

УДК 636:57.08:591:463.1

ВПЛИВ ДЕЯКИХ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ФАКТОРІВ ТРАНСФЕКЦІЇ СПЕРМІЇВ НА ЇХ МОРФО- ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН

М.Є. Сербін, О.В. Щербак
Інститут тваринництва УААН

У роботі було проведено вивчення впливу 3% ДМСО та різних концентрацій CO₂, які використовуються у технології трансфекції, на морфо-функціональний стан спермій.

технологічні фактори, трансфекція, спермії, інкубування, морфо- функціональний стан

На сучасному етапі у тваринництві усе більш інтенсивно впроваджуються розробки в області генної інженерії як одного з найефективніших методів біотехнології. Досягнення в області конструювання та клонування рекомбінантних ДНК із наступною інтеграцією їх у геном тварин, тобто технологія трансгенезу, відкрили принципово нові можливості спрямованої генетичної мінливості.

Однак при цьому, у наслідок великої економічної витратності процесу трансгенезу, на сьогоднішній день стає дуже актуальним питання підвищення ефективності даного методу.

Одним з перспективних напрямів, що дає змогу значно інтенсифікувати технологію трансгенезу, є метод трансфекції генів опосередкованої сперміями (sperm-mediated gene transfer, SMGT).

Привабливість методу зумовлюється його неінвазивністю (у порівнянні з використанням ретровірусних векторів) і відсутністю складних маніпуляцій з великою кількістю яйцеклітин (у порівнянні з методом мікроін'єкції ДНК у чоловічий пронуклеус).

Для ефективного здійснення технології SMGT необхідно оптимізувати процес вилучення рухливої фракції спермій та її інкубування (2 години, при 37°C), тому що технологічні фактори та стрес при інкубуванні *in vitro* можуть значно впливати на загальну ефективність трансгенезу.

Для підвищення частоти внесення ДНК до клітин найбільш ефективним прийомом є використання диметилсульфоксиду (ДМСО) [1-2]. Але за літературними даними ступінь токсичної дії цього препарату на рухливу фракцію спермій миші вивчена недостатньо [1, 3].

Метою цієї роботи було вивчення впливу 3% ДМСО та різних концентрацій CO₂, що застосовуються у технології трансфекції, на морфо-функціональний стан спермій.

Методика досліджень. У даній роботі були використані самці

мишей лінії СВА.

Гамети одержували хірургічним шляхом із придатків сім'яників (епідидимальні спермії). Після цього виділяли рухливу фракцію гамет методом флотації («swim up») [4].

Інкубування спермій проводили за методикою запропонованою у роботі Баранова із співавтор. [1]: безпосередньо до проби додавали ДМСО до 3% та інкубували 2 години при температурі 37°C. Контролем були спермії, що інкубували за тих же самих умов, але без додавання ДМСО.

У другій серії дослідів інкубування спермій (2 години при 37°C) проводили за методикою запропонованою Вудом із співавтор. [5]: у атмосфері з 5% CO₂. У якості контролю використовували результати інкубування при звичайній концентрації CO₂ у атмосфері (0,03%), як було запропоновано у роботі Баранова із співавторами.

Після процесу інкубування як у дослідах, так і у контролях проводилась оцінка морфо-функціонального стану спермій за показниками рухливості та ступеня збереженості акросом. Отримані результати обробляли статистично за методом Стюдента.

Результати досліджень. Результати досліджень впливу технологічної концентрації ДМСО (3%) на морфо-функціональний стан сперматозоїдів наведені у табл.1.

1. Вплив ДМСО на морфо-функціональний стан сперматозоїдів

Без ДМСО (контроль)		З додаванням ДМСО	
рухливість, %	клітини із ушкодженою акросомою, %	рухливість, %	клітини із ушкодженою акросомою, %
21 ± 2,8	4,5 ± 0,7	20,5 ± 0,7	4 ± 1,4

Відповідно до цих даних можна зробити висновок, що вплив ДМСО не викликав достовірної зміни показників, що досліджувались.

Однак рухливість сперматозоїдів як у контролі, так і у досліді була не високою (21 ± 2,8 та 20,5 ± 0,7 %). Цей факт дає можливість припустити, що її запліднювальча здатність також буде низькою [6], а це, безсумнівно, вплине на ефективність процесу трансфекції.

Така низька рухливість може бути викликана вищезазначеними умовами інкубування.

Аналіз літературних даних показує на недостатню вивченість ролі концентрації CO₂ при інкубуванні сперматозоїдів безпосередньо в ході технологічного процесу трансфекції. Пропонуються як методи інкубування у атмосфері з 5% CO₂ (методика Вуда із співавтор.), так і методи з використанням звичайної концентрації CO₂ у атмосфері (методика Баранова із співавтор.).

Результати досліджень впливу різних концентрацій CO₂ при інкубуванні спермій на їх морфо-функціональний стан представлені в табл.2. Дослідження показали велику ефективність методу, де

використовувалася концентрація 5% CO₂ у атмосфері.

2. Вплив на морфо-функціональний стан спермій різних концентрацій CO₂ при інкубуванні *in vitro*

Звичайна концентрація CO ₂ у атмосфері		Концентрація CO ₂ становила 5%	
рухливість, %	клітини із ушкодженою акросомою, %	рухливість, %	клітини із ушкодженою акросомою, %
19,5 ± 1,1	3 ± 0,7	59 ± 1,4	4 ± 0,7

Висновки:

1. Не виявлено токсичної дії на спермії 3% ДМСО, який використовують у технології SMT.

2. Отримані дані свідчать про доцільність інкубування спермій у атмосфері з 5% CO₂ і враховувати позитивну дію цього фактора при розробках і оптимізації інших методик одержання і інкубування сперматозоїдів.

Бібліографічний список

1. Включение макромолекул в половые клетки самцов мышей при помощи электропорации и диметилсульфоксида /Баранов В.С., Гапала И., Грияч П. и др. // Цитология и генетика. – 1990. – Т.24. - № 3. – С.3-7.
2. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization / Brackett B.G., Baranska W., Sawicki W., Koprowski H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1971. – V. 68. – P. 353-357.
3. Использование сперматозоидов кролика в качестве вектора для чужеродной ДНК /Кузнецова И.В., Кузнецов А.В., Сигаева В.А., Щит И.Ю. // Биотехнология. – 1993. – Т. 11-12. – С.2-5.
4. Ахмад М.М. Використання фізичних факторів для підвищення біологічної активності рухливої фракції спермій еякуляту людини: Автореф. дис...канд. мед. наук / Харків, 1997. – 19 с.
5. Биология развития млекопитающих. Методы: Пер. с англ. /Под ред. М.Манк. – М.: Мир, 1990. – 406 с., ил.
6. Мороз Л.Г., Корбан Н.В., Шапиев И.Ш. Методические рекомендации по оценке качества спермы хряков при низкотемпературной консервации. – Л-град, 1980. – 61 с.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ТРАНСФЕКЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ НА ИХ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ

М.Е.Сербин, О.В.Щербак

В работе было проведено изучение влияния ДМСО и разных концентраций CO₂, применяемых в технологии трансфекции, на морфо-функциональное состояние спермиев.

SOME TECHNOLOGICAL SPERM TRANSFECTION FACTORS IMPACT ON THEIR MORPHO-FUNCTIONAL STATE

М.Е.Serbin, О.V.Shcherbak

The institute of animal science UAAS