

ОСОБЛИВОСТІ ПІДГОТОВКИ ЗАМОРОЖЕНО-ВІДТАЛИХ СПЕРМІЇВ БАРАНІВ ДО ІНСЕМІНАЦІЇ ООЦИТІВ *IN VITRO*

Методика одержання ембріонів поза організмом складається з кількох етапів, одним з яких є підготовка спермійів. Ця процедура повинна сприяти капацитації спермійів, тобто наданню їм здатності проникнути в ооцит, а також відокремленню рухливих спермійів від супутньої позаклітинної рідини, зокрема, середовища для кріоконсервації, наявність компонентів якого у середовищі дорощування 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 спермійів баранів у середовищі Перколла, але такий спосіб дещо трудомісткий і крім того вимагає наявності важкодоступних чистих реактивів. У досліджах опрацьовували спермії за методом "swim-up", поширеним при підготовці запліджуваних клітин бугаїв. Використовували сперму заморожену в тріс-гліцерин-жовтковому середовищі за методом відкритих гранул. У ході проведення дослідів встановлено, що центрифугування спермійів при 500 обертах приводить до залишення основної фракції рухливих клітин у надосадовій рідині. Збільшення обертів до 2000 сприяло осадженню спермійів, 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 мембран акросомних чоликів 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 капацитації і далі витримують 5—8 хв. у водній бані при 37—38 °С. 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 капацитації 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*