

ВПЛИВ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У ТЕХНОЛОГІЇ ТРАНСФЕКЦІЇ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

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

У роботі було вивчено вплив ДМСО (3 %), BSA (15 мг/мл) та CaCl_2 (20 mM), які використовуються у технології трансфекції, на морфо-функціональний стан спермій бугаїв. Не було виявлено токсичної дії ДМСО (3 %) та BSA (15 мг/мл) на чоловічі гамети, але виявлено, що інкубація спермій бугая у середовищі sp-TALP з концентрацією CaCl_2 20 mM достовірно ($P > 95$) знижує показник рухливості (на 28 %) та децю підвищує вміст патологічних форм спермій.

трансфекція, спермії бугаїв, чужорідна ДНК, морфо-функціональний стан, кріоконсервована сперма

Звичайні методи селекції, які потребують значних матеріальних затрат та великого проміжку часу, вже не можуть повною мірою задовольнити сучасне тваринництво. У світовому масштабі все більш інтенсивно впроваджуються розробки в області генної інженерії як одного з найефективніших методів біотехнології [1]. Упровадження технології трансгенезу відкрило принципово нові можливості спрямованої генетичної мінливості. Однак при цьому, у наслідок великої економічної витратності процесу, на сьогодні стає дуже актуальним питання підвищення його ефективності. Особливо це стосується удосконалення центрального етапу трансгенезу – процесу трансфекції чужорідної ДНК [2].

Нині існують декілька альтернативних підходів, які, за умови їх подальшого розвитку та удосконалення, здатні усунути ряд недоліків класичних методів трансфекції [1]. Одним із перспективних напрямів, що дають змогу значно інтенсифікувати технологію трансгенезу, є метод „трансфекції генів опосередкованої сперміями” (sperm-mediated gene transfer, SMGT) [3].

Під час SMGT для підвищення частоти трансмембранного перенесення чужорідної ДНК у клітини спермій використовуюється цілий ряд хімічних речовин: BSA, ДМСО, CaCl_2 . Ці речовини згідно з літературними джерелами [4] у високих концентраціях є токсичними для біоматеріалу. З іншого боку до сих пір у літературі ми дуже рідко стрічаємо роботи щодо дослідження токсичної дії цих речовин у концентрації, яка використовується у технології трансфекції [2]. А саме: BSA (15 мг/мл) [5], ДМСО (загальна концентрація у середовищі – 3%) та CaCl_2 (20 mM) [6]. Тому, на нашу думку, зараз виникає необхідність проведення досліджень характеру впливу та встановлення пошкоджуючої дії кожного з етапів трансгенезу та трансфекції з наступної метою удосконалення процесу.

Метою даної роботи було дослідження впливу технологічних концентрацій трьох хімічних речовин, які застосовують у SMGT-методі під час короткочасного інкубування спермій бугаїв на їх морфо-функціональний стан.

Матеріали і методи досліджень. У роботі використано кріоконсервовану сперму бугаїв-плідників із спермобанку лабораторії штучного запліднення ІТ УААН.

Заморожену сперму відтаювали при температурі 40 °C та вилучали рухливу фракцію спермій методом флотації (“swim-up”) у середовищі sp-TALP за методикою Parrish J.J. et al. [7]. За допомогою центрифугування (200 g, 5 хв) для

подальшого короткочасного інкубування загальну концентрацію спермійв доводили до 10^5 клітин/мл.

Короткочасне інкубування (2 години, при 38 °C) проводили також у середовищі sp-TALP. Перед інкубуванням безпосередньо у це середовище додавали хімічні речовини, які застосовують у SMGT-методі. Були проведені три паралельні досліди, у яких до середовища sp-TALP додавали одну з трьох речовин у наступних концентраціях (загальна концентрація у середовищі): 1) ДМСО (3 %); 2) BSA (15 мг/мл); 3) CaCl_2 (20 mM).

До та після інкубування оцінювали морфо-функціональний стан спермійв за показниками рухливості та вмісту й кількості патологічних форм.

Усі отримані результати опрацьовували статистично за методом Стьюдента.

Результати досліджень. У цій роботі ми використовували заморожено-відталу сперму на відміну від багатьох досліджень цього напрямку, де використовують свіжоотриману сперму. Однак, свіжоотримана сперма може бути не доступною для багатьох лабораторій, які займаються проблемами трансгенезу сільськогосподарських тварин.

Сьогодні найбільш поширеним методом зберігання сперми є її кріоконсервація. Давно відомо, що умови кріоконсервування та деякі кріопротектори впливають на морфо-функціональні характеристики спермійв. При подальшому використанні у процесі трансфекції такої сперми на неї діють й інші технологічні фактори, що разом може призводити до значного ушкодження спермійв. Тому отриманні результати з використанням заморожено-відтлої сперми мають значну актуальність.

У цьому дослідженні перед інкубуванням ми вилучали рухливу фракцію спермійв, що давало нам можливість відділити мертві та малорухливі спермії; а також плазму, біохімічні фактори якої інгібують капацитацію та процес інтеграції трансгена у реціпієнтний геном. Таке модифікування методу повинно підвищити ефективність процесу трансфекції.

Таким чином, у наших дослідженнях ми вивчали вплив ДМСО (3 %), BSA (15 мг/мл) та CaCl_2 (20 mM) на морфо-функціональний стан рухливої фракції заморожено-відталих спермійв (табл. 1).

1. Вплив ДМСО, BSA та CaCl_2 на морфо-функціональний стан спермійв

Показник морфо-функціонального стану	Стандартне середовище (контроль)		ДМСО (3 %)		BSA (15 мг/мл)		CaCl_2 (20 mM)	
	до інкубування	після інкубування	до інкубування	після інкубування	до інкубування	після інкубування	до інкубування	після інкубування
Рухливість, %	$58,3 \pm 3,25$	$56 \pm 3,12$	$53,7 \pm 4,2$	$51,3 \pm 3,33$	$52,3 \pm 5,1$	$59 \pm 1,8$	$58 \pm 6,5$	$30 \pm 3,28$
Вміст патологічних форм, %	$9,7 \pm 1,76$	$8 \pm 1,32$	$9,7 \pm 1,1$	$9,3 \pm 1,04$	$9 \pm 1,8$	$8,7 \pm 1,76$	$9,3 \pm 0,76$	$11,7 \pm 1,26$

У проведених дослідженнях на сперміях бугаїв не виявлено токсичної дії ДМСО (3 %) на чоловічі гамети відносно використаних показників морфо-функціонального стану.

Такий самий висновок згідно з результатами дослідження можна зробити й щодо характеру впливу BSA (15 мг/мл). За цими результатами також можна

виявити деяку тенденцію (але статистично не достовірну) до підвищення показника рухливості при дії BSA (15 мг/мл). Це можна пояснити трофічною та стимулюючою дією цієї сироватки на клітини.

Таким чином, вивчені найпоширеніші хімічні фактори, які використовують у технології SMGT, у цілому задовольняють потреби цього методу.

Проте у дослідженні було виявлено, що інкубація спермійів бугая у середовищі з концентрацією CaCl_2 20mM достовірно ($P>95$) знижує показник рухливості та підвищує вміст патологічних форм спермійів. Це можна пояснити тим, що CaCl_2 у такій концентрації підвищує осмолярність середовища; а також тим, що спермії мають на поверхні рецептори чутливі до йонів Ca^{2+} , підвищена концентрація яких може викликати у клітині різноманітні біохімічні процеси через рецептор-опосередковані каскадні механізми [8]. Тому є необхідність проведення подальших дослідів щодо впливу CaCl_2 на морфо-функціональний стан спермійів та знаходження його оптимальної технологічної концентрації.

Висновки:

1. У проведенному дослідженні не виявлено токсичної дії ДМСО (3 %) та BSA (15 мг/мл) на чоловічі гамети відносно використаних показників морфо-функціонального стану.

2. Виявлено, що інкубація спермійів бугая у середовищі sp-TALP з концентрацією CaCl_2 20 mM достовірно ($P>95$) знижує показник рухливості (на 28 %) та дещо підвищує (на 2,4 %) вміст патологічних форм спермійів.

3. Кріоконсервована сперма після вище описаних маніпуляцій має морфо-функціональний стан, який у цілому задовольняє вимоги, що пред'являють для успішного проведення запліднення ооцитів; тобто її також можна використовувати у технології SMGT, як і свіжоотриману.

Бібліографічний список

1. Эрнст Л.К., Гольдман И.Л., Кадулин С.Г. Генная инженерия в животноводстве: трансгенные сельскохозяйственные животные, кормовые растения, микроорганизмы рубца // Биотехнология. – 1993. – Т. 5. – С. 2-14.

2. 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.

3. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин. – Х., 2002. – 155 с.

4. Биология развития млекопитающих. Методы: Пер. с англ.; Под ред. М.Манк. – Москва: Мир. – 1990. – 406 с., ил.

5. Кузнецов А.В., Каурова С.А., Кузнецова И.В. Трансфекция маточного эпителия при осеменении крольчих трансформированными сперматозоидами. Модель интернализации ДНК в спермий // Проблемы репродукции. – 1998. - № 6. - С. 29-33.

6. К возможности инкорпорирования макромолекул, включая экзогенную ДНК, в половые клетки самцов мышей. Липосомный метод и метод Са-Р копреципитации /Баранов В.С., Брзобогатый Б., Цымбаленко Н.В. и др. //Цитология и генетика. – 1990. – Т. 24, № 2. – С. 52-55.

7. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.I. et all. // Theriogenology. – 1986. – V.25, № 4. – P. 591-600.

8. Complexing of serum pre-B and B-lipoproteins and acid mucopolysaccharides Srinivasan S.R. et all. // Atherosclerosis. – 1970. – V.12. – 321-334.

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, КОТОРЫЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ В ТЕХНОЛОГИИ
ТРАНСФЕКЦИИ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СПЕРМИЕВ БЫКОВ

М.Е. Сербин, Е.В. Щербак, Институт животноводства УААН

В работе было проведено изучение влияния ДМСО (3%), BSA (15 мг/мл) и CaCl_2 (20 mM), применяемых в технологии трансфекции, на морфо-функциональное состояние спермиев быка. В исследовании не было установлено токсическое влияние ДМСО (3 %) и BSA (15 мг/мл) на мужские гаметы, но установлено, что инкубация спермиев быка в среде sp-TALP с концентрацией CaCl_2 20 mM достоверно ($P>95$) снижает показатель подвижности (на 28 %) и несколько увеличивает содержание патологических форм спермиев.

INFLUENCE CHEMICAL FACTORS OF TRANSFECTION ON THE MORPHOFUNCTIONAL
STATE OF THE BOVINE SEMENS

M.E. Serbin, E. V. Scherbak, Institute of Animal Science UAAS

This article highlights DMSO (3%), BSA (15 mg/ml) and CaCl_2 (20 mM) impact on the morphofunctional state of the bovine semens. This factors are used in the transfection techniques.

УДК 636.082.22

**ОЦІНКА КОРІВ СУМСЬКОГО ТИПУ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ
МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ ЗА ПАРАМЕТРАМИ ЕКСТЕР'ЄРУ ТА
ІНДЕКСАМИ БУДОВИ ТІЛА**

Ю.І. *Скляренко

Сумський інститут агропромислового виробництва

Тварини сумського типу української чорно-рябої молочної породи дещо поступаються за величиною промірів статей тіла стандарту породи. Між окремими промірами будови тіла встановлений кореляційний зв'язок. Тварини нового типу дещо відрізняються індексами будови тіла від стандарту породи, але в цілому значення індексів будови тіла є проміжними між значенням індексів тварин молочного і м'ясо-молочного типу.

**корова, сумський тип української чорно-рябої породи, проміри, індекси,
кореляція**

Оцінка тварин за екстер'єром є необхідною умовою селекційного удосконалення молочної худоби. Добре виражений молочний тип і високі екстер'єрні якості корів значною мірою обумовлюють показники продуктивних ознак [6].

Оцінка великої рогатої худоби за промірами статей екстер'єру доповнює окомірну оцінку, робить її об'єктивнішою і точнішою, а цифрове вираження розвитку оцінених ознак дозволяє шляхом їхнього порівняння виявити індивідуальні та групові особливості тварин. Проте окремо взяті абсолютні показники промірів будови тіла не завжди можуть охарактеризувати тварину такою ж мірою, як їх співвідносне поєднання виражене у відносних одиницях індексів. Визначення індексів у зоотехнічній практиці базується на використанні таких промірів, які найбільш ґрунтовно характеризують пропорційність розвитку будови тіла в загальному екстер'єрному типі тварин. Тому актуальність проблеми полягає у визначенні промірів та індексів будови тіла, які достатньо вірогідно характеризують екстер'єрний тип молочних корів.

Індекси будови тіла досить цінний матеріал для об'єктивної оцінки тварин за екстер'єрним типом оскільки їх використання дає можливість селекціонерам визначити тип конституції, індивідуальні особливості, ступінь і пропорційність

*Науковий керівник - академік В.П.Буркат