

ОСОБЛИВОСТІ ПІДГОТОВКИ
ЗАМОРОЖЕНО-ВІДТАЛИХ СПЕРМІЙ
БАРАНІВ ДО ІНСЕМІНАЦІЇ ООЦІТІВ *IN VITRO*

Методика одержання ембріонів поза організмом складається з кількох етапів, одним з яких є підготовка спермій. Ця процедура повинна сприяти капацітації спермій, тобто наданню їм здатності проникнути в ооцит, а також відокремленню рухливих спермій від супутньої позаклітинної рідини, зокрема, середовища для кріоконсервації, наявність компонентів якого у середовищі дорошування може пригнітити розвиток зигот. Для виконання першої умови спермії культивують у розчині з високою іонною силою або з додаванням гепарину, для виконання другої — промивають декілька разів центрифугуванням.

В останні роки все більше застосовується спосіб відокремлення спермій баранів у середовищі Перколла, але такий спосіб дещо трудомісткий і крім того вимагає наявності важкодоступних чистих реактивів. У дослідах опрацьовували спермії за методом "swim-up", поширенним при підготовці зародкових клітин бугаїв. Використовували сперму заморожену в тріс-гліцерин-жовтковому середовищі за методом відкритих гранул. У ході проведення дослідів встановлено, що центрифугування спермій при 500 обертах приводить до залишення основної фракції рухливих клітин у надосадовій рідині. Збільшення обертів до 2000 сприяло осадженню спермій, але вони були майже повністю непридатні до використання через склеювання клітин, при цьому утворювались великі конгломерати. Таке явище спостерігали при використанні для промивання різних типів середовищ (цитрату натрію, фосфатного

© І.В. Лобачова, 2001

буферу Дюльбекко, середовищ TC-199 або SOF). Причина цього криється, на нашу думку, у великій чутливості і ламкості мембрани акросомних чохликів сперміїв баранів.

Придатною для одержання фракції рухливих сперміїв баранів виявилася одноетапна процедура "swim-up", за якою гранулу сперми розморожують зануренням безпосередньо у 1,5 мл середовища капацітації і далі витримують 5—8 хв. у водяній бані при 37—38 °C. За цей час тріс-гліцерин-жовткове середовище розтікається по донцю пробірки, не змішуючись з поверхневим шаром середовища інсемінації, а спермії поширюються по усьому об'єму рідини. Як середовище капацітації використовували середовище TC-199 або SOF, до яких додавали 2% фетальної або естральної сироватки. Підвищення відсотку вмісту сироватки небажано, оскільки це сприятиме збільшенню ступеню аглютинації сперміїв і зменшенню кількості рухливих клітин. Підготовлену таким чином сперму вносили у середовище інсемінації ооцитів овець у необхідній концентрації.

Використання такого способу підготовки сперміїв сприяло заплідненню 60—80 % яйцеклітин, що підтверджено наявністю пронуклеусів у зиготах та інтерфазних ядер в одержаних зародках. Недоліком зазначеного способу є деяка імовірність бактеріальної контамінації середовища, що вимагає акуратності при розморожуванні і більшої ретельності додержання правил асептики при кріоконсервації сперми баранів-плідників.

Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф.Іванова "Асканія-Нова"

— Національний селекційно-генетичний центр з вівчарства УААН