ПЕРЕЖИВАЕМОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В СРЕДАХ, РАЗРАБОТАННЫХ ДЛЯ ГАМЕТ ЧЕЛОВЕКА

Докладчик – Сметанина Ирина Геннадьевна к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточной и генной инженерии

ВНИИФБиП – филиал ВИЖ им. Л.К.Эрнста

Быково - 2020

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучалась переживаемость сперматозоидов крупного рогатого скота in vitro в коммерческих средах, разработанных для гамет человека. Использовали среды фирм “Global” (США), “Sage” (США), “Gynemed” (Germany), предназначенных для манипуляций со спермой человека на воздухе. В качестве критерия для оценки жизнеспособности использовали процент свободноподвижных сперматозоидов (с учетом степени подвижности) через 0, 3, 6 и 22 часа инкубации. Лучшие результаты были получены при использовании среды Quinn’s Sperm Washing Medium фирмы “Sage” (США). До 50% гамет сохраняло подвижность в свободном состоянии после 22 часов культивирования.

Обоснование исследований

- **В течение последних лет нашей исследовательской группой изучалась возможность использования ряда коммерческих сред и их составляющих, разработанных для гамет и эмбрионов человека, в экспериментах по in vitro созреванию, оплодотворению и культивированию эмбрионов крупного рогатого скота (КРС) и свиней (Сметанина и др., 2018, 2019, 2020). По нашему мнению это представляет интерес как с практической, так и с научной точек зрения. Известно, что данные коммерческие среды проходят предварительное тестирование на мышиных эмбрионах. Однако, нам представляется возможным и информативным проводить этап тестирования и на гаметах других видов млекопитающих, например, КРС или свиней. С научной точки зрения подобное "межвидовое" использование сред позволит лучше изучить метаболические потребности гамет различных видов млекопитающих in vitro. Вместе с тем, до сих пор среды для культивирования гамет и эмбрионов КРС готовятся индивидуально в каждой лаборатории "вручную", что существенно снижает воспроизводимость методик и экспериментальных данных. Использование готовых коммерческих сред позволило бы существенно снизить отрицательное влияние этого фактора. Следует отметить, что отечественные среды для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) на сельскохозяйственных животных до сих пор отсутствуют.**

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- **В серии экспериментов было использовано замороженное семя быка “Мангуст” в гранулах. 100 мкл размороженного семени ставили на флотацию (swim up) в пробирку с 1.5 мл среды при 38.5ºС на 1.5 часа. Использовали следующие среды, разработанные для работы со сперматозоидами человека на воздухе: 1) All Grad Wash (“Global”, США); 2) Quinn’s Sperm Washing Medium (“Sage”, США); 3) GM 501 Air (“Gynemed”, Германия). Сперму дважды центрифугировали при 2 тыс./об. в течение 10 минут. Подсчитывали концентрацию в образовавшемся осадке для каждого из трех вариантов. Из сконцентрированных осадков сперму добавляли в лунки с 500 мкл соответствующей среды с таким расчетом, чтобы итоговая концентрация была одинакова во всех трех вариантах и составляла 0.2 млн/мл. Сперму культивировали при 38.5ºС в термостате на воздухе. Жизнеспособность сперматозоидов оценивали через 0, 2, 6 и 22 часов инкубации под инвертированным микроскопом “Wild” (Швейцария) при увеличении х320. Степень подвижности оценивалась как: А – движения в основном поступательные; В – часть поступательные, часть манежные; С – движения в основном колебательные; Д - подвижность отсутствует.**

Результаты

- **Было проведено три эксперимента. СредуGM 501 Air (“Gynemed”) во втором эксперименте не использовали. При этом учитывали одновременно как процент свободно подвижных сперматозоидов, так и степень их подвижности. В начале экспериментов сперма была высокоактивна во всех средах, при этом агглютинация была минимальной. Поскольку все среды содержали белок, через 3 часа инкубации помимо свободноподвижных сперматозоидов, в каждой группе в результате агглютинации появлялись заметные конгломераты, в которых активность спермиев сохранялась даже на более высоком уровне вплоть до 22 часов. Отметим, что после 6 часов инкубации активность спермы несколько повышалась в результате гиперактивации. Через 22 часа культивирования до 50 % свободноподвижных сперматозоидов сохранялось только в среде фирмы “Sage”, в то время как в других средах свободноподвижные сперматозоиды не наблюдались. Таким образом, среди изученных сред, разработанных для манипуляций со спермой человека, среда фирмы “Sage” оказалась наиболее эффективной для культивирования in vitro сперматозоидов КРС.**

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Работа выполнена при поддержке ГЗ АААА-А18-118021590132 -9 (0445-2020-0030): ”Исследование молекулярно-биологических и физиолого-эмбриологических аспектов биоинженерных технологий для совершенствования генетических ресурсов и создания новых селекционных форм сельскохозяйственных животных и птицы”.