

4. Amorena B., Stone W.H. Bovine Lymphocyte Antigens (BoLA): Aserologie, genetic and histocompatibility antigen. Tisaue Antigens. - 1980. - Vol.16. - №.3, p.212-225.

5. Anderson K.L. Management of coliform mastitis in dairy cows. Agri.Pract.-1987.- V.8.- N.1, p.17-21.

Изучали генетический полиморфизм серологично определяемых антигенов класса - I Главного комплекса гистосовместимости у животных в связи с устойчивостью и восприимчивостью к маститам, проводили статистическую обработку полученных результатов для выявления «информативных» антигенов. У обследованных животных наиболее часто выявлялись антигены W15, MSU A 2, A18, A19, A21 и A23. Наиболее редко - W2, W10, W14 и MSU A 9. Анализ полученных результатов показывает, что ассоциированными с заболеванием вымени есть антигены W6, W31, W15, A12, A13 и A23.

Studied genetic polymorphism serological typing antigens of a class - I Main complex histocompatibility at animals in connection with stability and a susceptibility to mastitis, carried out statistical processing the received results for revealing "informative" antigens. At the investigated animals most antigens W15, MSU A2, A18, A19, A21 and A23 often were taped. Most seldom - W2, W10, W14, MSU A9. The analysis of the received results shows, that associated with disease of a udder there are antigens W6, W31, W15, A12, A13 and A23.

УДК 636.2:591.453.5

ДОЗРІВАННЯ ПОЗА ОРГАНІЗМОМ ДЕКОНСЕРВОВАНИХ ООЦИТІВ КОРІВ У ГРУПАХ З РІЗНОЮ ЧИСЕЛЬНІСТЮ ГАМЕТ

П.А.Троцький

Інститут розведення і генетики тварин УААН

Викладено результати власних досліджень щодо оцінки життєздатності деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів, які перед заморожуванням попередньо культивували 15 і 24 години в групах з різною чисельністю гамет.

**біотехнологія, яєчники, ооцит-кумулясні комплекси,
кріоконсервування, гліцерин, пропандіол, сахароза, *in vitro***

Сучасний розвиток методів агробіотехнології відкриває великі можливості консервування, тривалого зберігання та практичного використання репродуктивних клітин і ембріонів сільськогосподарських тварин залежно від потреб народного господарства. Одним з пріоритетних та перспективних методів збереження генетичних резервів порід є створення банків кріоконсервованих ооцитів і ембріонів шляхом їх глибокого заморожування в рідкому азоті при температурі – 196°C [1-4]. Метод кріоконсервування разом з методикою культивування і запліднення *in vitro* гамет самиць нині є базовим при отриманні в достатній кількості необхідного біологічного матеріалу, а саме ооцитів на різних стадіях їх мейотичного дозрівання, зигот, зародків на різних стадіях їх розвитку та використання його в експериментальних дослідженнях [5-7].

В природних умовах (*in vivo*) ооцити корів дозрівають індивідуально у кожному окремому фолікулі. Але в практиці культивування поза організмом гамет корів дослідники використовують не тільки різні культуральні середовища, їх об'єми, але й різні варіанти кількісного групування в них культивуємих клітин. Однією з проблем при культивуванні, з якою постійно має справу дослідник це співвідношення культурального середовища і культивуємих в ньому гамет. Існують різні думки та отримані полярні результати в експериментальних дослідженнях щодо впливу кількості гамет самиць або зародків ссавців в мікрооб'ємі культурального середовища на їх подальший розвиток [8-10]. Тому метою досліджень було вивчення впливу попереднього культивування перед заморожуванням ооцит-кумулясних комплексів корів у групах з різною чисельністю гамет на життєздатність і мейотичне дозрівання поза організмом гамет корів після розморожування.

Матеріали і методика досліджень. Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси, які отримували з яєчників корів і телиць чорно-рябої породи. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко та оцінювали за морфологічними ознаками. Перед заморожуванням гамети корів обробляли еквілібраційним розчином (10% гліцерин + 20% пропандіол, 10 хв.), потім на 30 секунд переносили у вітрифікаційний розчин (25% гліцерин + 25% пропандіол), вміщували у пластикові пайєти і занурювали у рідкий азот. Після розморожування гамет виведення кріопротекторів з них здійснювали шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози.

Ооцит-кумулясні комплекси корів культивували в чотирилунокових планшетах у краплях поживного середовища протягом 27 годин. На різних етапах культивування ооцити підлягали морфологічному і цитогенетичному аналізу. Цитогенетичні препарати готували за методом Tarcowski A.K., забарвлювали 10%-ним розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати досліджень. Перед заморожуванням ооцит-кумулясні комплекси корів культивували в краплі об'ємом 200 мкл культурального середовища протягом 15-ти і 24-х годин. Чисельність гамет в експериментальних групах становила: варіант А – клітини культивували індивідуально, варіант Б – по 3 клітини в краплі, варіант В – по 5, варіант Г – по 10, , варіант Д – по 20 і у варіанті Е – по 30 клітин у краплі (таблиця).

Після заморожування-розморожування гамети корів у кожному варіанті досліду оцінювали за морфологічними ознаками. Кількість морфологічно нормальних клітин, придатних для культивування (що мали неушкоджену прозору оболонку, гомогенну і тонкозернисту ооплазму) після розморожування становила: 83,3% – у варіанті А; 82,1% – у варіанті Б; 80,0% – у варіанті В; 82,5% – у варіанті Г; 77,5% – у варіанті Д; 73,3% – у варіанті Е. Ооцит-кумулясні комплекси корів без видимих морфологічних порушень в подальшому переносили в культуральне середовище і культивували ще протягом 12-ти годин, а потім вони підлягали цитогенетичному аналізу.

Дозрівання деконсервованих ооцитів корів, що перед заморожуванням попередньо культивували в групах з різною чисельністю клітин

Варіанти дослідів	Кількість заморожених клітин	Термін попереднього культивування, год.	Кількість морфологічно нормальних клітин після розморожування		Термін подальшого культивування після розморожування, год.	Кількість клітин, що підлягали цитогенетичному аналізу	Кількість клітин					
			n	%			на метафазі-2		на інших стадіях мейозу		з хромосомними порушеннями	
							n	%	n	%	n	%
А	60	15	50	83,3	12	50	24	48,0 ^{ab}	10	20,0	16	32,0
	60	24	54	90,0	3	54	26	48,2 ^{cd}	10	18,5	18	33,3
Б	78	15	64	82,1	12	64	30	46,9 ^{ab}	14	21,9	20	31,2
	60	24	52	86,7	3	52	28	53,8 ^{cd}	8	15,4	16	30,8
В	70	15	56	80,0	12	56	28	50,0 ^{ab}	10	17,9	18	32,1
	60	24	50	83,3	3	50	26	52,0 ^{cd}	8	16,0	16	32,0
Г	80	15	66	82,5	12	66	36	54,6 ^b	8	12,1	22	33,3
	60	24	50	83,3	3	50	28	56,0 ^{de}	6	12,0	16	32,0
Д	80	15	62	77,5	12	62	36	58,1 ^b	8	12,9	18	29,0
	80	24	68	85,0	3	68	44	64,7 ^e	6	8,8	18	26,5
Е	60	15	44	73,3	12	44	18	40,9 ^a	7	15,9	19	43,2
	60	24	52	66,7	3	52	22	42,3 ^c	6	11,5	24	46,2

Примітка. $a : b, c : d - P < 0,05$; $c : e - P < 0,01$

Результати цитогенетичного аналізу виявили, що в міру збільшення чисельності культивуємих клітин (від 1 до 10 в краплі культурального середовища) спостерігалась тенденція збільшення показника дозрівання ооцитів корів до метафази-2 мейозу (48,0; 46,9; 50,0; 54,6% відповідно у варіантах дослідів А, Б, В і Г) і він був найбільшим у варіанті Д (58,1%), в якому для попереднього культивування перед заморожуванням в краплі середовища об'ємом 200 мкл уміщували по 20-ть клітин. Подальше збільшення чисельності культивуємих перед заморожуванням гамет корів (варіант Е) призводило до зменшення ($P < 0,05$) кількості дозрілих до метафази-2 мейозу деконсервованих ооцитів корів (40,9%) порівняно з варіантами Г і Д і в свою чергу в цій експериментальній групі спостерігали тенденцію збільшення кількості гамет з дегенерацією (порушенням) хромосомного матеріалу (43,2%) порівняно з іншими варіантами дослідів (32,0, 31,2; 32,1; 33,3 і 29,0% відповідно в варіантах А, Б, В, Г і Д).

Подовження терміну попереднього культивування ооцит-кумулюсних комплексів корів до 24-х годин перед заморожуванням підтвердило раніше виявлену тенденцію. Так, після розморожування і подальшого 3-годинного культивування гамет корів та їх цитогенетичного аналізу було виявлено, що кількість ооцитів, які знаходились на метафазі-2 мейозу у варіантах дослідів А, Б, В, Г, Д і Е була відповідно 48,2; 53,6; 52,0; 56,0; 64,7 і 42,3%, а показник клітин з дегенерацією хромосомного матеріалу в цих дослідних варіантах становив відповідно 33,3; 30,8; 32,0; 32,0; 26,5 і 46,2%.

Висновок. Результати проведених експериментальних досліджень свідчать, що попереднє культивування ооцит-кумулюсних комплексів корів перед заморожуванням за умов використання 10-ти і 20-ти клітин у 200 мкл культурального середовища підвищує кріорезистентність гамет, що проявляється у збільшенні на 4,6-22,4% після розморожування кількості життєздатних і дозрілих до метафази-2 мейозу гамет порівняно з іншими дослідними варіантами співвідношення кількості гамет корів і мікрооб'єму культурального середовища.

Бібліографічний список

1. Зубець М.В., Гузеватий О.Є., Ясінський В.В. Кріоконсервація ооцитів – один з шляхів збереження генофонду сільськогосподарських тварин //Тваринництво України.- 1994.- №3.- С. 15.
2. Embryo importation and cryobanking strategies for laboratory animals and wildlife species /M.C. Schiewe, V.M. Hollifield, L.A. Kasbohm, P.M. Schmidt //Theriogenology.- 1995.- V.43.- I.1.- P. 97-104.
3. Безуглий М.Д. Низькотемпературна консервація яйцеклітин та ембріонів в біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин: Дис. ...д-ра.с.-г.наук: 06.00.27/ X., 1995.- 333 с.
4. Dobrinsky J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos // Theriogenology.– 2002.– V57.- I.1.- P.285-302.
5. Bautista J.A., Kanagawa H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice //Jpn. J. Vet. Res.- 1998.- V.45.- P.13-19.
6. Мельничук Д.О., Гузеватий О.Є. Перспективи біотехнології у тваринництві //Вісник аграрної науки.- 2002.- №12.- С.5-11.
7. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин .- X., 2002.- 155с.
8. Reed M.L., Lalonde A.R.L., Kraemer D.C. Effect of increased embryo/volume ration and solcoseryl product addition on murine zygote development //Theriogenology.- 1989.- V.31.- I.1.- P. 246.
9. Papis K., Shimizu M., Izake Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets // Theriogenology.- 2000.- V.54.- I.5.- P.651-658.
10. Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization embryo development in pigs /Gil M.A., Abeydeera L.R., Day B.N. et al. // Theriogenology. - 2003.- V.60.- I.4.- P. 767-776.

Изложены результаты собственных исследований относительно оценки жизнеспособности деконсервированных ооцит-кумулюсных комплексов коров, которые перед замораживанием предварительно культивировали 15 и 24 часа в группах с различным количеством гамет.

Experimental material on evaluation of viable of frozen-thawed bovine oocyte-cumulus complexes which before freezing were previously matured in vitro at 15 and 24 hours in groups with different numbers of gametes is account