

ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЙ СТРЕСС КЛЕТОК ПРИ СЕКСИНГЕ СПЕРМЫ

А. Б. Сушко, О. А. Чернецов
Институт животноводства НААН

Современные проточные флуорометрические сортеры позволяют разделять сперму с.-х. животных на X- и Y-фракции с точностью до 97 % для последующего получения потомства определенного пола. Спермии, несущие X-хромосому, например, у жеребца содержат ДНК на 3,7 % больше, чем Y-спермии, что позволяет получать сексированную сперму. На первом этапе сексирования спермии окрашивают витальным флуоресцентным ДНК-красителем Hoechst 33342, при этом количество красителя, связанного с ДНК спермия должно достичь эквимольного соотношения с этой ДНК. Затем по силе свечения красителя Hoechst 33342 детектор сортера определяет наличие в спермии X или Y хромосомы со скоростью 12...15 млн клеток в час. Стандартный метод окрашивания спермы для сексинга при 35°C длится 40–60 минут. При этом желточные разбавители не используются, так как препятствуют окрашиванию. Далее, перед заправкой сортера сперма разбавляется в соотношении 1:1 средой с 2 % желтка. Таким образом, конечная концентрация желтка в момент сортировки недостаточна для усиления (фортификации) плазматических мембран спермиев фосфолипидами и липопротеинами желтка. В результате сперма в полной мере незащищена от гидродинамического удара, который происходит при последующем сортировке.

Поэтому в настоящее время изучаются факторы, влияющие на мембрану и клеточные органеллы спермиев при сортировке. На сперме жеребца и быка было показано, что снижение давления при сортировке с 3,5 атм. до 2,8 атм. улучшает качество сексированной спермы, незначительно снижая скорость сортировки.

В работе итальянских исследователей также была проверена сперма жеребцов после сортировки. Авторы заключают, что несмотря на сокращение подвижности спермы, сортировка не вредила жизнеспособности и митохондриальной деятельности, измеренной у свежееоттаянной спермы жеребца; кроме того, сексированная сперма сохраняла способность оплодотворять *in vivo*. Спермодозами по 5 млн сексированных спермиев было осеменено 2 из 4 кобыл.

Однако стандартный метод окрашивания спермы красителем Hoechst 33342 проходит в среде Z-fluid, содержащей 0,3 % BSA без фосфолипидов и липопротеинов, что по нашему мнению недостаточно для фортификации мембран.

Целью настоящей работы было исследование влияния сексинга спермы жеребца и последующей криоконсервации на мембранную проницаемость спермиев.

Работа была проведена на сперме жеребца в Институте Зоотехники (Балице, Польша). Сперму получали на изотермическую вагину конструкции Института животноводства НААН.

В опыте перед сортировкой сперму окрашивали красителем Hoechst 33342 по методу Л. Джонсон и др. с изменениями согласно новому методу XY Inc. При этом концентрация маточного раствора красителя Hoechst 33342 оставалась как в работе, но прибавляли краситель в количестве 15 мкл на 200 млн. спермиев в 1 мл раствора Z-fluid при pH 7,45 и осмотическом давлении 300 +/-5 мОсм. Окрашивание длилось 40 минут при 35°C. После окрашивания сперму дополнительно разбавляли средой Z-fluid, содержащей 2 % желтка до концентрации 100 млн. сперматозоидов в 1 мл. Сепарацию на X-,Y-фракции окрашенной спермы проводили на проточном сортере цитофлуорометре MoFlo SX (Dako Cytomation). В контроле окрашивание спермы красителем Hoechst 33342 и сепарацию на X-,Y-фракции не проводили.

Криоконсервирование спермы в контроле и опыте проводилось в устройстве „Криотроп”, разработанном нами. В “Криотропе” реализовывали двухскоростной режим охлаждения спермы (от 0°C до минус 10°C со скоростью 15–16°C/мин; от минус 10°C до минус 80°C со скоростью 111–115°C/мин с использованием пайет). Сперму замораживали после процедуры отмывания от секретов добавочных половых желез (геля) и отделения плазмы путем центрифугирования при $g=800$, после разбавления и доведения концентрации до 100 млн спермиев/мл. Разбавление и замораживание сексированной спермы проводили с использованием среды SMEY с добавлением 2 % глицерина.

Перед замораживанием сексированной спермы была изучена эффективность разных базовых буферных сред для криоконсервирования спермы жеребца: среда SMEY с добавлением 2 % глицерина по рецепту; среда КМТ – комбинация сред Кеннея (Kenney) и Тироде (Tyrode) (в соотношении 65 % и 35 %) с добавлением 2 % глицерина по рецепту и среда ЛХЦЖ (лактозо-хелато-цитратно-желточная для хранения спермы жеребцов, ГОСТ 24163-80) с добавлением 3,5 % глицерина. Среды отличались по составу сахаров, солей и природных антишоковых компонентов.

Степень повреждения мембран спермиев измеряли на цитометре Dako Galaxy по окрашиванию пропидиумом йодидом и красителем SYBR-14 (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Molecular Probes, Inc.). Длина волны света возбуждения флуоресценции 488 нм. В каждом измерении анализировали 25 тысяч спермиев. Результаты измерений фиксировали и обрабатывали с использованием компьютерных программ Flomax (Partex) и Summit (Cytomation).

Среди испытанных сред-разбавителей наибольшую криопротекторную эффективность показал SMEY. Принципиальные различия состава трех наиболее распространенных сред состоят в следующем: SMEY, в

отличии от двух других сред, имела в своем составе: два антишоковых компонента – обезжиренное молоко и желток куриного яйца; комплекс моно-, ди-, три-сахаров (глюкозу, лактозу, рафинозу); два цитратных буфера – соли лимонной кислоты натрия и калия. КМТ содержала только молоко, в качестве компонента, защищающего от температурного шока, ряд солей (хлориды, фосфаты) и только один сахар (глюкозу). Среда ЛХЦЖ содержала только желток в качестве протектора, предупреждающего температурный шок, один сахар (лактозу), только один цитратный буфер (натрий лимоннокислый). Учитывая, что во всех трех средах использовался традиционный криопротектор – глицерин, можно предположить, что различный качественный уровень спермы после замораживания-оттаивания объясняется более комплексной рецептурой, характерной для SMEY.

Данные проведенных исследований свидетельствуют о том, что при сексинге спермы жеребца, с целью уменьшения повреждения мембран спермиев, необходимы дальнейшие модификации процесса сортировки клеток и разработка новых сред-разбавителей. Подобные работы были проведены нами на сперме быка.

УДК 636.4.082

ОЦІНКА КНУРІВ СПЕЦІАЛІЗОВАНИХ ГЕНОТИПІВ ЗА БІОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ КРОВІ ТА ЯКІСТЮ СПЕРМОПРОДУКЦІЇ

***С. Л. Войтенко, Б. С. Шаферівський
Полтавська державна аграрна академія***

Виробництво свинини на даному етапі здійснюється переважно в умовах великих промислових господарств, де всі технологічні процеси підпорядковані одержанню високої рентабельності за мінімальних витрат праці. Найбільш обґрунтованим, з економічної точки зору, методом розведення свиней в умовах промислових підприємств є гібридизація, кінцева продукція якої характеризується високим виходом м'яса в туші та низькими затратами на виробництво продукції. Встановлено, що найкращі результати одержують при використанні як батьківських форм кнурів порід п'єтрен, ландрас, дюрк або термінальних тварин, гібридні варіанти яких найчастіше відселекціоновані за м'ясними ознаками. Проте використання кнурів спеціалізованих генотипів в умовах промислових господарств за відсутності активного моціону практично завжди призводить до вибракування тварин у віці півтора-два роки і завезення нових плідників. З одного боку, такий підхід до відтворення стада на промислових комплексах виправданий можливістю одержання постійного гетерозису, а значить і високої продуктивності відгодівельного молодняка. З іншого боку, потрібно