (2009) Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos, *Theriogenology*, **71**, 1289-1297, doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.01.002.
 80. Wolf, C. A., Brass, K., Rubin, M. I. B., Pozzobon, S. E., Mozzaquatro, F., and De la Côte, F. D. (2008) The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos, *Anim. Reprod.*, **5**, 110-115.
 81. Madrid-Bury, N., Fernández, R., Jiménez, A., Pérez-Garnelo, S., Nuno Moreira, P., Pintado, B., et al. (2003) Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio, *Zygote*, **11**, 229-235, doi: 10.1017/S0967199403002272.
 82. Resende, M. V., Lucio, A. C., Perini, A. P., Oliveira, L. Z., Almeida, A. O., Alves, B. C. A., et al. (2011) Comparative validation using quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR of bovine semen centrifuged in continuous density gradient, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **63**, 544-551, doi: 10.1590/S0102-09352011000300002.
 83. Asma-ul-Husna, Awan, M. A., Mehmood, A., Sultana, T., Shahzad, Q., Ansari, M. S., et al. (2017) Sperm sexing in Nili-Ravi buffalo through modified swim up: Validation using SYBR green real-time PCR, *Anim. Reprod. Sci.*, **182**, 69-76, doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.04.011.
 84. Meles, D. K., Mustofa, I., Hariadi, M., Wurlina, W., Susilowati, S., Amaliya, A., et al. (2022) The enriched Y-bearing sperm combined with delayed fixed-time artificial insemination for obtaining male Simmental crossbred offspring, *Vet. World*, **15**, 102-109, doi: 10.14202/vetworld.2022.102-109.
 85. Umehara, T., Tsujita, N., Zhu, Z., Ikedo, M., and Shimada, M. (2020) A simple sperm-sexing method that activates TLR7/8 on X sperm for the efficient production of sexed mouse or cattle embryos, *Nat. Protoc.*, **15**, 2645-2667, doi: 10.1038/s41596-020-0348-y.
 86. Huang, M., Cao, X. Y., He, Q. F., Yang, H. W., Chen, Y. Z., Zhao, J. L., et al. (2022) Alkaline semen diluent combined with R848 for separation and enrichment of dairy goat X-sperm, *J. Dairy Sci.*, **105**, 10020-10032, doi: 10.3168/jds.2022-22115.

BIOCHEMICAL FEATURES OF X OR Y CHROMOSOME BEARING SPERMATOZOA FOR SPERM SEXING

Review

D. V. Pozdyshev^{1*}, N. A. Kombarova², and V. I. Muronetz^{1,3}

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: denispoz@gmail.com*

² *Head Center for Reproduction of Agricultural Animals,
142143 Bykovo, Moscow Region, Russia*

³ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

This review presents information on the biochemical features of spermatozoa bearing an X or Y chromosome, enabling to obtain a sperm fraction with a pre-defined sex chromosome. Almost the only technology currently used for such separation (called sexing) is based on sperm fluorescence-activated cell sorting in regard to DNA content. Besides its applications, this technology made it possible to analyze the properties of isolated populations of spermatozoa bearing an X or Y chromosome. In recent years, a number of works have appeared proving the existence of differences between these populations at the transcriptome and proteome level. It is noteworthy that these differences are primarily related to energy metabolism and structural proteins of the flagellum. New methods of sperm enrichment with X or Y chromosome cells are based on the differences in motility between spermatozoa with different sex chromosomes. Sperm sexing is a widespread part of the protocol of artificial insemination of cows with cryopreserved semen, it allows to increase the proportion of offspring of the required sex. In addition, advances in the separation of X and Y spermatozoa may allow this approach to be applied in clinical practice to avoid sex-linked diseases.

Keywords: X/Y spermatozoa, sperm motility, sexing